Procesamientos Histológicos Convencional y en Microondas: Comparación Histológica, Histoquímica e Inmunohistoquímica

Conventional and Microwave Histological Processing: A Histological, Histochemical and Immunohistochemical Comparison

Andrés Estay Freire; Roxana Parra Lara & Hugo Benítez Cáceres

ESTAY, F. A.; PARRA, L. R. & BENÍTEZ, C. H. Procesamientos histológicos convencional y en microondas: Comparación histológica, histoquímica e inmunohistoquímica. *Int. J. Morphol.*, 26(2):317-324, 2008.

RESUMEN: El horno microondas (HM) fue introducido en Anatomía Patológica en los años 80, siendo utilizado en varios procesos dentro del laboratorio. Se realizó la comparación de algunos parámetros histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos en muestras de tejido normal, procesados paralelamente de manera convencional y en HM. Se seleccionaron muestras en duplicado de diversos tejidos; se procesaron convencionalmente (PC) en un procesador automático y en HM utilizando un protocolo estandarizado previamente. Se realizaron tinciones histológicas e histoquímicas (H-E, PAS y Azul Alcian) e inmunohistoquímicas (CD45, CD3, CD20, Citoqueratinas AE1/AE3, 5/18, 20, S-100, Receptores de Estrógeno y Progesterona). Las técnicas se escogieron según tipo de tejido. Se evaluó la calidad de los preparados (tinción nuclear, tinción citoplasmática y calidad general), la intensidad de las tinciones histológicas, histoquímicas e inmunohistoquímica de marcadores escogidos. El HM posibilitó la entrega de la lámina histológica en un tiempo mucho menor que el PC, disminuyendo el tiempo de procesamiento de 12 a 1 hora. Se observó una contracción mayor en las muestras procesadas en HM que en sus pares procesadas convencionalmente: tonsila palatina (54,8% v/s 46,6%), intestino grueso (33,3% v/s 22,2%), piel (24,1% v/s 13,7%) y mama (15,1% v/s 26,3%). La calidad del corte histológico fue mayor en las muestras PC, observando en los tejidos HM una tinción menos homogénea, con agrietamientos y desprendimientos más notorios, siendo igualmente apropiadas para el diagnóstico histológico. En cuanto a las tinciones histoquímicas, no se observaron cambios significativos. Se observó una mayor intensidad de tinción inmunohistoquímica de proteína S-100 y citoqueratina AE1/AE3 en piel. Se concluyó que el HM convencional puede ser utilizado en el procesamiento de biopsias sin inconvenientes para el diagnóstico anatomopatológico.

PALABRAS CLAVE: Microondas; Procesamiento histológico; Inmunohistoquímica.

INTRODUCCIÓN

El horno microondas (HM) fue introducido en los laboratorios de Anatomía Patológica en la década de los 80. Actualmente se utiliza en múltiples procesos de fijación (Boon *et al.*, 1988; Hafajee & Leong, 2004), técnicas histológicas e histoquímicas (Boon & Kok, 1989), recuperación antigénica para inmunohistoquímica (Kumada *et al.*, 2004), descalcificación de tejidos (Keithley *et al.*, 2000), etc. Esto se basa en la cualidad del microondas de excitar y movilizar moléculas de agua, lo que permite acelerar los procesos químicos involucrados en tales procedimientos. En este sentido se ha propuesto la utilización del HM en el procesamiento histológico, en el que las moléculas de agua son desplazadas por moléculas móviles de solventes que permiten la entrada de hidrocarburos como la parafina histológica (Boon & Kok; Giberson & Demaree, 2001). El objetivo de

este trabajo fue comparar parámetros histológicos, histoquímicos e inmunohistoquímicos en muestras de tejido normal, procesados paralelamente de manera convencional y en horno HM doméstico.

MATERIAL Y MÉTODO

Se tomaron muestras en duplicado de tejido de tonsila palatina, intestino grueso, piel y mama. Las muestras fueron medidas con un calíper digital y fijadas en formalina tamponada al 10%. Se estableció como estándar el procesamiento convencional (PC) nocturno realizado en un equipo automático Leica ASP 300 y un procesamiento en horno

microondas (HM) marca LG modelo MS-3242DP (potencia de salida: 1000W; frecuencia de microondas: 2450 MHz). El protocolo del procesamiento utilizado fue estandarizado para muestras de 2mm de espesor, con una capacidad para 50 casetes histológicos de plástico. En cada cambio se utilizaron 1000cc de alcohol, xileno o parafina histológica, según correspondiera. La parafina histológica utilizada fue Paraplast © y fundida previamente a 64 ± 2 °C en una estufa Memmert UFE500. Para la manipulación de los solventes se utilizaron guantes de goma y las cubetas empleadas fueron de polipropileno. Todo el procedimiento se realizó en una campana con extracción de gases. Se midió la temperatura de cada solvente pasado un minuto de microondeo y luego de microondear. En la Tabla I se detalla el procedimiento y las temperaturas obtenidas.

Una vez realizados ambos procesamientos (PC y HM) las muestras fueron medidas nuevamente y se calculó el porcentaje de contracción para cada procesamiento en base a la medida inicial de las muestras.

Se obtuvieron cortes histológicos de 4 µm (Hematoxilina Eosina), los que fueron evaluados por dos observadores sin la información de cuál procesamiento se usó en cada lámina. Se consideraron tres parámetros: conservación nuclear, conservación citoplasmática y calidad general del corte histológico. En las muestras se consideraron además otros parámetros según tejido, a) Tonsila palatina: expresión de marcadores de membrana CD45 (linfocitos T y B), CD20 (linfocitos B) y CD3 (linfocitos T); b) Intestino grueso: tinción histoquímica para mucopolisacáridos ácidos (Azul Alcian pH 2,5) y expresión de proteínas de citoesqueleto de tipo citoqueratinas (CK 20 y 5/18, ambas marcan en intestino grueso); c) Piel: tinción histoquímica para mucopolisacáridos neutros (PAS), expresión de proteínas de citoesqueleto de tipo citoqueratina (Pan-CK, cocktail AE1/AE3) y expresión de proteína S-100 (neurofilamentos) en nervios dérmicos; d) Mama: expresión nuclear de receptores de estrógenos y progesterona.

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron con anticuerpos primarios monoclonales para CD45 (Novocastra L-RCA-RP), CD3 (Zymed Cat. 08-1102), CD20 (Zymed Cat. 08-1088, CK20 (Novocastra NCL-L-CK20), CK5/18 (Novocastra NCL-C50), pan-CK (Novocastra NCL-AE12/AE3), proteína S-100 (Zymed Cat. 18-0046), receptores de estrógeno (Zymed 1D5) y progesterona (Novocastra NCL-L-PGR_AB). Se utilizó un polímero marcado (Zymed SuperPicture Cat. 87-8963) como método de detección y DAB como revelador (Zymed Cat.00-2020). Se realizó recuperación antigénica por calor en todos los anticuerpos excepto en la proteína S100, la que no lo requiere. El medio utilizado para esto último fue buffer citrato pH 6,0.

Tabla I. Protocolo de procesamiento en horno microondas LG MS-3242DP.

Solvente	Tiempo	Potencia	t° 1 min	t° final
	hr	%	°C	°C
Alcohol 96°	0:06	80	42	68
Alcohol 96°	0:06	80		
Alcohol 96°	0:06	80		
Alcohol	0:06	80	43	70
Alcohol	0:06	80		
Alcohol	0:06	80		
Xilol	0:02	100	40	48
Xilol	0:02	100		
Xilol	0:02	100		
Parafina	0:06	20	68	68
Parafina	0:06	20		
Parafina	0:06	20		
Total	1:00			

RESULTADOS

Porcentaje de contracción. El porcentaje de contracción fue consistentemente mayor en las muestras procesadas en HM, encontrándose la mayor diferencia en mama e intestino grueso (Tabla II).

Tabla II. Porcentaje de contracción promedio en ambos procesamientos.

Tejido	% PC	% HM
Tonsila palatina	46,6	54,8
Intestino grueso	22,2	33,3
Piel	13,7	24,1
Mama	15,1	26,3

Conservación histológica. Las notas obtenidas en las preparaciones HM fueron, en promedio, 1 a 4 décimas menores que en las preparaciones PC, tanto en la evaluación de la coloración citoplasmática, nuclear y aspecto general (Tabla III). Un comentario general fue el aspecto más eosinófilo, una tinción menos homogénea, con agrietamientos y desprendimientos más notorios a la observación microscópica en las muestras procesadas en HM.

Técnicas histoquímicas. No se encontraron diferencias en la coloración de PAS en las muestras de piel analizadas, observándose una buena marcación de la lámina basal (Fig.1). En cuanto a la tinción de Azul Alcian, se observó una marcación intensa de los cálices de las células secretoras intes-

Tabla III. Notas obtenidas en evaluación histológica en ambos procesamientos (1,0 - 7,0).

Tejido	Núcleo		Citoplasma		General	
	PC	HM	PC	HM	PC	HM
Tonsila palatina	6,0	6,0	6,1	5,9	6,1	5,9
Intestino grueso	5,9	5,7	6,2	6,2	6,1	6,0
Piel	6,4	6,2	6,5	6,4	6,4	6,4
Mama	6,4	6,3	6,0	6,0	6,3	6,1

Fig. 1. Muestras de piel, tinción PAS 40x. A-Procesamiento convencional; B-Procesamiento horno microondas.

Fig. 2. Muestras de intestino grueso, tinción Azul Alcian 20x. A-Procesamiento convencional; B-Procesamiento horno microondas.

Figura 3. Muestras de tonsila palatina. Inmunohistoquímica 40x. Arriba (a, c y e) Procesamiento convencional; Abajo (b, d y f) Procesamiento horno microondas. a-b) CD45, c-d)CD3, e-f) CD20.

Fig. 4. Muestras de intestino grueso. Inmunohistoquímica 20x. Arriba (a y b) Procesamiento convencional; Abajo (c y d) Procesamiento horno microondas. a-b) CK 5/18, c-d) CK20.

Fig. 5. Muestras de piel. inmunohistoquímica CK AE1/AE3, 10x. Arriba (a y b) P. Convencional; Abajo (c y d) P. Horno microondas.

Fig. 6. Muestras de mama. Inmunohistoquímica 20x. Arriba (a y b) P. Convencional; Abajo (c y d) P. Horno microondas. a-b) Receptor de estrógenos; c-b) Receptor de progesterona.

tinales en las muestras procesadas con HM y PC. Se observó consistentemente en todas las muestras de intestino grueso procesadas en HM, que la tinción se concentró hacia la periferia del contenido secretor de las células epiteliales (Fig. 2).

Técnicas Inmunohistoquímicas. En las muestras de tonsila palatina se encontró una marcación similar para los anticuerpos de marcación linfoide CD45, CD3 y CD20 (Fig. 3). Respecto a la expresión de citoqueratinas, la expresión de CK20 y CK5/18 en las muestras de intestino grueso fue similar en ambos tipos de procesamiento (Fig 4), resultado consistente con la expresión de pan-citoqueratina AE1/AE3, en el epitelio estratificado queratinizado de la piel. En este último anticuerpo se encontró una mejor marcación del estrato basal del epitelio en las muestras procesadas en HM (Fig. 5).

En las muestras de mama se observó una expresión nuclear de receptores para estrógenos y progesterona similar en ambos procedimientos (Fig.6). Se encontró una expresión levemente más intensa para proteína S100 en los nervios dérmicos de las muestras de piel procesadas en HM.

DISCUSIÓN

La práctica anatomopatológica se ha enriquecido técnicamente en la última década, permitiendo diagnósticos más precisos y completos. En muchas de estas técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y moleculares, se ha podido introducir el horno microondas (HM) en uno o más pasos del procedimiento.

Las microondas son ondas electromagnéticas. Todos los HM de laboratorio y domésticos funcionan en 2450 MHz, frecuencia seleccionada de modo que una porción estándar de un material dado sea calentado uniformemente. Los HM proporcionan una manera eficaz de calentar muchos materiales no conductivos. Las microondas penetran el material; mientras que el calor generado es determinado por sus características dieléctricas específicas. En la mayoría de los materiales, la absorción de la microonda-energía es proporcional al contenido de agua del material. Debido a que el calor no tiene que ser conducido a través del material, sino que se genera dentro de los materiales, el microondeando reduce el tiempo necesario para calentarlos a una temperatura uniforme. Todo material se calienta por la capacidad de rotación de sus moléculas. Esta rotación produce energía bajo la forma de calor. Esto tiene implicaciones importantes para la microscopia, porque la base de muchas preparaciones de tejido es la difusión efi-

caz de líquidos dentro y fuera de secciones finas de tejido. El calor aumenta el índice de la difusión, y el microonda agrega calentamiento interno en la muestra, lo que aumenta la eficacia de esta difusión.

Pese a que el formaldehído es ampliamente utilizado en la práctica anatomopatológica, se han encontrado desventajas significativas al utilizarlo como fijador por tiempo prolongado, como contracción del tejido, lisis de una porción de células sanguíneas y disminución de la reactividad antigénica de algunos marcadores diagnósticos, debido a pérdida proteica. Boon & Kok, recomiendan un método híbrido, en el cual la postfijación se hace después de la estabilización inicial de la microonda, permitiendo una mejor difusión de fijadores en la célula, lo que disminuye el tiempo de exposición al formaldehído necesario para completar el proceso de fijación.

Se han descrito distintos protocolos de fijación en microonda para tejidos (Boon *et al.*; Boon & Kok; Giberson & Demaree), incluso hay autores que proponen realizar tanto la fijación como el procesamiento histológico utilizando el HM (Hafajee & Leong).

La parafina ha sido utilizada como medio de impregnación e inclusión por más de cien años. Su función es difundir en los tejidos cuando está derretida en aquellos lugares en que la muestra tenía agua, habiendo sido deshidratada y tratada con un líquido intermediario previamente. De manera convencional este proceso se realiza en procesadores automáticos, los que requieren de 6 a 12 horas para completarlo, dependiendo del tipo de muestra. En nuestro estudio se logró finalizar el proceso en 1 hora (Tabla I), debido a las características de la radiación microondas ya mencionadas. Las ventajas de esta disminución de tiempo en el proceso de deshidratación e impregnación, implica la posibilidad de entregar casos listos para su diagnóstico en cerca de tres horas, lo que es de gran utilidad en la práctica anatomoclínica.

El procesamiento histológico disminuye el volumen del tejido, por lo que medimos las muestras antes y después de cada procesamiento. Es bien sabido que las muestras se contraen debido a los procesos de fijación y deshidratación. Sin embargo nuestro estudio demostró que este encogimiento es mayor en las muestras procesadas en HM, evento que debe ser tomado en cuenta en la observación histológica (Tabla II). Las mayores diferencias se encontraron en mama (15,1% v/s 26,3%) e intestino grueso (22,2% v/s 33,3%). En el caso de la mama se observó que esta disminución correspondió al tejido graso, ya que se incluyeron muestras con segmentos de piel la que se observó menos afectada. En el caso de las muestras de intestino, se observó que el encogimiento se concentró en el área de las vellosidades, no en-

contrándose, sin embargo, eventos especiales en la histología, exceptuando un patrón llamativo en la tinción de Azul Alcian, la que se concentró en la periferia de las vacuolas secretoras. De esto podría inferirse un efecto de la radiación microondas en estas células, compactando su contenido mucinoso.

En la observación de las láminas H-E, los observadores no pudieron distinguir cuál correspondía a cada proceso, lo que se asemeja a los resultados de Leong & Price (2004), en cuyo trabajo las láminas obtenidas por un proceso rápido en microondas y otro convencional, fueron indistinguibles.

Se calificaron en un 80% con menor nota a las láminas H-E del procesamiento HM, aunque la diferencia no excedió las 4 décimas. Los comentarios fueron mayor cantidad de grietas y desprendimientos, y por último una eosinofilia menos homogénea. Se debe recordar que el método se estandarizó para su uso en el laboratorio de Anatomía Patológica, por lo que no se establecieron protocolos diferenciales por muestra. Es posible que, al igual que en el procesamiento convencional, las muestras reaccionen en función de la distribución de sus elementos morfológicos constitutivos.

En cuanto a las técnicas histoquímicas, no se observaron diferencias sustanciales (Figs. 1 y 2), lo que corresponde a las observaciones de otros autores (Boon & Kok; Giberson & Demaree; Morales *et al.*, 2004).

En la expresión inmunohistoquímica sólo se obtuvieron diferencias en el estrato basal de las muestras de piel, al utilizar un cocktail de citoqueratinas de alto y bajo peso molecular (Fig. 5), lo que es consistente con el trabajo de Morales *et al.*, en el que se observó una mayor expresión inmunohistoquímica en variados marcadores (CD31, CD68,

desmina y queratinas: de alto peso molecular, 7, 20 y cocktail), ensayando otros tantos, sin encontrar diferencias. En contraste con estos autores, no encontramos diferencias en el marcador queratina 20 (CK20). Emerson *et al.*, (2006), reportaron que al ensayar cerca de 30 muestras de diferentes tejidos con los anticuerpos de rutina, no encontraron diferencias en los patrones de expresión inmunohistoquímica.

Se concluyó que el procesamiento HM es una buena alternativa frente al proceso convencional, logrando una buena calidad histológica para el diagnóstico anatomopatológico. Además, reduce notablemente el tiempo de procesamiento siendo su principal ventaja. No afecta la ejecución de las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, siendo incluso beneficioso en algunos casos.

Finalmente, es importante recalcar la importancia de algunos factores que influyen en la calidad y seguridad del procesamiento: a) el grosor de la muestra no debe exceder los 2mm de espesor, grosores superiores impedirán una deshidratación eficiente y por lo tanto una impregnación adecuada; b) los solventes deben rellenarse cada vez que se procesa, ya que el volumen de los solventes disminuye aproximadamente un 10%, por procesamiento. Si el volumen de reactivo es menor a los 1000cc, la temperatura subirá más de lo requerido y podría dañar las muestras o producir accidentes, debe recordarse que los solventes son inflamables; c) es fundamental contar con una campana, aún artesanal, de extracción de gases; d) se debe utilizar cubetas de polipropileno y guantes de goma. En nuestro laboratorio de Anatomía Patológica, el uso del microondas es una realidad desde el año 1991, logrando un alto grado de reproducibilidad. Recomendamos consultar el extenso material bibliográfico disponible acerca de este método, considerado su uso de gran utilidad como alternativa o complementando la rutina de procesamiento histopatológico.

ESTAY, F. A.; PARRA, L. R. & BENÍTEZ, C. H. Conventional and microwave histological processing: A histological, histochemical and Immunohistochemical comparison. *Int. J. Morphol.*, 26(2):317-324, 2008.

SUMMARY: The microwave oven (MO) was introduced in Pathology practice in the eighties and has been used in several processes within the laboratory. It was achieved a comparison between conventional and microwave processing. Histological, histochemical and immunohistochemical parameters were observed. Samples of four kinds of tissues were taken in duplicate, and were processed on an automatic processor and into a microwave oven using a previous used protocol. H-E, PAS and Alcian Blue stains were used in addition to immunohistochemicals stains (CD45, CD3, CD20, Keratins AE1/AE3, 5/18 and 20, S-100 protein and estrogens and progesterone receptors). Techniques were chosen according to the tissue. The slides were evaluated for two blind professionals, whom considered: nuclear and cytoplasm stain, specificity and intensity of histochemical and immunohistochemical stains. MO made possible a quick delivery of the slides, shorting the time from 12 to 1 hour. Shrinking was observed to be higher in MO process than conventional process: tonsils (54.8% v/s 46.6%), intestine (33.3% v/s 22.2%), skin (24.1% v/s 13.7%) y breast (15.1% v/s 26.3%). Qualification was found lightly higher on conventional processing. No changes were observed on histochemicals stains. Higher intensity of immunostains was observed just in AE1/AE3 and S100 protein. It was concluded that MO can be used without inconveniences in the Pathology Laboratory, allowing a rapid diagnose of biopsy samples.

KEY WORDS: Microwave; Histological Processing; Immunohistochemistry.

REFERENCIAS

- Boon, M. E. & Kok, L. P. *Microwave cookbook of pathology: The art of microscopic visualization*. 2nd ed. Leiden, Coulomb Press Leyden, 1989.
- Boon, M. E.; Marani, E.; Adriolo, P. J.; Steffelaar, J. W.; Bots, G. T. & Kok, L. P. Microwave irradiation of human brain tissue: production of microscopic slides within one day. *J. Clin. Pathol.*, 41(5):590-3, 1988.
- Emerson, L. L.; Tripp, S. R.; Baird, B. C.; Layfield, L. J. & Rohr, L. R. A comparison of immunohistochemical stain quality in conventional and rapid microwave processed tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, 125(2):176-83, 2006.
- Giberson, R. T. & Demaree, R. S. Jr. *Microwave Techniques and Protocols*, Totawa, NJ., Humana Press, 2001.
- Hafajee, Z. A. & Leong, A. S. Ultra-rapid microwave-stimulated tissue processing with a modified protocol incorporating microwave fixation. *Pathology*, 36(4):325-9, 2004.
- Keithley, E. M.; Truong, T.; Chandronait, B. & Billings, P. B. Immunohistochemistry and microwave decalcification of human temporal bones. *Hear Res.*, 148(1-2):192-6, 2000.
- Kumada, T.; Tsuneyama, K.; Hatta, H.; Ishizawa, S. & Takano, Y. Improved 1-h rapid immunostaining method using intermittent microwave irradiation: practicability based on 5 years application in Toyama Medical and Pharmaceutical University Hospital. *Mod. Pathol.*, 17(9):1141-9, 2004.
- Leong, A. & Price, D. Incorporation of microwave tissue processing into a routine pathology laboratory: impact on turnaround times and laboratory work patterns. *Pathology*, 36(4):321-4, 2004..
- Morales, A. R.; Nassiri, M.; Kanhoush, R.; Vincek, V. & Nadji, M. Experience with an automated microwave-assisted rapid tissue processing method. Validation of histologic quality and impact on the timeliness of diagnostic surgical pathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 121(4):528-36, 2004.

Dirección para correspondencia:
T. M. Roxana Parra Lara, M.Sc.
Unidad de Anatomía Patológica
Hospital Regional Antofagasta
Avda. Argentina 1962
Antofagasta
CHILE

Email:chanitaparra@yahoo.com

Recibido: 08-02-2008

Aceptado: 22-03-2008