

Método de inclusión en parafina para diagnóstico rápido por medio de microondas



Germán Isauro Garrido Fariña*
Miguel Ángel Cornejo Cortés*

Abstract

A protocol for fast embedded paraffin by a microwave process for histological and clinical samples for light microscopy was developed. Tissue specimens, dog's liver, polyp, skin and lung, cat's brain, kidney, and rat's ovary, uterine horn and artery were processed by using a standard household microwave oven (600 watts) at 75% power. This study was done using progressive alcohol solutions (dehydration), benzene-ethanol solutions (clearing) and paraffin for the infiltration. A group of specialists reviewed the material and photographs of the different organs processed with three different inclusion techniques. Results of the observation revealed: no difference between the histokinette (HK) and microwave oven. There were apparent morphological differences between the last two processes and the Robinson & Fayen technique (RF). This process could allow results to be reported within 30 min after the specimens were evaluated in the laboratory. The morphology for the microwave-processed samples was better than the one observed by the fast diagnostic process technique of RF, and no discerning differences with the routine histokinette method were found.

Key words: MICROWAVE, HISTOPATHOLOGY FAST DIAGNOSIS, MICROTECHNIC.

Resumen

Se desarrolló un protocolo de impregnación rápida en parafina por medio de microondas, para muestras histológicas y de diagnóstico, con el propósito de que fueran observadas en microscopía de campo claro. Se procesaron muestras de hígado, papiloma, piel y pulmón de perro; cerebro y riñón de gato; ovario, cuero uterino y arteria de rata. Se utilizó un horno de microondas casero (600 watts) a 75% de su potencia, con soluciones ascendentes de alcohol para deshidratar, mezclas de benzene-ethanol para aclarar y parafina para embeber. Un grupo de especialistas revisó el material y fotografías de los diversos órganos procesados, con tres técnicas de inclusión distintas, con los resultados obtenidos a partir de las observaciones realizadas se concluye que no hay una diferencia significativa entre las muestras de histokinette (HK) y microondas (MO). Al comparar las técnicas de HK, MO con la de Robinson y Fayen (RF), se advierten diferencias morfológicas muy aparentes. Este método permite obtener diagnósticos patológicos y morfológicos 30 minutos después de que las muestras se reciben en el laboratorio. La morfología de las muestras procesadas por medio de microondas es mejor que las muestras procesadas por el método rápido de RF y no hay diferencias apreciables en comparación con el método de rutina por HK.

Palabras clave: MICROONDAS, DIAGNÓSTICO RÁPIDO EN HISTOPATOLOGÍA, MICROTECNIA.

Recibido el 23 de marzo de 2000 y aceptado el 13 de abril de 2000.

* Sección de Ciencias Morfológicas, Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Km 2.5, Cuautitlán Izcalli, 24700, Estado de México, México. Domicilio del primer autor: Julio Vértiz núm. 1 Circuito Oradores, Cd. Satélite, Naucalpan de Juárez, Estado de México, México, 53100, Tel. 55728834, E.mail: Isauroga@servidor.unam.mx Fax: 56231802.

Introducción

Desde hace más de 20 años el uso de los hornos de microondas ha facilitado y hecho más eficientes muchos procesos, por ejemplo: preparación de reactivos,¹ digestión y secado de muestras,^{2,3} fijación de piezas histológicas,^{4,5} limpieza de epítopes para inmunohistoquímica⁶ y diagnóstico en microscopía electrónica.^{7,8}

Aprovechando las cualidades de las microondas para excitar y movilizar moléculas de agua, se propone un método para deshidratar e incluir en parafina, en donde las moléculas de agua son desplazadas por las microondas, lo que propicia que su lugar sea ocupado por moléculas móviles de alcoholes y solventes, que permite la entrada de los hidrocarburos.

Este método de inclusión disminuye considerablemente los tiempos de proceso para muestras provenientes de casos para diagnóstico urgente, además tiene gran valor en los laboratorios de diagnóstico que no cuentan con aparatos para trabajar por congelación y necesitan un resultado expedito.

Por otro lado, este método se puede utilizar dentro del trabajo de rutina de un laboratorio de histología, ya que permite disminuir el tiempo durante el cual la muestra es procesada.

En este trabajo se compararon la técnica de rutina usandohistokinette (HK), la técnica rápida de Robinson y Fayen⁹ (RF) y la técnica propuesta por medio de microondas.

Equipo

Se utilizó un horno de microondas convencional de 600 watts* con cinco niveles de potencia: tibio, descongelar, medio, medio alto y alto.

Material biológico

El material que se empleó fue obtenido del banco de órganos del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y de piezas remitidas para su procesamiento y diagnóstico morfológico se eligieron órganos de distintas especies al

Cuadro 1
NÚMERO DE LAMINILLA, ÓRGANO EMPLEADO, CARACTERÍSTICA MORFOPATOLÓGICA PRINCIPAL Y TÉCNICA APLICADA

	Técnica hk	Técnica mo	Técnica rf
1 Hígado infiltración mononuclear perivasicular infestación por amiba. Hámster hematoxilina-eosina		X	
2 Hígado degeneración por acumulación grasa. Perro H-E	X		
3 Hígado degeneración por acumulación grasa. Perro H-E			X
4 Piel papiloma ocular único perro H-E		X	
5 Piel dermatitis aguda perro H-E	X		
6 Pulmón normal. Cerdo H-E	X		
7 Pulmón normal. Perro H-E		X	
8 Pulmón normal. Perro H-E			X
9 Cerebro normal. Gato H-E	X		
10 Cerebro normal. Gato H-E		X	
11 Cerebro normal. Gato H-E			X
12 Riñón congestión generalizada crónica. Gato H-E	X		
13 Riñón congestión generalizada crónica. Gato H-E		X	
14 Riñón congestión generalizada crónica. Gato H-E			X
15 Ovario normal. Rata H-E	X		
16 Ovario normal. Rata H-E		X	
17 Cuerno uterino normal. Coneja H-E	X		
18 Cuerno uterino normal. Rata H-E		X	
19 Arteria normal. Rata t. Cajal		X	
20 Arteria normal. Rata t. Cajal			X
21 Arteria normal. Rata t. Cajal			X

* Daewoo, modelo Kor-6185.

azar. Principalmente se utilizaron aquellos órganos que con más frecuencia están presentes en el diagnóstico de rutina. Se procesaron muestras de hígado de hámster y perro; piel de perro y un papiloma; pulmón de cerdo y de perro; cerebro de gato; riñón de gato; ovario de rata; cuerno uterino de coneja y rata, y arteria de rata (Cuadro 1).

El material de cristalería de elección fue refractario y con capacidad de al menos 200 ml.

Método

Procesamiento de las muestras

La fijación de las muestras obtenidas del banco de órganos se hizo con formalina amortiguada al 10% (mezcla de trabajo estandarizada en el laboratorio) durante 24 horas, posteriormente se lavaron, se conservaron en alcohol al 70% y se cortaron dentro del rango de 2-4 mm de espesor.

Las muestras para diagnóstico morfológico fueron recibidas inmersas en formalina amortiguada proporcionada por el laboratorio, las muestras fueron lavadas, cortadas dentro del rango de 2-4 mm de espesor y depositadas en alcohol al 70% hasta el inicio del procedimiento.

Con las muestras elegidas se hicieron tres grupos para ser sometidos a los procesos de inclusión. Posteriormente se sometieron al proceso estandarizado de inclusión en horno de microondas, que consistió en probar sistemáticamente diversas soluciones y mezclas de reactivos, tomando como base alcohol etílico y benceno.

El proceso final recomendado para el horno de microondas consistió en sumergir las muestras consecutivamente en los reactivos y mezclas siguientes: Alcohol etílico (R-OH) al 70%, 30 segundos; R-OH al 80%, 30 segundos; R-OH al 90%, 30 segundos; R-OH al 96% (dos veces), 30 segundos cada una; R-OH 100 (dos veces), 30 segundos cada una; R-OH 100 (75 vol.)/benceno (25 vol.), 30 segundos; R-OH 100 (50 vol.)/benceno (50 vol.), 30 segundos; R-OH 100 (25 vol.)/benceno (75 vol.), 30 segundos; benceno puro (dos veces), 30 segundos cada una; parafina pura (dos veces), 30 segundos cada una.

Las piezas, para ser trabajadas, se colocaron en un vaso de precipitado o matraz con una relación 1:100 volumen pieza-mezcla, en cada uno de los cambios.

El horno se activó para cada cambio, a potencia media, durante 30 segundos y antes del inicio de la ebullición; esto es, el recipiente con las muestras permaneció bajo la acción de las microondas hasta poco antes la ebullición o la producción de burbujas en la superficie de las muestras.

Una vez terminado el proceso en la última parafina, las piezas se incluyeron, cortaron, montaron y tiñeron, mediante los procedimientos de rutina.

Las laminillas obtenidas se fotomicrografiaron para comparar las imágenes de los tres métodos: HK, RF y microondas.

Se invitó a ocho profesionales relacionados con el área para que revisaran las laminillas y sobre las fotografías del material revisado y contestaran un cuestionario diseñado con el fin de comparar las imágenes obtenidas mediante los métodos empleados: HK, RF y microondas.

Las laminillas y fotografías empleadas se presentaron con el nombre del tejido, tinción y diagnóstico; la técnica con que se procesó la muestra no se mencionó.

Las preguntas del cuestionario para evaluar las características del material fueron: Califique, en escala de 1 a 10, las fotografías de cada órgano respecto de su calidad morfológica; califique en escala 1 a 10, las fotografías de cada órgano respecto de las características nucleares; califique en escala 1 a 10 las fotografías de cada órgano con respecto a las características citoplasmáticas.

Las calificaciones asignadas por cada observador para cada una de las características de las preparaciones, fue promediada para comparar las calificaciones totales de cada técnica.

Resultados

Los especialistas que observaron y calificaron las laminillas, dieron una calificación superior a la técnica HK; en segundo lugar a la técnica Mo; y las calificaciones más bajas fueron dadas a la técnica RF. Los resultados se presentan en el Cuadro 2.

Discusión

Al analizar los resultados de esta técnica nueva, puede recomendarse para casos de diagnóstico urgentes o muestras de histología normal.

Al comparar los resultados en el cuestionario aplicado, se observó que para especialistas del área las imágenes proporcionadas por los métodos de HK y MO, tienen buenas características morfológicas y se observan adecuadamente las estructuras críticas para diagnóstico.

En la comparación que se hizo, los resultados son claros al establecer que la técnica de RF no reúne las características morfológicas de las otras dos técnicas.

Se mantiene una buena aptitud tintorial de todas las estructuras; esto es, tanto en técnicas topográficas como citológicas, se observa que núcleos y citoplasmas obtienen un balance adecuado después de la tinción.

El proceso técnico de corte y montaje se realiza sin contratiempos, dependiendo de cuánto tiempo se somete la muestra a las variables de número de baños por mezcla, potencia del horno y cantidad de ml en el recipiente de trabajo.

Cuadro 2
PROMEDIO DE LAS CALIFICACIONES PARA CADA UNA DE LAS PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS

Laminilla	Órgano, característica morfopatológica y animal	Promedio de calificaciones del núcleo	Promedio de calificaciones del citoplasma	Promedio s de calificaciones morfológica	Técnica empleada
2	Hígado proceso acumulativo. Perro	10	9	9.5	Hk
5	Piel dermatitis. Perro	8.5	8	8	Hk
6	Pulmón normal. Cerdo	8	9	8.5	Hk
9	Cerebro normal. Gato	8.5	8	8.5	Hk
12	Riñón congestión. Gato	8.5	7.5	8	Hk
15	Ovario normal. Rata	9	9	9.5	Hk
17	C. Uterino normal. Coneja	9	9	9.5	Hk
19	Arteria normal. Rata	7	7	8	Hk
	Promedios	8.56	9.43	8.68	
1	Hígado infiltración. Hámster	8	7	8	Mo
4	Piel papiloma. Perro	8.5	8.5	8.5	Mo
7	Pulmón normal. Perro	8	9	8.5	Mo
10	Cerebro normal. Gato	8	7	8	Mo
13	Riñón congestión. Gato	8	7	8	Mo
16	Ovario normal. Rata	8	8.5	8	Mo
18	C. Uterino normal. Rata	9.5	8.5	9.5	Mo
20	Arteria normal. Rata	7.5	8	8.5	Mo
	Promedios	8.1	7.93	8.37	
3	Hígado proceso. Acumulativo perro	8	8	7.5	Rf
8	Pulmón normal. Perro	5	5	5	Rf
11	Cerebro normal. Gato	8	7	7.5	Rf
14	Riñón congestión. Gato	7	6	7	Rf
21	Arteria normal. Rata	6.5	6.5	7	Rf
	Promedios	6.9	6.5	6.8	

Se presenta una contracción muy parecida a la que se provoca con los métodos de rutina: mayor a 10%. Cuando se disminuye el número de baños por mezcla y la cantidad de reactivo en el recipiente aumentan las variables arriba mencionadas.

En comparación con la técnica de Robinson y Fayen, los resultados obtenidos con microondas son muy buenos, la sección de las piezas no tiene dificultad y las características morfológicas se mantienen sin cambios tan drásticos como en la primera.⁹

Si se deben trabajar muestras obtenidas recientemente sin fijación, se puede aplicar el método de fijación por medio de microondas,⁴ para posteriormente lavar e iniciar el protocolo de inclusión en microondas con alcohol al 70%.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Jorge Tórtora Pérez y a Fernando Alba Hurtado, las sugerencias y correcciones hechas al manuscrito.

Referencias

1. Degen T, Standler E. Oviposition of carrot fly *Psila rosae* in response to foliage and leaf surface extracts of host plants. Chemoecology 1998;8:39-49.
2. Ueda K. On the drying characteristics of soil column in a microwave oven. Bulletin of the University Osaka Prefecture. Series B. Agric Life Sci 1996;48:65-67.
3. Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ, Lorente RM, Torres A. Effectiveness of microwave based digestion procedures for the demineralization of human milk and infant formulas prior to fluorometric determination of selenium. Nährung 1996;40:92-95.
4. Arellano B, Valero G. Uso del horno de microondas en la fijación de tejidos para histopatología. Memorias del XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias; 1994 octubre 9-15; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias, 1994:201.
5. Davis C, Neill S, Pushker R, Raj P. Microwave fixation of rabies specimens for fluorescent antibody testing. J Virol Methods 1997;68:177-182.
6. Kanai K, Nunoya T, Shibuya K, Nakamura T, Tajima M. Variations in effectiveness of antigen retrieval pretreatments for diagnostic immunohistochemistry. Res Vet Sci 1998;64:57-61.
7. Giberson RT, Demaree RS Jr., Nordhausen RW. Four-hour processing of clinical/diagnostic specimens for electron microscopy using microwave technique. J Vet Diagn Invest 1997;9:61-67.
8. Tanimoto T, Ohsuki Y. Evaluation of antibodies reactive with porcine lymphocytes and lymphoma cells in formalin-fixed, paraffin-embedded, antigen-retrieved tissue sections. Am J Vet Res 1996;57:853-859.
9. Robinson y Fayer. Técnica de Róbinson y Fayen. Curso de técnicas histológicas e histopatológicas. México (DF): Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional, 1991.