



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

**TESINA DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADA EN LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

TEMA

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA PARA
IDENTIFICAR LA EXPRESIÓN DE LA P53 EN MUESTRAS DE
ENDOMETRIO DE PACIENTES QUE ACUDEN AL LABORATORIO DE
ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE
LA CIUDAD DE LATACUNGA DURANTE EL PERIODO MARZO -
AGOSTO DEL 2014”**

AUTORA:

WENDY MARÍA ARMIJOS BOLAÑOS

TUTORA:

Lic. ELIANA MARTÍNEZ

RIOBAMBA – ECUADOR

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

**TESINA DE GRADO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
LICENCIADA EN LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO E
HISTOPATOLÓGICO**

PRESENTADO Y APROBADO ANTE EL TRIBUNAL

TEMA:

**“IMPLEMENTACIÓN DE LA TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA
PARA IDENTIFICAR LA EXPRESIÓN DE LA P53 EN MUESTRAS DE
ENDOMETRIO DE PACIENTES QUE ACUDEN AL LABORATORIO
DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG
DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD DE LATACUNGA DURANTE EL
PERIODO MARZO - AGOSTO DEL 2014”**

CONFORMADO POR:

Lic. Gisnella Cedeño

PRESIDENTE

Lic. Eliana Martínez

TUTOR DE LA TESINA

Mgc. Mary Alvear

MIEMBRO

NOTA

RIOBAMBA 2015

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Por la presente, hago constar que he leído el protocolo del Proyecto de Grado presentado por la señora **Wendy María Armijos Bolaños**, para optar el título de Licenciada en Laboratorio Clínico e Histopatológico y que acepto asesorar a la estudiante en calidad de tutor, durante la etapa de desarrollo del trabajo hasta su presentación y evaluación.



Lic. Eliana Martínez

DERECHO DE AUTORÍA

Wendy María Armijos Bolaños soy la responsable de las ideas, doctrina, pensamiento y resultados expuestos en el presente trabajo investigativo y los derechos de autoría pertenecen a la **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO**



Wendy María Armijos Bolaños
C.I. 040163206-2

AGRADECIMIENTO

A Dios, que día a día me ilumina para seguir adelante con nuestros estudios, a la Universidad Nacional de Chimborazo, a su Facultad Ciencias de la Salud, en especial a la Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico por los conocimientos adquiridos en tan prestigiosa institución. A los docentes ya que gracias a ellos hemos comprendido el verdadero valor del trabajo, a mis padres, esposo e hijos quienes son el pilar fundamental y quienes le dan verdadero sentido a mi vida.

Wendy Armijos

DEDICATORIA

A mis padres quienes me inculcaron los valores de la responsabilidad y la dedicación para cumplir con mis obligaciones. A mi esposo e hijos quienes me motivaron y siempre estuvieron allí cuando más necesitaba y realizaron de mí una persona útil para la sociedad

Wendy Armijos

RESUMEN

La presente tesis tiene como objetivo implementar la técnica de Inmunohistoquímica mediante la expresión de la proteína p53 para la determinación de hiperplasias endometriales en muestras de pacientes atendidas en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la Ciudad de Latacunga, para dar a conocer la importancia y necesidad de brindar, al médico tratante un diagnóstico específico, que permita el tratamiento y un adecuado manejo del paciente. La metodología que se utilizó para obtener los datos del análisis, consiste en el método de investigación de campo que es por medio de la recolección de muestras, registro de resultados que permiten hacer un estudio comparativo, se hizo análisis de frecuencias y ponderación de porcentajes y de esta manera se obtiene resultados que nos permitirán conocer la importancia del estudio de la expresión de la proteína p53 para diagnosticar de manera oportuna el cáncer de endometrio. Se concluye que existen una mayor cantidad de pacientes que requieren atención para un diagnóstico histopatológico en mujeres que fluctúan en una edad de 30 a 39 años, y por lo tanto constituyen las pacientes de mayor interés en descartar patologías referentes al sistema reproductor femenino. Es recomendable los controles periódicos y permanentes para evitar situaciones complejas, pues aquellos resultados no descartan que en lo posterior aparezcan cambios morfológicos celulares. Por ello se hace mucho hincapié en el planteamiento del problema, la justificación, los objetivos, la explicación detallada en el marco teórico, el establecimiento de las conclusiones y recomendaciones, que se generaron luego de recolección, análisis e interpretación de datos y resultados, con lo que se afianza profundamente la implementación de la técnica de Inmunohistoquímica mediante la expresión de la proteína p53 para la determinación de hiperplasias endometriales, lo cual estoy segura que el presente trabajo investigativo será el portador y generador de nuevas fuentes e iniciativas para otras investigaciones y una valiosísima fuente de consulta.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CENTRO DE IDIOMAS

ABSTRACT

This paper aims to implement the immunohistochemistry technique expression of p53 protein for determination of endometrial hyperplasia in samples from patients treated at the Laboratory of Pathology of the Medical Diagnostic Center DG in Latacunga City to broadcast the importance and necessity of providing, the treating physician a specific diagnosis, enabling appropriate treatment and patient management. The methodology used for data analysis is the method of field research is through collecting samples, recording results that allow a comparative study was made analysis of frequencies and percentages and weight thus results allow us to know the importance of studying the expression of p53 protein in a timely manner to diagnose endometrial cancer is obtained. It is concluded that there are a greater number of patients requiring care for histopathological diagnosis in women ranging in age from 30 to 39, and therefore constitute the most interesting patients to throw away diseases related to the female reproductive system. We recommend periodic and permanent checks up to avoid complex situations, because those results do not rule out that in the subsequent cellular morphological changes occur. Therefore it is much emphasis on the problem statement, justification, objectives, detailed explanation on the theoretical framework, the establishment of the conclusions and recommendations that were generated after collection, analysis and interpretation of data and results, with what is deeply strengthens the implementation of immunohistochemistry by expression of p53 protein for determination of endometrial hyperplasia, this research work will be the carrier and generating new sources for other research and initiatives and invaluable reference source.

Reviewed by:

Dra. Marcela Suarez



ENGLISH TEACHER

December, 10th, 2015

INTRODUCCIÓN

La patología maligna ginecológica más frecuente en países desarrollados por delante del cáncer de cérvix es el cáncer de endometrio y la segunda en países en vías de desarrollo. Generalmente este se presenta durante los años reproductivos y menopáusicos, siendo más frecuente en edades por encima de los 50. Los estudios epidemiológicos y clínicos indican que hay dos tipos distintos de esta neoplasia maligna que posteriormente se desarrollará pero cuyo concepto resulta fundamental para la comprensión de la biología molecular de estas entidades. En años recientes la inmunohistoquímica se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico histopatológico.

El presente trabajo está dividido en dos partes principales: La primera que está conformada por planteamiento, delimitación, formulación del problema, análisis de la problemática y el marco teórico, de este último tema se hace hincapié a la anatomía y fisiología del aparato reproductor femenino y a sus principales trastornos, indicando una breve introducción, concepto, causas, síntomas, patologías, diagnóstico por último un tratamiento general. En la segunda parte, se pretende explicar los métodos, técnicas de investigación, recolección, análisis e interpretación de resultados determinados por protocolos y técnicas histológicas entre las más importantes la implementación de la técnica inmunohistoquímica. Que permita un diagnóstico adecuado y una mejor interpretación histopatológica, para la determinación de hiperplasias endometriales mediante la expresión de la proteína

p53 que permite observar la inmunorreacción entre antígenos y anticuerpo de tal manera nos permita una correcta clasificación entre los diferentes tipos de cáncer endometrial y un tratamiento oportuno, especialmente para las pacientes atendidas en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Medico DG Diagnostica de la ciudad de Latacunga, las técnicas, instrumentos e información valida y confiable, que permita sustancialmente mejorar el diagnósticos histopatológico.

ÍNDICE

ROBACIÒN DEL TRIBUNAL.....	I
ACEPTACION DEL TUTOR.....	II
DERECHO DE AUTORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	IV
DEDICATORIA.....	V
RESUMEN.....	VI
SUMMARY.....	VII
INTRODUCCIÒN.....	VIII
CAPITULO I	I
PROBLEMATIZACIÒN.....	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2 FORMULACIÒN DEL PROBLEMA.....	2
1.3 OBJETIVOS.....	2
1.3.1 Objetivo General	2
1.3.2 Objetivos Específicos.....	2
1.4 JUSTIFICACIÒN E IMPORTANCIA.....	3
CAPÍTULO II	4
MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL.....	4
2.2 FUNDAMENTACIÒN TEÓRICA	4
2.2.1 Útero	4
2.2.2 Técnicas Histológicas.....	12
2.2.3 Inclusión y Formación del Bloque de Parafina.....	23
2.2.4 Microtomía (Obtención de los Cortes).....	25
2.2.5 Coloración o Tinción.....	30
2.2.6 Biología Molecular Aplicada a Histopatología	36
2.2.7 Técnica Inmunohistoquímica	40

2.2.8 Resultados.....	48
2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.....	50
2.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	52
2.4.1 Hipótesis.....	52
2.4.2 Variables.....	52
<u>2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....</u>	53
CAPITULO III	54
MARCO METODOLÓGICO	54
3.1 MÉTODO CIENTÍFICO	54
3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN	55
3.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	55
3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	56
3.4.1 Población.....	56
3.4.2 Muestra	56
3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	56
3.6.- ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	57
3.7_COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	64
CAPÍTULO IV	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
4.1 CONCLUSIONES	65
4.2 RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA.....	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Ilustración No. 2.1 Dilatación y Legrado	8
Ilustración No. 2.2 Dilatación y Legrado	9
Ilustración No. 2.3 Fijación por Inmersión	19
Ilustración No. 2.4 Procesador de Tejidos.....	25
Ilustración No. 2.5 Incrustador de Parafina	26
Ilustración No. 2.6 Técnica de Corte.....	30
Ilustración No.2.7 Técnica de Corte	31
Ilustración No.2.8 Inmunomarcación de Neutrofilos.....	40
Ilustración No.2.9 Inmunomarcación de Antígeno.....	41
Ilustración No. 2.10 Inmunomarcación de Antígeno	41
Ilustración No. 2.11 Secador de laminillas	44
Ilustración No. 2.12 Placas en la Canastilla	45
Ilustración No. 2.13 Microondas	46
Ilustración No. 2.14 Contenedor de Cubetas	46
Ilustración No.2.15 Camara Humeda Horizontal.....	47
Ilustración No.2.16 Reactivos.....	48
Ilustración No.2.17 Secador de Laminillas.....	49
Ilustración No. 2.18 Canastilla de Laminillas	50
Ilustración No. 2.19 Microondas	50
Ilustración No. 2.20 Olla de Recuperación Antígena.....	51
Ilustración No. 2.21 Camara Humeda	51
Ilustración No. 2.22 Cáncer Endometrio Positivo.....	53
Ilustración No.2.23 Cáncer Endometrio Negativo	53

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla No. 4.1. Cantidad de Ensayos Realizados.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla No. 4.2. De acuerdo a las edades de las pacientes.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla No. 4.3. De acuerdo a la prueba de Pap Test.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla No. 4.4. De acuerdo a la prueba de Hematoxilina Eosina.....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla No. 4.5. Pruebas Inmunohistoquímicas.....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla No. 4.6. Pruebas Inmunohistoquímicas de la P53 Horizontal.....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla No. 4.7. Pruebas Inmunohistoquímicas de la P53 Vertical</i>	<i>58</i>

CAPITULO I

PROBLEMATIZACIÓN.

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El cáncer uterino es el cuarto más común a nivel mundial y el primero en la población femenina, con mayor porcentaje de casos en países en vías de desarrollo. En el Ecuador según datos otorgados por Globocan se registran 2094 casos de cáncer uterino y aproximadamente 1170 de muerte a causa del mismo, el cual se ha constituido en un problema de salud pública de gran importancia, uno de ellos es el de origen endometrial, en general es diagnosticado en mujeres en la etapa pre y post menopáusica y cada vez se presentan en mujeres más jóvenes, como lo demuestran los altos índices de lesiones intraepiteliales e hiperplasias endometriales de las pacientes atendidas en el Área de Anatomía Patológica, lo cual aumenta las probabilidades de desarrollar patologías de mayor complejidad como el cáncer uterino, el desarrollo de Biología Molecular se ha constituido en una mayor atención en el conocimiento de los mecanismos celulares y un papel importante en la carcinogénesis en humanos. El Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la Ciudad de Latacunga, pretende identificar, clasificar bajo una misma categoría diagnóstica, un adecuado tratamiento y control de la paciente mediante la implementación de la Técnica Inmunohistoquímica para identificar la expresión de la proteína p53 en muestras de endometrio.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.

¿Cómo incide la implementación de la técnica de Inmunohistoquímica en la expresión de la proteína p53, para la determinación de cáncer de endometrio en las pacientes que acuden al Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la Ciudad Latacunga durante el periodo marzo - agosto del 2014”?

1.3 OBJETIVOS.

1.3.1 Objetivo General

Implementar la técnica de Inmunohistoquímica mediante la expresión de la proteína p53 para la determinación de hiperplasias endometriales en muestras de pacientes atendidas en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la ciudad Latacunga durante el periodo Marzo a Agosto del 2014”

1.3.2 Objetivos Específicos.

- Utilizar los protocolos de la cámara húmeda vertical y cámara húmeda horizontal para la determinación de la expresión de la proteína p53.
- Evaluar los casos que ameriten la realización de las pruebas Inmunohistoquímica de la proteína p53, a partir de los ensayos de hematoxilina eosina.
- Valorar el principio técnico y expresión antigénica de las de la proteína p53 en muestras de tejido fijados e incluido en parafina.
- Confrontar los reportes de los ensayos hematoxilina eosina positivos con los inmunohistoquímica mediante la proteína p53, para apreciar la calidad de interpretación de resultados, en tiempo y costo.
- Aplicar técnicas de investigación, análisis y procesamiento de datos y resultados que permitan el conocimiento exhaustivo de la problemática planteada

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA.

En los últimos años la inmunohistoquímica se ha convertido en una importante herramienta para el diagnóstico histopatológico. La técnica de inmunofluorescencia desarrollada por Albert Coons y colaboradores sentó las bases de la Inmunohistoquímica actual. Para la adecuada interpretación de los inmunorreactantes los patólogos deben de estar familiarizados con la localización celular y subcelular de los anticuerpos.

El contar con anticuerpos marcadores selectivos de cada variedad de cáncer brinda la posibilidad de poder tratar adecuadamente a cada paciente. En este contexto el diagnóstico oportuno mediante el estudio de la proteína p53 para descartar el cáncer de endometrio, se ha convertido en un objetivo importante y fundamental por parte de los profesionales y personal técnico del Laboratorio de Anatomía Patológica y con el afán de proporcionar una información diagnóstica y relevante en el tratamiento de las distintas patologías. No se trata de agregar un servicio más en el área de Anatomía Patológica, si no de proporcionar al médico tratante un diagnóstico preciso.

De ahí que radica la necesidad vital de la implementación de las técnicas Inmunohistoquímica, que no solo permitirán el estudio de la proteína p53 si no de una gran variedad de inmunomarcadores que permitan un estudio exhaustivo en los diferentes tipos de cáncer que ayudara a sustentar el diagnóstico clínico y proporcionar un tratamiento preciso y determinante en la salud del paciente.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 POSICIONAMIENTO PERSONAL

La teoría del conocimiento es lo que conlleva al trabajo de esta investigación en el cual se elaboró, basado del conocimiento del pragmatismo considerando la relación teórica de la Inmunohistoquímica y práctica como la utilización de reactivos técnicos, ensayos para alcanzar los objetivos finales de este proceso investigativo, todo ensayo de laboratorio histopatológico, relaciona el sustento científico con los aportes prácticos.

2.2 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

Las técnicas histológicas son procesos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos por medio de biopsias quirúrgicas. Mediante, obtención, fijación, inclusión, corte y tinción de los tejidos. La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a que la estructura de los tejidos está basada en la organización de los tipos de células que los componen y, salvo contadas ocasiones, las características morfológicas de las células sólo se pueden observar con estos aparatos.

2.2.1 Útero

El útero, también denominado “matriz”, es el órgano de la gestación y el mayor de los órganos del aparato reproductor femenino de la mayoría de los mamíferos, incluyendo los humanos. Es un órgano muscular, hueco, en forma de pera, sin embargo dibujos artísticos mencionan que tiene forma de una vaca¹, infraperitoneal,

situado en la pelvis menor de la mujer que, cuando adopta la posición en anteversión, se apoya sobre la vejiga urinaria por delante, estando el recto por detrás. Aloja a la blástula, que se implanta en el endometrio, dando comienzo a la gestación, que en la especie humana dura unos 280 días.

A función principal del útero es recibir al cigoto para su implantación y nutrición, por medio de vasos sanguíneos especialmente desarrollados para ese propósito. El huevo fertilizado se convierte luego en un embrión que se desarrolla en un feto, para luego nacer una cría de la especie determinada. (Botella Llusía, 1997)

El útero consta de un cuerpo, una base o fondo (Istmo), un cuello o cérvix y una boca. Está suspendido en la pelvis y se coloca con la base dirigida hacia arriba y hacia adelante, y el cuello dirigido un poco hacia atrás. Está conectado con la vagina por medio del cérvix; en cada uno de sus lados hay un ovario que produce óvulos o huevos que llegan a él a través de las trompas de Falopio. Cuando no hay embarazo, el útero mide unos 7,6 cm de longitud, 5 cm de anchura. Aunque el útero es un órgano muscular que posee un revestimiento de material glandular blando que durante la ovulación se hace más denso, momento en el cual está listo para recibir un óvulo fecundado. Si no se produce la fecundación, este revestimiento se expulsa durante la menstruación.

2.2.1.1 Regiones

El útero está formado por dos zonas distintas en forma y en función que son:

- El cuerpo uterino, al que están unidas por los lados las trompas de Falopio. Está separado del cuello uterino o cérvix por el istmo uterino.
- El cuello o cérvix uterino se comunica con el istmo en su extremo superior, mientras que el extremo inferior termina haciendo que se desplace hacia delante en la porción superior de la vagina, lo que viene en denominar seportio u hocico de tenca. El orificio cervical externo mediante el cual el cérvix desemboca en la vagina, adquiere forma diferente según la paridad, evento que puede visualizarse mediante la colposcopia, o examen cervical directo

2.2.1.2 Capas

El útero está recubierto parcialmente por peritoneo en el fondo uterino, en su porción posterior y más alta. Por los lados presenta los ligamentos redondos y por delante a la vejiga.

La pared del útero presenta a la sección tres capas de células que son de fuera a dentro:

- **Serosa o Perimetrio:** corresponde al peritoneo en la parte posterosuperior, y al tejido laxo que se extiende por los lados del útero en lo que se denomina parametrios.
- **Miometrio:** formado principalmente por tejido muscular liso. La capa más interna del miometrio es una zona de transición que se engruesa en la adenomiosis.
- **Endometrio:** es una capa mucosa y celular epitelial especializada que se renueva en cada ciclo menstrual de no haber fecundación. Es la porción derramada durante la menstruación o período a lo largo de los años fértiles de la mujer. En otros mamíferos el ciclo menstrual puede estar separado uno del otro por varios días y hasta seis meses.

2.2.1.3 El Endometrio

Es la mucosa que recubre el interior del útero y consiste en un epitelio simple prismático con o sin cilios, glándulas y un estroma. Es rico en tejido conjuntivo y está altamente vascularizado. Su función es la de alojar al cigoto blastocisto después de la fecundación, permitiendo su implantación. Es el lugar donde se desarrolla la placenta y presenta alteraciones cíclicas en sus glándulas y vasos sanguíneos durante el ciclo menstrual en preparación para la implantación del embrión humano, cuando existe una alteración.

El cáncer de endometrio

Es un tipo de cáncer que comienza en el útero. El útero es el órgano pélvico hueco en forma de pera en las mujeres donde se produce el desarrollo fetal tumor maligno que se origina en el epitelio de la mucosa que reviste la cavidad del cuerpo del útero por encima del límite superior del istmo uterino. El cáncer de endometrio comienza en la capa de células que forman el revestimiento (endometrio) del útero. a veces llamado cáncer de útero. Otros tipos de cáncer se pueden formar en el útero, incluyendo el sarcoma uterino, pero es mucho menos común que el cáncer de endometrio.

El cáncer de endometrio a menudo se detecta en una etapa temprana porque produce frecuentemente sangrado vaginal anormal, la extirpación del útero quirúrgicamente menudo cura el cáncer de endometrio.

La mayoría de las mujeres con cáncer endometrial tienen una historia de niveles elevados de estrógenos sin oposición. Una de las funciones normales del estrógeno es estimular el crecimiento del revestimiento endometrial. Un exceso de la actividad de estrógeno, en especial acompañado de insuficientes niveles del opositor natural del estrógeno, la progesterona, puede producir hiperplasia endometrial, que es un precursor de cáncer. (Hanson, 1985)

Una elevación de los niveles de estrógeno puede ser debido a:

- Obesidad, en especial 15 Kg de sobrepeso;
- Estrógeno exógeno (medicamentos)

Otras condiciones asociadas al cáncer de endometrio incluyen:

- Hipertensión arterial
- Síndrome del ovario poliquístico

Se ha notado un mayor riesgo en los siguientes casos:

- **Mujeres nulíparas;** es decir, que nunca han llegado a un embarazo;
- Infertilidad o la incapacidad de quedar embarazada;
- **Menarquia precoz,** comienzo de la menstruación a una muy temprana edad;
- **Menopausia tardía,** la cesación de la menstruación a una muy tardía edad.

Se ha notado que las mujeres con un historial de pólipos endometriales u otros crecimientos benignos del revestimiento uterino, así como mujeres post-menopáusicas que usan terapia de reemplazo de hormonas estrogénicas especialmente si no toman conjuntamente la progestina periódica y mujeres con diabetes, tienen un riesgo mayor de contraer cáncer del endometrio.

El medicamento tamoxifeno, usado para el tratamiento del cáncer de mama, puede también La mayoría de los tipos de cáncer de endometrio son carcinomas por lo general (95%) adenocarcinomas, queriendo decir que se originan de la capa única de células del epitelio que reviste al endometrio, así como también de las glándulas endometriales. Existen varios subtipos histopatológicos del carcinoma endometrial, incluyendo la forma común tipo endometriode, en la que las células cancerígenas crecen en patrones similares al endometrio normal, así como las formas más agresivas tipo seroso papilar y células claras. Algunas fuentes han propuesto que los carcinomas de endometrio sean clasificados en dos grupos patogénicos aumentar el riesgo de cáncer endometrial.

Clasificación

Tipo I: Este tipo de cáncer ocurre con más frecuencia en mujeres en las etapas pre- y peri-menopáusicas, usualmente con una historia de exposición de estrógeno sin oposición y/o hiperplasia de endometrio. A menudo son mínimamente invasivas en las profundidades del endometrio, y tienen

estadificación endometriode baja, por lo que presentan un buen pronóstico

Tipo II: Son cánceres que ocurren en mujeres en su vejez post-menopáusica, muy comunes en afroamericanas y no tienden a estar asociadas a la exposición de estrógenos. Típicamente tienen una estadificación endometriode elevada, son papiloserosos o de tipo células claras y presentan un pronóstico pobre.

En contraste a los carcinomas endometriales, el menos frecuente sarcoma del estroma endometrial es un tipo de cáncer que se origina en el tejido conjuntivo no glandular del endometrio. El carcinosarcoma uterino, antes llamado tumor muleriano mixto maligno, es un cáncer uterino raro que contienen células cancerosas tanto del tipo glandular como las de apariencias sarcomatosas en este caso el origen de las células es desconocido.

Cuadro Clínico

- Sangrado uterino anormal, períodos menstruales anormales;
- Sangrado entre los períodos normales en mujeres pre-menopáusicas;
- Sangrado vaginal y/o manchado en mujeres post-menopáusicas; en mujeres mayores de 40 años, episodios extremadamente largos, frecuentes y voluminosos de sangrado pueden indicar cambios malignos;
- Anemia, causada por la pérdida crónica de sangre, en especial si la paciente ha ignorado los síntomas de un sangrado menstrual prolongado o anormalmente frecuente
- Dolor abdominal bajo o calambres intra-pélvicos
- Dolor durante las relaciones sexuales
- Flujo vaginal blanquecino o incoloro en mujeres post-menopáusicas.

Diagnóstico

Evaluación clínica

Los chequeos de rutina en mujeres asintomáticas no está indicado, por razón de que la enfermedad es curable desde sus estadios iniciales. Los resultados de un examen pélvico por lo general salen normales, especialmente temprano en la enfermedad. Los cambios de tamaño, forma o consistencia del útero y/o sus alrededores y estructuras de soporte pueden ocurrir cuando la enfermedad está en estadios más avanzados.” Para detectar (encontrar) y diagnosticar el cáncer de endometrio, se utilizan pruebas que examinan el endometrio. Dado que el cáncer de endometrio comienza en el interior del útero, generalmente no aparece en los resultados de una prueba de Pap. Por esta razón, se debe extraer una muestra del tejido del endometrio y examinarlo al microscopio para detectar células cancerosas. Se puede utilizar uno de los siguientes procedimientos: **Biopsia de endometrio** : extracción de tejido del endometrio (revestimiento interno del útero) mediante la inserción de un tubo delgado y flexible a través del cuello uterino hasta el útero. El tubo se usa para raspar suavemente una pequeña cantidad de tejido del endometrio y extraer luego las muestras de tejido. Un patólogo observa el tejido al microscopio para verificar si hay células cancerosas.

Dilatación y legrado : procedimiento para extraer muestras de tejido del revestimiento interno del útero. El cuello uterino se dilata y se introduce una cureta (instrumento en forma de cuchara) en el útero para extraer el tejido. Se revisan muestras de tejido para observarlas al microscopio y determinar si hay señales de enfermedad. Este procedimiento también se llama.

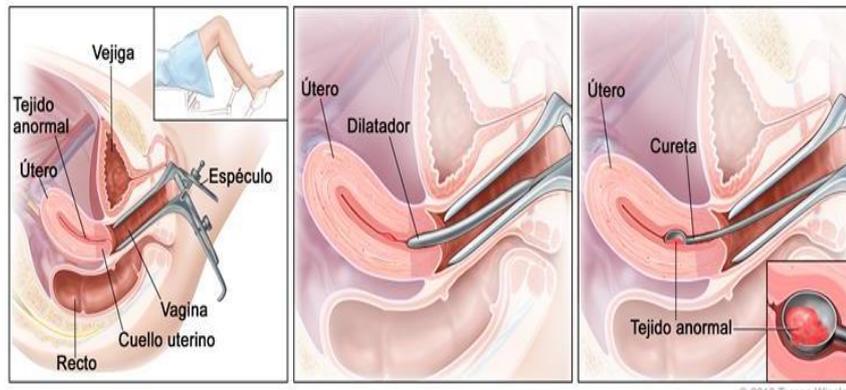


Ilustración N.- 2.1 Dilatación y Legrado

Fuente: <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR650450-750.jpg>

Dilatación y legrado Se introduce un espéculo en la vagina para ensancharla a fin de observar el cuello uterino (primer panel). Se utiliza un dilatador para ensanchar el cuello uterino (panel del medio). Se introduce una cureta hacia el cuello uterino para raspar tejido anormal (último panel).

Otras pruebas y procedimientos que se usan para el diagnóstico del cáncer de endometrio son las siguientes:

Examen físico y antecedentes : examen del cuerpo para revisar los signos generales de salud, como enfermedad, masa o cualquier otra cosa que parezca inusual. También se tomarán los antecedentes relacionados con los hábitos de salud y enfermedades y tratamientos anteriores del paciente.

Examen de ecografía transvaginal : procedimiento que se usa para examinar la vagina, útero, trompas de Falopio y vejiga. Se introduce un transductor ecográfico(sonda) en la vagina el cual se usa para hacer rebotar ondas de sonido de alta energía (ecografía) de los tejidos internos u órganos, y producir ecos. Los ecos forman una imagen de los tejidos del cuerpo que se llama ecograma. El médico puede identificar los tumores mirando el ecograma.

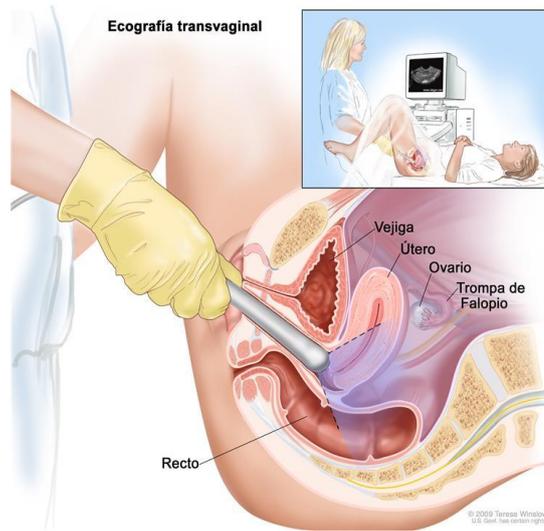


Ilustración N.- 2.1 Dilatación y Legrado

Fuente: <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR650450-750.jpg>

Ciertos factores afectan el pronóstico (probabilidad de recuperación) y las opciones de tratamiento. El pronóstico (probabilidad de recuperación) y las opciones de tratamiento dependen de los siguientes aspectos:

- El estadio del cáncer (si el cáncer está solo en el endometrio, afecta todo el útero o se diseminó hasta otros lugares del cuerpo).
- El aspecto de las células cancerosas al microscopio.

Si la progesterona afecta las células cancerosas.

2.2.2 Técnicas Histológicas

El Procesamiento histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas con unos soluciones líquidas denominadas fijadores, las cuales se usan para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización

lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, su estructura se mantendrá hasta su observación.

“La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.” (Cediel, y otros, 2009)

Obtención del material histológico

Los tejidos se pueden obtener de diferentes formas:

Biopsia:

- Biopsia excisional.
- Biopsia incisional.
- Biopsia endoscópica.
- Biopsia colposcopia.
- Punción aspiración con aguja fina (PAAF).
- Biopsia por punción con aguja gruesa (Tru-cut).
- Necropsia/autopsia).

2.2.2.1 Fijación.

Todos los tejidos, cuando se extraen de un organismo o bien cuando el organismo en el que están muere, sufren dos tipos de procesos degradativos: autólisis por acción de enzimas intracelulares, es decir, autodigestión, y putrefacción por acción bacteriana. Además, el procesamiento histológico posterior del tejido para poner de manifiesto y

observar determinadas estructuras supone una metodología que puede degradar las estructuras tisulares.

Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía en su estado vivo. Es como hacer una fotografía del tejido vivo y poder observarla, tras cierto tratamiento, con el microscopio. Así, los fijadores deben evitar la autólisis, proteger frente a ataques bacterianos, insolubilizar elementos solubles que se quieren estudiar, evitar distorsiones y retracciones tisulares, penetrar y preparar el tejido para poder llevar a cabo tinciones específicas posteriores, si es necesario. Cediél et al. (2009)

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. Incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. La elección depende de las características fijadoras que necesitemos. Por ejemplo, si queremos estudiar actividades enzimáticas debemos usar un fijador que no nos altere el centro activo de las enzimas en las que estamos interesados, y quizá para ello tengamos que sacrificar en cierta medida la morfología tisular. Si queremos estudiar la ultra estructura celular debemos usar fijadores que la preserven y que protejan a las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, y quizá esto altere su aptitud por los colorantes generales. Si queremos teñir un determinado componente celular difícilmente teñible quizá debamos usar un fijador que lo modifique para que sea reconocido más fácilmente por los colorantes.

En cualquier caso hay características de los fijadores que tenemos que tener en cuenta antes de su uso:

Velocidad de penetración. El proceso de fijación ha de ser rápido y la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es un factor determinante. Este parámetro condiciona el tamaño de la pieza que queramos fijar, más pequeña cuanto menor sea la velocidad de difusión del fijador empleado, y también determina el tiempo de fijación, mayor cuanto menor tiempo de difusión.

Velocidad de fijación. Esta característica no depende de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador.

Endurecimiento. Los fijadores generalmente endurecen los tejidos, lo cual depende del tipo de fijador y del tiempo que el tejido haya estado expuesto a él.

Ósmosis y pH. Es indispensable evitar cambios de volumen en las células producidos por una osmolaridad del fijador diferente a la del tejido. Por tanto, hay que equilibrar la osmolaridad de las soluciones fijadoras y la de los tejidos a fijar. No es necesario añadir sustancias complejas. Por ejemplo, para los tejidos de animales terrestres basta con añadir 0.9 % de cloruro sódico. Son sales que no afectan a la capacidad del fijador. Normalmente se suelen usar soluciones taponadoras a un pH semejante al del tejido e isoosmóticas con dicho tejido. Cediell et al (2009)

Efecto mordiente. Algunas estructuras tisulares son difíciles de teñir puesto que tienen poca apetencia por los colorantes. Esta apetencia puede ser incrementada con un tratamiento previo. Algunos fijadores, además de fijar, modifican químicamente a ciertas estructuras celulares para que posteriormente puedan unirse a ellas los colorantes. Este tipo de modificación química se le denomina efecto mordiente.

Artefactos. Los procesos de fijación pueden acarrear alteraciones tisulares como variaciones morfológicas, cristalización de compuestos, desplazamiento de sustancias, etcétera. Estos cambios pueden producirse por las características del fijador o por un mal uso de éste. En cualquier caso deben tenerse en cuenta para no describir como características tisulares lo que es un artefacto introducido durante la fijación.

Existen diferentes formas de fijar los tejidos dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y de lo que queramos observar. Los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos: físicos y químicos. (Badia, Sesma, & Calvo González, 2014)

Los fijadores físicos se basan o bien en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de calor elevado. Se utilizan cuando los fijadores químicos alteran las estructuras que queremos observar, cuando necesitamos una fijación muy rápida, o cuando el tipo de tejido y la técnica que usaremos lo requiera. La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares y es conveniente que sea rápida puesto que así se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destruirían la estructura del tejido. Existen variantes de esta técnica como son la criodesecación o liofilización y la criosustitución. La criodesecación parte de tejido previamente congelado al que posteriormente se le sublima el hielo, es decir, el agua pasa de estado sólido a gaseoso sin pasar por estado líquido

Al eliminar el agua se impide que se den reacciones químicas, por lo que, además de la fijación, este método preserva el tejido en el tiempo. La criosustitución también parte de tejido congelado pero en este caso se produce una sustitución lenta del hielo por una solución fijadora. Con ello se posibilita una fijación química sobre un material que no ha sufrido deterioro puesto que está congelado. Los métodos de fijación por calor no son frecuentemente usados, excepto para el estudio de microorganismos.

Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas del tejido, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación.

Hay dos métodos básicos de fijación con fijadores líquidos: inmersión y perfusión. En cualquier caso el fijador debe llegar a todas las partes del tejido lo más rápidamente posible.

Inmersión.

En el método de inmersión las piezas de tejido se sumergen en la solución fijadora. Hay que tener en cuenta algunas precauciones:

- Las piezas de tejido no deberían superar los 0.5 cm de espesor para que el fijador alcance el interior de la pieza antes de que ésta comience a deteriorarse. Esto depende de la velocidad de penetración del fijador y de las características del tejido. Por ejemplo, si tiene cavidades por donde penetre la solución fijadora el volumen podría ser mayor. (Negrete, 2006)

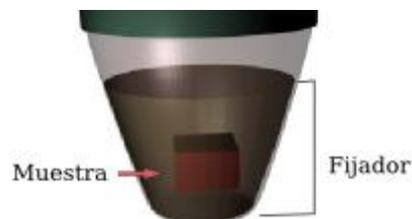


Ilustración 2.3 Fijación por inmersión.

Fuente: <http://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR650450-750.jpg>

- El volumen recomendado de fijador es 20 veces superior al volumen de la pieza.
- La osmolaridad del tejido y de la solución fijadora deben estar equilibradas.
- El pH del fijador debe ser próximo al fisiológico.
- El tiempo de fijación depende de cada tipo de fijador. Una agitación suave durante la fijación ayuda a la penetración del fijador y disminuye el tiempo.

2.- FIJADORES.

Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos como son: formaldehído, alcohol etílico, el alcohol metílico.

La acción oxidante o reductora de los fijadores le confieren a las células ciertas condiciones que posibilitan una mejor aplicación de las sustancias colorantes, por ejemplo: el Alcohol etílico absoluto conserva el glucógeno, el bicloruro de mercurio provoca que las anilinas colorean de manera más brillante a las fibras colágenas, el bicromato de potasio facilita la coloración de las mitocondrias, el ácido acético permite una mejor tinción de los núcleos, el cloruro de calcio conserva e insolubiliza parcialmente a los lípidos. Los fijadores son:

(Seco Torres, 2002)

a) **Gaseosos:** como el formaldehído

b) **líquidos:** como el ácido acético, al alcohol etílico, la acetona, etc.

c) **sólidos:** como el bicloruro de mercurio, el bicromato de potasio, etc

Condiciones de un buen fijador. Una sustancia fijadora para que ejerza de manera eficiente y adecuada sus funciones debe poseer las siguientes condiciones:

- Matar inmediatamente a las células, impidiendo la aparición de los procesos autolíticos. Para tal fin el fijador debe poseer:

Un buen poder de penetración, que en contados instantes se introduzca con rapidez en el espesor de la muestra. Un buen poder de difusión, que no fije sólo la porción superficial de la muestra sino que alcance las porciones más profundas de la misma.

- Producir cierta dureza a los tejidos sin que se provoque excesiva retracción o hacerlos quebradizos y friables.
- Debe de ser de fácil manipulación.
- No debe disolver componentes celulares.

- Que sea fácil de conseguir y que sea barato.

Las soluciones fijadoras suelen ser fijadores simples, o fijadores compuestos (mezclas fijadoras) en las que utilizan más de una sustancia fijadora. Ejemplo de fijador simple: Formol o formalina. Está considerado como la sustancia fijadora de mayor uso en los laboratorios que realizan técnica histológica. El formol comercial consiste en una solución acuosa del gas formaldehído al 39 - 40%. Se presenta como un líquido claro, incoloro, que emite vapores sumamente irritantes para las conjuntivas y la mucosa respiratoria. Su acción fijadora se ejerce coagulando las proteínas. Es un fijador que posee un buen poder de penetración y difusión. Mantiene de manera adecuada la estructura y facilita la coloración posterior de los componentes celulares y tisulares. Endurece bien las muestras. Conserva bastante bien a las grasas.

Se le emplea en una solución al 10% (10 del formol comercial y 90 partes de agua) El tiempo de fijación de las muestras, dependiendo del tamaño de ellas, debe ser de 24 a 48 horas como mínimo y si es posible, en refrigeración mezclas fijadoras que se emplean con mayor frecuencia: (Martín Lacave & Garcipia Caballero, Atlas de Inmunohistoquímica Caracterización de Células, Tejidos y Organos, 2012)

Formol - fosfato (formol tamponado):

- solución de formaldehído (37% a 40%) —————→ 100 ml
- agua destilada —————→ 900 ml
- fosfato de sodio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$) —→ 4.0 gr
- fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) —————→ 6.5 gr

Es un buen fijador de uso rutinario. Tiene un buen poder de penetración y de difusión. Ofrece resultados satisfactorios con ciertos tricrómicos como el de Masson. Pueden fijarse piezas de un centímetro de grosor y dos o tres centímetros de longitud. Se le emplea con resultados óptimos en la fijación de embriones y fetos pequeños

pues ejerce cierto poder descalcificante. Dependiendo del volumen de la muestra, el tiempo de fijación será de 12, 24 a 48 horas.

2.2.2.1.1 Criterios para obtener una Buena Fijación.

- a) **Elección del fijador.** La solución fijadora a utilizar depende del estudio que se quiere realizar. Para las preparaciones de tejidos y órganos, en las que interesan un estudio topográfico de los mismos, deben usarse fijadores con un buen poder de penetración y de difusión. Para estos casos se recomienda utilizar los líquidos de Zenker, Bouin o Helly: En caso contrario se empleará la solución de formol al 10% ó 15% que permite obtener resultados satisfactorios. Líquido considerado como el “fijador universal” pues facilita el empleo posterior de cualquier otro fijador
- b) **Tamaño de las muestras.** El tamaño y grosor de las muestras deben ser pequeños y delgados, de 1 cm² a 2 cm² y con un espesor de 2 mm a 5 mm, especialmente si se emplean fijadores con escaso poder de penetración y de difusión.
- c) **Volumen del fijador.** Una proporción que es necesario emplear será de 1 a 20 (muestra – fijador). Será la más adecuada para garantizar una buena fijación.
- d) **Tiempo de fijación.** El tiempo en la fijación es importante en dos aspectos.

El intervalo que media entre la interrupción del aporte sanguíneo y la inmersión de las muestras en la solución fijadora. Lo deseable es que las muestras se fijen inmediatamente después de obtenidas mediante una biopsia o que la necropsia se efectúe al poco tiempo de producida la muerte. Mientras más largo es este lapso, los procesos autolíticos que sufran los tejidos serán más evidentes.

Debe tenerse en cuenta el tiempo que permanecerán las muestras sumergidas en los fijadores. Este tiempo varía con relación al tipo de Fijador que se utiliza; al tamaño y la naturaleza de la muestra y la temperatura de fijación. Por lo tanto los lapsos de

fijación varían en rangos muy amplios. En cualquier circunstancia, siempre deben respetarse los tiempos recomendados para cada tipo de fijador para garantizar la conservación de una buena estructura celular y tisular de los tejidos.

Temperatura de la fijación. Es recomendable efectuar la fijación a bajas temperaturas (40° C.) dentro de un refrigerador y con la solución fijadora enfriada previamente. Este procedimiento retardará el tiempo de fijación pero disminuirá de manera notable la autólisis de los tejidos.

Deshidratación

El exceso de fijador al momento de la infiltración, incluso en la microtomía, podría afectar los cortes histológicos, y por ello se debe lavar.

La deshidratación se hace empleando diferentes soluciones de alcohol de concentración creciente. Los deshidratadores más usados son el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo. En el caso de la inclusión en parafina, las muestras se en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico. El procedimiento de rutina es el siguiente: (Vázquez Nin & Echeverría, 2000)

- 1) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 2 horas.
- 2) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 2 horas.
- 3) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 1 hora.
- 4) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 1 hora.
- 5) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 1 hora.
- 6) alcohol etílico al 100 % (absoluto) ----- 1 a 1.5 horas.

Nota: En cada caso es necesario agitar de vez en cuando los frascos que contienen las muestras. Los tiempos indicados son los que se aplicarán a las muestras de tamaño

mediano (1 cm² x 0.5 cm. de grosor). Los tiempos pueden disminuirse o incrementarse si las piezas son más pequeñas o más grandes. “La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador. La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador muestran un aspecto turbio blanquecino.” Vázquez et al. (2000)

Aclaramiento

Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina. Estas se denominan líquidos diafanizadores o intermediarios. Ejemplos: xilol, tolueno, neo-clear, benceno, y el cloroformo. El líquido diafanizador de uso más frecuente es el xilol. La actividad aclaradora o diafanizadora del xilol se emplea también en el procedimiento de coloración.

La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes:

El procedimiento de diafanización; se realiza de la siguiente manera:

8) neo-clear ----- 1 hora

9) neo-clear ----- 1 hora

En este paso se sustituye el alcohol por un disolvente de parafina. El más usado es el xilol (xileno) o sustituto del xileno (neo - Clear) ya que como la muestra está deshidratada, el xilol entrará hasta lo más profundo del tejido. También el tejido pierde color y adquiere un tono acaramelado. Nota: las muestras deben agitarse continuamente para permitir la renovación del líquido.

Infiltración

En este paso la muestra se coloca en parafina líquida, cabe mencionar que se debe usar parafina histológica. Como se ha dicho en el paso anterior el tejido está completamente lleno de xilol, ahora debido a ósmosis sale el xilol y entra la parafina.

La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas. Los tiempos se establecen de acuerdo al tipo de disolvente.

1 hora Neo-Clear® 1 hora Histosec® o parafina (60°C) 2 horas Histosec® o parafina (60°C) 3 horas Si las muestras están impregnadas de parafina, se vierten e incluyen en moldes adecuados.

“Las muestras incluidas en parafina (bloques) se almacenan en lugar refrigerado, ya que esto mejora la capacidad de cortado. El calentar la cuchilla mejora también la capacidad de cortado.” (Castillero, 2001)



Ilustración 2.4 Procesador de Tejidos
Fuente: Tissue-Tek® Rotary Tissue Processo Centro Medico Diagnosticas

2.2.3 Inclusión y Formación del Bloque de Parafina.

Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión. Estos oscilan entre 40o y 60o C. La parafina hierve a 300o C. y emite vapores que son muy inflamables.

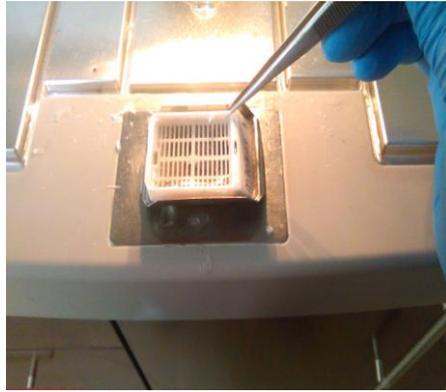


Ilustración 2.5 Incrustador de Parafina
Fuente: Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

Las parafinas se clasifican en:

Blandas

Tienen un punto de fusión de 45o C - 52o C. Son recomendables para incluir tejidos en los se detectarán antígenos mediante inmunohistoquímica.

Semiduras.

Sus puntos de fusión son de 54 o C - 58° la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza técnica histológica. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 de m.

Duras.

Tienen un punto de fusión de 60o C - 65° Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas. La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentre en estado líquido. En el comercio las parafinas se expenden en forma de bloques discoidales, escamas, tabletas rectangulares o en forma de grumos pequeños. Las parafinas, se disuelven usando estufas que las mantienen en ese estado. Las estufas permanecen a una temperatura constante, generalmente de 2 o C a 4o C por encima del punto de fusión de la parafina a emplear. La inclusión o formación del bloque de parafina se efectúa empleando moldes de diversos materiales y diferentes áreas y profundidades. Pueden ser de papel, metal o plástico. El bloque de parafina debe contener la muestra

correctamente se llena con parafina caliente pura orientada para facilitar la obtención de las secciones o “cortes”.

El molde elegido; con una pinza calentada en un mechero se toma una pieza de tejido del tercer recipiente y se orienta una de sus superficies (aquella que se pondrá en contacto con el filo de la navaja) se sumerge al interior del molde, en el que la parafina ha empezado a solidificarse y se le aplica una leve presión. Después los moldes se enfrían de inmediato (se sumergen en agua fría o se introducen en el refrigerador) para que la parafina se solidifique de manera homogénea. Todos los procedimientos mencionados, desde la deshidratación hasta la infiltración en los dos o tres recipientes de parafina líquida, se pueden efectuar de manera automática. Existen una serie de “procesadores automáticos” que facilitan estas tareas. Igualmente existen instrumentos que contienen parafina fundida que la dispensan a voluntad del usuario para luego formar los bloques. Tienen anexos a ellos áreas o superficies que se mantienen calientes o frías, con la finalidad de orientar correctamente las piezas de los tejidos y posteriormente producir el enfriamiento rápido, la solidificación de la parafina y la formación del bloque.

2.2.4 Microtomía (Obtención de los Cortes).

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes. Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma más o menos automática, seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan “micrótomos” El sistema de funcionamiento de los micrótomos consta de cuatro mecanismos principales:

- Sujeción del bloque de parafina.
- Sujeción de la navaja.

- El que permite que el filo de la navaja seccione al bloque en cortes delgados y de grosor uniforme.
- El de avance del bloque en un número determinado de micrómetros después que se ha obtenido un corte.

Los micrótomos se clasifican de acuerdo a la manera como se desplaza el bloque que contiene el tejido incluido; así, existen:

1.- Micrótomos de rotación tipo Minot.

Mediante una manivela circular denominada volante, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina se desplaza frente al filo de la navaja, de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical.

Los micrótomos tipo Minot son los de uso más frecuente en cualquier laboratorio donde se realiza técnica histológica, especialmente cuando los tejidos están incluidos en parafina. Los micrótomos de deslizamiento, en cambio, se emplean cuando los tejidos están incluidos en celoidina o cuando la inclusión en parafina contiene porciones voluminosas de tejidos y órganos. Los micrótomos tipo Minot permiten obtener secciones delgadas, del orden de 4 a 7m de espesor. Producen cortes seriados, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja. (Rolls, 2010)

Los cortes seriados se emplean cuando se desea realizar reconstrucciones tridimensionales del órgano procesado, cuando se requieren comparar secciones vecinas, del tejido u órgano, coloreadas por diversas técnicas de tinción o cuando se hace el estudio microscópico topográfico en embriones y fetos.

Existen dos condiciones indispensables que garantizan la obtención de secciones delgadas, uniformes y seriadas:

- a) Que la deshidratación, impregnación e inclusión hayan sido realizadas correctamente.
- b) El empleo de una navaja o cuchilla muy bien afilada y asentada y que el filo de la misma ofrezca la inclinación adecuada hacia la superficie del bloque.

Las navajas o cuchillas de microtomía requieren de un afilado y un asentado muy cuidadoso, pues el mantenimiento del filo de ellas depende que se obtengan, con éxito, buenos cortes. Las navajas se afilan utilizando afiladores automáticos que efectúan la operación en forma rápida y garantizan un afilado uniforme. Efectuado el afilado de las cuchillas, éstas deben limpiarse prolijamente, pues cualquier partícula de abrasivo que se quede adherido al filo de la navaja lo dañará y también al tejido, durante la microtomía. En la actualidad se expenden en el mercado cuchillas descartables. Se venden en gran cantidad, generalmente por cientos, son relativamente baratas. Se emplean para obtener algunos cortes y luego se descartan. Ofrecen dos ventajas: no se requiere afilarlas y siempre el usuario tendrá un instrumento bien afilado. Obtención de los cortes. Para alcanzar este propósito se deben seguir los siguientes pasos: (Rolls, 2010)

- a) Sujetar firmemente el bloque con el sistema de abrazaderas y la muestra orientada correctamente.
- b) Alinear el sistema de sujeción de la navaja y el filo de la misma, con la superficie de corte del bloque.
- c) Desgastar la superficie del bloque de parafina hasta alcanzar el tejido y se tenga la certeza de abarcar toda el área que se desea seccionar.
- e) Marcar en el dial del micrótopo, el número de micrómetros de grosor que deben alcanzar los cortes.

e) Accionar la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes (aislados o seriados). Obtenidos los cortes se recogen cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos.

2.- Micrótomos de deslizamiento.

El movimiento que se realiza para obtener los cortes es horizontal, es decir de atrás hacia adelante y viceversa. Generalmente mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza y a la navaja permanece estática.

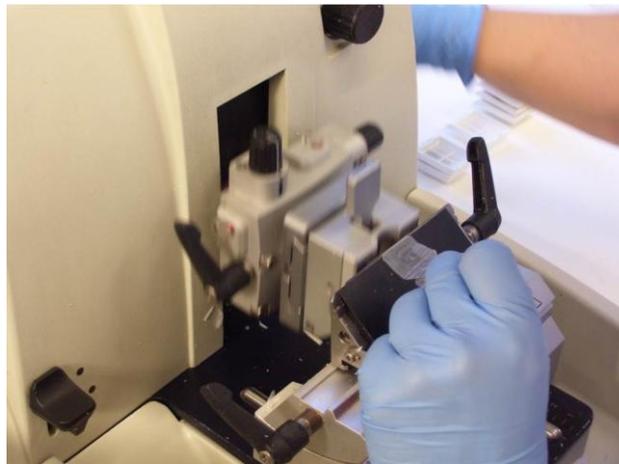


Ilustración 2.6 Técnica de corte: Micrótomos cinta transportadora:
Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

Cinta transportadora, Baño de Extensión y adhesión de los cortes al portaobjetos. Los cortes obtenidos, aislados o en forma de cintas, generalmente se presentan arrugados y muestran un área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que es necesario extenderlos y luego adherirlos a las láminas portaobjetos (esto facilita su manipulación posterior). Los cortes se extienden al depositarlos sobre la superficie del líquido extendedor contenido en un recipiente denominado “baño de flotación” (éste mantiene la temperatura entre 40o a 45o C). Las secciones se depositan en el líquido procurando que la superficie brillante (aquella correspondiente al filo de la navaja) se ponga en contacto con el líquido caliente. En caso que ciertas arrugas

persistan, se emplean unas pinzas finas o un pincel de pelo de camello, para ejercer una ligera tracción entre los extremos de los cortes y así desarrugarlos totalmente.



Ilustración 2.7 Técnica corte: Baño de flotación
Fuente: Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

Las secciones se extienden aisladas o formando cintas, estas se recogen y adhieren al portaobjetos de la misma forma; en el caso que se requiera recoger los cortes aislados, extendidos previamente como una cinta, deben separarse utilizando las mismas pinzas finas o agujas de disección. (Gómez, 2001)

Para garantizar una mejor adhesión de los cortes a los portaobjetos, se recomienda incorporar sustancias adherentes al líquido extendedor o, en ciertos casos, al portaobjetos. Estas sustancias suelen emplearse de dos maneras:

a) Extensión previa de la sustancia adherente a una de las superficies de la lámina portaobjetos, por ejemplo, la albúmina de Mayer, constituida por partes iguales de glicerina y clara de huevo, a la mezcla se le añaden algunos cristales de timol como ingrediente conservante. La mezcla se filtra y se guarda en refrigeración. Se le utiliza extendiendo una gota de la mezcla en el portaobjetos y se deja secar. Los cortes se recogen cuidadosamente sumergiendo, por debajo de ellos, el portaobjetos en forma oblicua. Otra sustancia adherente que se emplea de la misma manera es la poli-L-lysina (solución de 25 miligramos de la sustancia en 25 ml de agua destilada). Una gota de la solución se extiende en el portaobjetos y éstos se secan a 50° - 55° C. durante toda la noche y está lista para su uso. Al líquido de flotación se le añaden sustancias adherentes. Uno de los procedimientos más sencillos es el que consiste en

disolver, en el agua ya caliente del baño de flotación (dos litros) 0.5 g de gelatina. En otros casos se emplea una solución que posee los ingredientes siguientes:

- agua destilada ----- 1,000 ml
- bicromato de potasio----- 0.2 gramos
- gelatina ----- 0.2 gramos

El agua destilada se calienta a 60o C para disolver en ella la gelatina y el bicromato de potasio, sucesivamente. Se filtra y está lista para su uso.

Este líquido previamente filtrado se puede utilizar varias veces. (Se recomienda guardarlo en el refrigerador). Recogidos los cortes, éstos aún se pueden orientar aprovechando de la capa de líquido que queda entre el portaobjetos y los cortes. Posteriormente las láminas se apoyan en forma oblicua para que escurra el líquido sobrante y luego se colocan horizontalmente dentro de una estufa o encima de una plancha caliente (a 50o C aproximadamente). Después de unas 3 a 4 horas, el líquido se habrá evaporado totalmente y la sustancia adhesiva unirá firmemente el corte al portaobjetos.

2.2.5 Coloración o Tinción.

Los cortes de los tejidos adheridos a los portaobjetos están listos para ser coloreados. El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante. Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora.

El proporcionar color a las estructuras que constituyen un tejido o un órgano se hace con la finalidad de distinguirlas entre sí y facilitar su observación. Si se examina al microscopio una sección de tejido sin colorear, ya adherida al portaobjetos, se podrá constatar que no es fácil discernir sus componentes, pues lo delgado de los cortes y la diafanización producida en los tejidos igualan sus índices de refracción. La coloración proporciona diferencias evidentes entre las estructuras y al observar los cortes será fácil reconocerlas.

Se denomina sustancia colorante a aquella que puede transferir su color a otro cuerpo. Teoría de la coloración. Existen dos teorías que explican el procedimiento de la Coloración.

2.2.5.1 Teoría física.

Considera que la coloración es un proceso físico de absorción. Así, las partículas de las sustancias colorantes disueltas penetran en los espacios intra e intercelulares en los que se mantienen adheridas en razón de la cohesión molecular. Por ejemplo, la coloración de las grasas o lípidos es una tinción por absorción.

2.2.5.2 Teoría química.

El colorante se une a la sustancia coloreable combinándose con ella íntimamente debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares o tisulares que se unen respectivamente a los cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles.

Una prueba de ello es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aun empleando sus líquidos solventes. De acuerdo a esta teoría los colorantes se unen (ligan) a los tejidos por enlaces iónicos, covalentes o de hidrógeno. El enlace iónico o electrostático ocurre cuando el colorante y la sustancia que se va a teñir, desarrollan diferentes cargas eléctricas y entonces se atraen una a la otra, por ejemplo, el citoplasma se colorea porque las proteínas citoplasmáticas poseen carga eléctrica (+) y las partículas del colorante tienen carga eléctrica (-).

Clasificación de los colorantes.

Existen varios criterios para clasificar a los colorantes:

a) Por su origen. Pueden ser naturales y artificiales (sintéticos)

Colorantes naturales, se extraen de:

1) Animales. Como el carmín, que se extrae de la cochinilla, artrópodo parásito de los tallos del nopal (tuna). El carmín (de color rojo intenso) es uno de los colorantes naturales más empleado en la industria alimentaria y cosmética.

En técnica histológica se utiliza el carmín de Best para demostrar glucógeno, el carmín de Mayer para demostrar mucina; las células fagocíticas se evidencian con el carmín de litio (colorante vital).

2) Vegetales. “Como la hematoxilina, obtenida de la corteza de un árbol, el “palo de Campeche” (*Haematoxylum campechanum*), la safranina que se extrae de una liliacea (pistilos de la flor de azafrán) o la orceína que se obtiene de un liquen”.

Colorantes artificiales o sintéticos. Son productos derivados de la destilación de la hulla o carbón. Genéricamente se les conoce como colorantes derivados de la anilina.

Los colorantes artificiales son sales. Son compuestos orgánicos formados por las modificaciones que experimenta el anillo bencénico cuando se reemplazan dos átomos de hidrógeno por un átomo de oxígeno o con otro átomo o por un grupo químico que tenga enlaces de doble valencia en vez de uno, dando como resultado un compuesto coloreado. La anilina es incolora, pero las modificaciones químicas producidas en el anillo bencénico le confieren, a los compuestos nuevos, un color determinado.

Los colorantes artificiales y sintéticos se clasifican en:

a) Ácidos: son sales cuya parte básica es incolora y el componente ácido posee color. Así, en el colorante eosina o eosinato de sodio, la propiedad colorante se debe al ácido eosínico y no a la base, el sodio. Los colorantes ácidos tienen carga eléctrica negativa, por lo tanto la designación correcta es la de colorantes aniónicos. También se les conoce como colorantes citoplasmáticos, pues tiñen al grupo químico, cargado eléctricamente, localizado en un extremo de la cadena de aminoácidos que integran las proteínas citoplasmáticas.

Las sustancias que atraen eléctricamente a los colorantes ácidos se denominan “acidófilas” y químicamente están constituidas por componentes básicos o alcalinos. Ejemplos: la eosina, el amarillo de metanilo, la fucsina ácida, el ácido pícrico, el verde rápido, el naranja G, la safranina, el azul de anilina. (ARENAS, 2010)

b) Básicos. Son sales que poseen la base coloreada e incolora la porción ácida; por ejemplo, el azul de metileno o clorhidrato de azul de metileno, debe su propiedad colorante a la base azul de metileno y no al ácido clorhídrico que es incoloro.

Poseen una carga eléctrica positiva, por lo tanto son colorantes catiónicos. Se les denomina también colorantes nucleares, pues tienen afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Las sustancias teñidas por los colorantes básicos se denominan “basófilas” y están

constituidas por componentes ácidos. Ejemplos: la hematoxilina, el rojo nuclear, el azul de metileno, la tionina, el azul de toluidina, la fucsina básica.

c) Neutros. Son sales en las que tanto la parte básica como la parte ácida proporcionan color. Por ejemplo el eosinato de azul de metileno o el eosinato de azul de metileno.

Estos colorantes tienen la propiedad de teñir de manera simultánea, a los componentes nucleares y a los citoplasmáticos, inclusive pueden proporcionar colores distintos (metacromasia) a determinados componentes citoplasmáticos como las granulaciones específicas.

Los antígenos de los tejidos y células se pueden detectar en un proceso de etapas; la unión del anticuerpo primario a los epítomos específicos y la consecuente detección.

Inmunohistoquímica

Las pruebas inmunohistoquímicas corresponden a un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos. Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.

La inmunohistoquímica, o IHC, es un procedimiento especial de coloración con tinta que se realiza sobre tejido. Corresponde a un grupo de:

“Técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos de unirse específicamente a los correspondientes antígenos.” (Martín Lacave & García Caballero, 2012)

Esta reacción es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración. Las técnicas inmunohistoquímicas enzimáticas permiten una localización más precisa de las reacciones, ya que la tinción

es permanente, estable, puede contrastarse y puede ser evaluada con microscopio de luz. El material así estudiado puede archivarse por años sin pérdida de la intensidad de la reacción. Los anticuerpos monoclonales han permitido aumentar la especificidad, sensibilidad y gama de esta técnica. Desventajas existen: presencia de reacción inespecífica, especialmente cuando se utilizan anticuerpos policlonales, algunos reactivos son potencialmente carcinógenos y su manipulación debe ser cuidadosa, requieren estandarización precisa y estricto control de calidad. Existen diversos tipos de técnicas, cuya indicación dependerá del anticuerpo a utilizar (monoclonal o policlonal), material disponible (fresco, congelado o fijado en formalina) y antígenos a estudiar (de superficie o membrana, citoplasmáticos o nucleares).

Estas técnicas necesitan de controles internos o paralelos, usualmente positivos y negativos. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario. Existen sistemas automatizados que permiten la tinción de un gran número de casos simultáneamente con la ventaja de pasos definidos y estandarización de las variables usuales con costo relativamente bajo y en mucho menor tiempo.

La inmunohistoquímica tiene utilidad diagnóstica en identificación de diferenciación y de marcadores pronósticos de neoplasias (marcadores tumorales). Por ejemplo, es posible la identificación de los productos de oncogenes y de genes supresores de tumores con anticuerpos monoclonales, especialmente contra c-erbB-2, bcl-2, p21, Rb1 y p53; la identificación de marcadores de diferenciación como HMB-45 para melanocitos (melanoma), AE1 para carcinomas, vimentina para sarcomas y CD45 para leucocitos (linfomas). Un elemento importante a considerar es la óptima preservación del tejido y por ende de los antígenos. La mayoría de los antígenos se conservan adecuadamente después de la fijación en formalina e inclusión en parafina. Algunos son más lábiles y sólo se detectan en cortes de congelación.

Uno de los problemas actuales con estas técnicas no es la técnica en sí, manual o automatizada, o la posibilidad de acceder a los numerosos anticuerpos existentes, sino la interpretación de los resultados. Los errores de interpretación disminuyen a nivel aceptable cuando el patólogo y sus colaboradores tienen experiencia en estas técnicas y los resultados se analizan a la luz de los demás hallazgos clínico-patológicos.

Las displasias del cérvix, conocidas desde hace años, como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y el carcinoma infiltrante del cuello uterino (CC),

están relacionados con el virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo (1, 2). El VPH interfiere en el ciclo celular lo que provocará cambios en oncogenes, y terminará produciendo pérdida de la heterocigosis, así como pérdida de regiones cromosómicas específicas. Estas evidencias, parecieran señalar el probable papel de algunos genes supresores de tumores en la génesis del CC (3-5). La expresión de diversas proteínas dependientes de genes en el epitelio cervical, puede ser evaluada a través de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ). Mediante esta técnica, se han examinado proteínas como p53, bcl2, C-Myc, Ki 67, Ciclinas, P16 INK4a, p21, p27, b-catenina y MCM en NIC y en CC. Algunos resultados de estas investigaciones han creado expectativas entre quienes aspiran lograr evidencias para precisar el pronóstico de NIC y del CC y su relación con el VPH

La proteína oncosupresora p53 se sabe que funciona como guardián de la integridad del genoma de la célula huésped y está encargada de que el ciclo celular progrese tras comprobar que el genoma está intacto. La proteína p53 es producto del gen P53 y ante cualquier daño del ADN, se expresará como consecuencia del freno del ciclo celular a través de p21, un inhibidor del ciclo que provoca fallas en los mecanismos de proliferación celular y en la apoptosis. La muerte celular programada en la infección por VPH, es interferida a través de p53 por el encogen E6 por el bloqueo del ciclo celular inducido por el inhibidor de la cinasa dependiente de la ciclina p21 y por Bax. Bax es una proteína proapoptótica presente en los epitelios indiferenciados que también puede ser degradada por E6 a través de la ubiquitina (6). Se sabe que p53 es inactivada por la oncoproteína supresora del VPH E6, la cual se une a la proteína p53, y promueve su degradación, por lo que su función se altera durante la infección con VPH de alto riesgo, sin que se produzca una verdadera mutación del gen (7-9). La proteína p53 no se expresa en el epitelio cervical normal. No siempre se observa inmunomarcaje para la proteína p53 en CC, y la experiencia nuestra en este sentido, ha sido similar a la de otros investigadores (10); sin embargo algunos consideran que la presencia de p53 se incrementa con los grados de NIC y con la malignidad, por lo que han planteado que esta proteína debería detectarse en el CC (11-13). Según otros investigadores, a pesar de

que la infección con VPH de alto riesgo es la responsable de la sobreexpresión de p53, la expresión de esta proteína no puede considerarse como un factor de valor pronóstico (14), y finalmente, para otros, no pareciera existir ninguna relación directa entre la positividad para VPH y el inmunomarcaje para proteína p53.

2.2.6 Biología Molecular Aplicada a Histopatología

Este conjunto de técnicas, que han sido tomadas tanto de la genética molecular como de la bioquímica, nos permite analizar fenómenos biológicos y patológicos en el nivel molecular. Al igual que la microscopía electrónica y la inmunohistoquímica, estas técnicas pueden aplicarse para refinar el diagnóstico en Anatomía Patológica.

Pueden enumerarse las siguientes técnicas: hibridación in situ, reacción en cadena de polimerasa (PCR), in situ-PCR, análisis de polimorfismo de fragmentos de restricción, Southern blot, Western blot y Northern blot. Todas las técnicas mencionadas pueden aplicarse al material obtenido por biopsia, autopsia e incluso muestras citológicas. (Montenga Badia, Ruiz, & Clavo González , 2009)

La técnica de Southern blot permite el análisis de ADN genómico o fragmentos definidos de ADN después de digestión con endonucleasas de restricción. La técnica de Northern blot permite estudiar ARN en forma análoga. El Western blot es una técnica inmunológica derivada, que se utiliza para analizar antígenos proteicos. Las proteínas se separan mediante electroforesis y se transfieren a una membrana sólida o membrana o filtro. La membrana se incuba con anticuerpos, los que se detectan ulteriormente con sondas marcadas radioactivamente o con enzimas.

.2.6.1 Antígenos

Se entiende como antígeno (Ag) cualquier molécula que puede ser reconocida específicamente por cada uno de los componentes del sistema inmunológico. En un sentido más estricto, el antígeno es cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos específicos y la activación de linfocitos T, también precisos

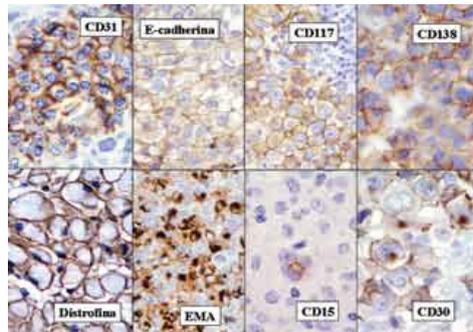


Ilustración 2.8 Inmunomarcación de membrana: CD31 en células Plasmáticas reactivas

Fuente: Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

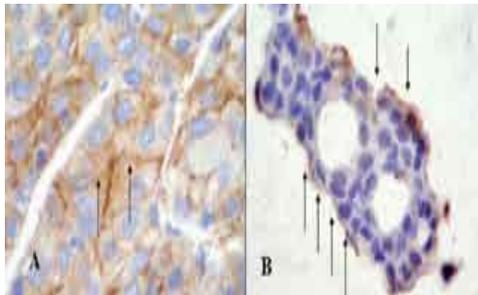


Ilustración 2.9 Inmunomarcación con antígeno

Fuente: Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

2.2.6.2 Los anticuerpos: (Ac) también conocidos como inmunoglobulinas, son glicoproteínas que forman el organismo como respuesta al contacto con un antígeno y que reaccionan específicamente. La síntesis de los anticuerpos se produce en los linfocitos B que al entrar en contacto con el antígeno Ag se activan transformándose en las células plasmáticas.

2.2.6.3 Expresión Nuclear:

“Existen diversos anticuerpos dirigidos contra las proteínas o enzimas nucleares. La mayor parte de los antígenos nucleares incluye a proteínas asociadas al ciclo celular, proteínas reparadoras de genes, enzimas nucleares, factores de transcripción, productos de genes supresores tumorales, receptores de hormonas

esteroides, proteínas ligadoras de calcio, y algunas proteínas virales nucleares”
(Hidalgo, 2007)

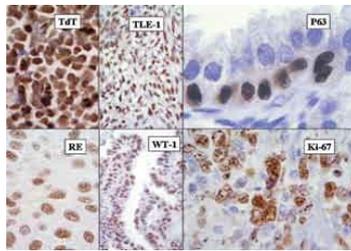


Ilustración 2.10 Inmunomarcación nuclear.

Fuente: Tissue-Tek® Tec Centro Medico Diagnostica

2.2.6.4 Expresión Citoplásmica

“El citoplasma contiene diversos orgánulos y una red de estructuras que forman el citoesqueleto (microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos) responsable de la forma, rigidez, transporte intracelular y de la movilidad celular.” (Buys DL, 2007)

Los antígenos citoplasmáticos muestran tres patrones de tinción: granular, difuso y fibrilar.

2.2.6.5 Desenmascaramiento de Antigénico

Con la aparición del sistema de desenmascaramiento antigénico propuesto por Huang (12) en 1976 mediante procedimientos enzimáticos, con digestión con proteasas en el material fijado en formol e incluido en parafina, volvió a estimularse la práctica de dicha técnica. El mecanismo de actuación de las proteasas es poco conocido pero parece que eliminan o rompen los enlaces los enlaces producidos durante el proceso de la fijación. (García Bermeo, 2006)

Las proteasas más utilizadas son la tripsina, la pronasa, la neuraminidasa, beneficiando algunos anticuerpos con este tratamiento, aunque existen una serie de inconvenientes, como la optimización de la proteasa utilizada, su concentración, el tiempo de actuación la temperatura.

elección de la proteasa se realiza muchas veces de forma empírica, siendo los resultados obtenidos distintos según su tiempo de actuación , produciéndose anticuerpos en tiempos prolongados digestión y arte actuación de la estructura tisular , los resultados de la técnica se modifican según la concentración de la proteasa , el pH de la solución y otros factores como el tiempo de fijación en formol(tejidos fijados más de 48 horas presentan resultados muy irregulares y escaso desenmascaramiento estos problemas , junto con la escasa cantidad de anticuerpos que se beneficiaban , obligo a buscar otros sistemas de desenmascaramiento. (G-R, 2005)

Desenmascaramiento Antigénico Mediante Calor

Aprovechando q las proteínas fijadas en formol no se desnaturalizan con altas temperaturas (100 °C) .La gran mejora de intensificación de la reacción, el aumento del número de anticuerpos que se pueden utilizar en el material fijado en formol (sobre todo antígeno de superficie y nucleares), su fácil manejo y estandarización hace que este método sea el más utilizado actualmente, pasándose a denominar como técnica de recuperación de antígenos (antigen retrieval).

Las soluciones de desenmascaramiento utilizadas han sido diversas desde agua destilada, bicarbonato de sodio siendo actualmente el citrato sódico. Las fuentes de calor han sido distintas con el paso del tiempo, la primera utilizada fue el horno de microondas convencional, con potencia de los 600 y 800 w (15.22) la acción de la rotura de los enlaces de fijadores no se produce por acción directa de los microondas, sino por la rápida oscilación que tiene lugar sobre las moléculas bipolar de agua de la solución, lo que produce un aumento de energía por lo tanto, de la temperatura.

Sin embargo, con la utilización de los hornos microondas existe una serie de inconvenientes, como son la dificultad del control de la temperatura, lo que puede producir resultados no homogéneos en la recuperación antigénica, y el limitado

número de preparaciones a tratar por cada ciclo. Por ello se utiliza otras fuentes de calor, como la olla de presión y el auto clave; en ambos se consiguen temperaturas superiores a la ebullición (130°C), siendo los resultados similares o algo superiores a lo de los hornos microondas, las ventajas que ofrecen son una mejor uniformidad de la temperatura y de los resultados, así como poder procesar un mayor número de preparaciones. 5-Controles -Omisión del anticuerpo en cada uno de los pasos. - Sustitución del anticuerpo primario por suero inmune. -Pre-incubación del antígeno con el anticuerpo primario diluido a la concentración a la que se usa en la reacción. Todos los experimentos control tienen que dar como resultado la eliminación del marcaje. La duración de las incubaciones y lavados dependerá del grosor del corte entre otros factores.

2.2.7 Técnica Inmunohistoquímica

Técnica mediante la cual se detecta la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido, utilizando un anticuerpo (monoclonal ó policlonal, IgG ó IgM) específico contra él. La técnica está basada en la reacción antígeno-anticuerpo y por ello el anticuerpo primario que se utilice debe haber sido generado en una especie diferente a la que se está estudiando. (Joaquin, 2011)

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÌMICA CÁMARA HÚMEDA HORIZONTAL

Cortar el tejido de 3 a 5 micras utilizando laminillas con carga y dejar la laminilla en la estufa toda la noche a 60°C.



Ilustración 2.11 Secador de Laminillas Histológicas (Plancha Caliente)
Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

1. Colocar el xilol o sustituto de xilol 1 por 10 minutos
2. Colocar en xilol o sustituto de xilol 2 por 5 minutos.
3. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
4. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
5. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 96%
6. Lavar con agua destilada 2 veces
7. Colocar las placas en la canastilla



Ilustración 2.12 Placas en la Canastilla
Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

8. Realizar la recuperación antigénica
9. Poner la canastilla con las placas en la cubeta que contenga el recuperador antigénico (25ml de antígeno retrieval citra solution 10x concentrado + 225ml de agua destilada) y colocar la cubeta dentro de la olla de presión, poner en la olla de presión agua llegue a unos 2.5 cm de la cubeta; cerrar la olla y luego colocarla en el horno microondas por:
 10. 15 minutos en potencia media baja "5"
 11. 10 minutos en potencia "3"



Ilustración 2.13 Microondas

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

12. Sacar la olla de presión del microondas, esperar unos 5 minutos y destaparla, sacar la cubeta y dejar por 20 minutos fuera de la olla para que se enfríe a temperatura ambiente con la tapa abierta.



Ilustración 2.14 Contenedor de Cubetas para laminillas

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

13. Lavar las placas con agua destilada.
14. Lavar las placas con PBS.
15. Colocar las placas en la cámara húmeda con la zona a estudiar marcada con el lápiz graso.



Ilustración 2.15 Cámara húmeda horizontal

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

16. Colocar 3-4 gotas de PBS.

17. Eliminar el PBS y secar los alrededores del tejido.
18. Colocar bloqueador de peroxidasa y dejar incubar durante 10 minutos.
19. Lavar con agua destilada 2 veces.
20. Lavar con PBS 2 veces.
21. Colocar Power Block y dejar incubar por 5 minutos.
22. Lavar con agua destilada 2 veces
23. Lavar con PBS 2 VECES
24. Eliminar los excesos y secar los alrededores del tejido
25. Colocar el anticuerpo primario y dejar encubar por 30 minutos.
26. Lavar con PBS 2 veces
27. Colocar colocar Super Enhancer y dejar incubar por 20 minutos
28. Lavar con PBS 2 veces
29. Colocar Poly HRP Label y dejar incubar durante 30 minutos
30. Lavar con PBS 2 Veces
31. Colocar el DAB (una gota de DAB chomogen se meszcla con 1 ml de Substrate buffer) y dejar incubar durante 10 minutos hasta que los cortes se tornen un color pardo amarillento.



Ilustración 2.16 Reactivos

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

32. Lavar con PBS 2 veces
33. Colocar portaobjetos en la canastilla y colorear con hematoxilina de Harris por 15 a 30 segundos o en hematoxilina de mayer por 3 minutos.
34. Lavar con agua corriente durante 5 minutos
35. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 96%
36. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
37. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
38. Inmersiones (30) en xilol o sustituto de xilol

PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA CÁMARA HÚMEDA VERTICAL POR CAPILARIDAD

1. Cortar el tejido de 3 a 5 micras utilizando laminillas con carga y dejar la laminilla en la estufa toda la noche a 60°C.



Ilustración 2.17 Secador de Laminillas Histológicas (Plancha Caliente) Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

2. Colocar el xilol o sustituto de xilol 1 por 10 minutos
3. Colocar en xilol o sustituto de xilol 2 por 5 minutos.
4. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
5. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
6. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 96%
7. Lavar con agua destilada 2 veces
8. Colocar las placas en la canastilla
9. Realizar la recuperación antigénica
10. Poner la canastilla con las placas en la cubeta que contenga el recuperador antigénico (25ml de antígeno retrieval citra solution 10x concentrado + 225ml de agua destilada) y colocar la cubeta dentro de la olla de presión, poner en la olla de presión agua llegue a unos 2.5 cm de la cubeta; cerrar la olla y luego colocarla en el horno microondas por:
 11. 15 minutos en potencia media baja “5”
 12. 10 minutos en potencia “3”



Ilustración 2.19 Microondas

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

13. Sacar la olla de presión del microondas, esperar unos 5 minutos y destaparla, sacar la cubeta y dejar por 20 minutos fuera de la olla para que se enfríe a temperatura ambiente con la tapa abierta.



Ilustración 2.20 Olla de Presión para recuperación Antigénica

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

14. Colocar las placas en los coverplates en la cámara húmeda.



Ilustración 2.21 Cámara Húmeda

Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

15. Lavar las placas con PBS 2 veces.

16. Eliminar el PBS y secar los alrededores del tejido.
17. Colocar 100 ul de bloqueador de peroxidasa y dejar incubar durante 10 minutos.
18. Lavar con agua destilada 2 veces.
19. Lavar con PBS 2 veces.
20. Colocar 100 ul Power Block y dejar incubar por 5 minutos.
21. Lavar con agua destilada 2 veces
22. Lavar con PBS 2 VECES
23. Colocar 100 ul el anticuerpo primario y dejar encubar de acuerdo a lo que indique inserto.
24. Lavar con PBS 2 veces
25. Colocar 100 ul Super Enhancer y dejar incubar por 20 minutos
26. Lavar con PBS 2 veces
27. Colocar 100 ul Poly HRP Label y dejar incubar durante 20 minutos
28. Lavar con PBS 2 Veces
29. Colocar 100 ul de DAB (una gota de DAB cromógeno se mezcla con 1 ml de Substrate buffer) y dejar incubar durante 10 minutos hasta que los cortes se tornen un color pardo amarillento.
30. Lavar con PBS 2 veces
31. Sacar los coverplates de la cámara húmeda y colocar en porta objetos en las canastillas y colorear con hematoxilina de Harris por 15 a 30 segundos o en hematoxilina de Mayer por 3 minutos.

32. Lavar con agua corriente durante 5 minutos
33. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 96%
34. Inmersiones (30) en alcohol isopropílico o etanol al 100%
35. Inmersiones (30) en alcohol isopropilico o etanol al 100%
36. Inmersiones (30) en xilol o sustituto de xilol

2.2.8 Resultados

Positivos: toma color pardo amarillento el tejido positivo ya sea un núcleo, citoplasma o membranas citoplasmáticas con zonas de contraste azul

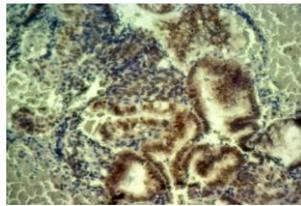


Ilustración 2.22 Cáncer de Endometrio Positivo
Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

Negativo: Toma color azul todo el tejido

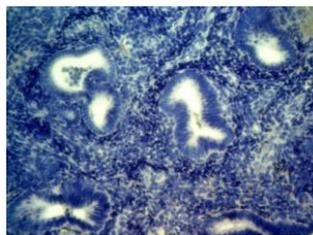


Ilustración 2.23 Cáncer de Endometrio Negativo
Fuente: Centro Medico Diagnosticas laboratorio de anatomía patológica

2.2.8.1 Interpretación:

Como en todas las pruebas de laboratorio, el control de calidad debe estar presente para poder asegurar que el resultado está bien. Se utilizan controles positivos y negativos mismos que corresponden a tejidos diferentes (y por lo común malignos),

que son sometidos a igual proceso que la muestra problema. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario.

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS.

Anticuerpo.- Proteína protectora producida por la respuesta inmune de un individuo estimulado por una sustancia extraña generalmente proteica. Actúa en la defensa contra los patógenos, a menudo por neutralización o identificación de un agente que debe ser eliminado.

Antígeno.- Cualquier sustancia reconocida por el organismo como extraña, que estimula una respuesta inmune.

AGUS.- Atipia glandular de significado incierto.

ASCUS.- Atipia escamosa de significado incierto.

Antigenicidad: capacidad de combinarse con anticuerpos y/o con receptores de células T (TCR). Si una molécula es inmunogénica, también es antigénica; sin embargo, la inversa no siempre es verdad.

Cigoto: Célula que resulta de la unión de las células sexuales masculina y femenina y a partir de la cual se desarrolla el embrión de un ser vivo.

HPV: El virus del papiloma humano

Inmunoglobulinas.- Proteínas plasmáticas con función de anticuerpo. Se encuentran en el suero y otros humores y tejidos del cuerpo

Implantación: Se define como el proceso a través del cual el embrión se ancla en el endometrio, con la finalidad de formar la placenta.

Inmunogenicidad: capacidad de inducir una respuesta inmune específica, humoral y/o celular.

Inmunomarcaje.- Marcaje específico de estructuras que contienen péptidos o proteínas, detectados mediante anticuerpos en la técnica inmunocitoquímica. Los anticuerpos están unidos, directa o indirectamente, a moléculas fluorescentes, a enzimas o a partículas de oro coloidal, de modo que las estructuras marcadas deben ser reconocidas con el tipo de microscopio adecuado.

LIE.- Lesion intraepitelial escamosa

Metacromacia.- Metacromacia (incontable) Un cambio en el color característico de la tinción llevado a cabo en los tejidos biológicos, exhibida por ciertos colorantes de anilina cuando se unen a sustancias particulares presentes en estos tejidos, llamados chromotropes.

NIC: neoplasia cervical intraepitelial

Proliferación: Proceso químico por el cual mediante el calor, la luz o un catalizador se unen varias moléculas de un compuesto para formar una cadena de múltiples eslabones de estas y obtener una macromolécula

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

TAC: se denomina un método de exploración radiológica que permite el estudio de un órgano

2.4 HIPÓTESIS Y VARIABLES.

2.4.1 Sistema de Hipótesis

La aplicación de la técnica Inmunohistoquímica mediante la inmunorreacción de la proteína p53, ayudará en el diagnóstico y clasificación del cáncer e hiperplasias endometriales.

2.4.2 Variables

VARIABLE INDEPENDIENTE.

La Técnica Inmunohistoquímica mediante la inmunorreacción de la proteína p53

VARIABLE DEPENDIENTE.

Facilitará el diagnóstico y clasificación del cáncer e hiperplasias endometriales.

2.5 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTO	CATEGORIA	INDICADORES	TECNICA INSTRUMENTOS
<p>Independiente: La aplicación de la Técnica de Inmunohistoquímica mediante la inmunorreacción de la proteína p53.</p>	<p>La p 53 funciona como guardián de la integridad del genoma de la célula huésped y está encargada de que el ciclo celular progrese</p>	<p>Pruebas Inmunohistoquímica.</p>	<p>Técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o tejidos utilizando anticuerpos marcados.</p>	<p>Técnica: Observación. Instrumentos: Guía de observación. Registro de Resultados.</p>
<p>Dependiente: Permitirá el diagnóstico y clasificación del cáncer e hiperplasias endometriales.</p>	<p>Proceso mediante el cual nos permite la visualización de la alteración de las características morfológicas de las células endometriales en el reporte microscópico</p>	<p>Clasificación del cáncer de endometrio</p>	<p>Reacción colorimétrica</p>	<p>Técnica: Observación Instrumentos: Guía de observación. Registro de Resultados.</p>

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 MÉTODO CIENTÍFICO

En nuestra investigación se utilizó el método inductivo deductivo que en su particularidad nos ayudó a partir de los objetivos, planteamiento de problema, metodología hemos obtenidos nuestros datos estadísticos, comprobación de la variable hipótesis, estadísticas, conclusiones y finalmente recomendaciones de la investigación.

LA APLICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO:

La utilización segura, eficiente y clínicamente de cada una de las muestras de endometrio de las pacientes atendidas en el laboratorio de Anatomía Patológica, establece un factor determinante en el diagnóstico oportuno y clasificación del tipo de cáncer y la eficacia del tratamiento así evitaremos mortalidad en este tipo de pacientes.

LA UTILIZACIÓN DEL MÉTODO SINTÉTICO:

En este método tenemos que reunir todas las estadísticas, datos, historia clínica de los pacientes, enfermedades anteriores, para sí poder determinar el análisis correcto para un diagnóstico de referencia el cual mediante la implementación de la prueba evitaremos posibles falsos resultados ya sean positivos o negativos como teniendo en cuenta las particularidades del uso de la p53

APLICACIÓN DEL MÉTODO EXPLICATIVO:

En este método buscamos la correlación de los resultados de la técnica Inmunohistoquímica en la cámara húmeda horizontal y cámara húmeda vertical para identificar la expresión e inmunorreacción de la proteína p53 en muestras de endometrio y valorar el principio técnico de cada una de ellas.

3.2 TIPO DE INVESTIGACIÓN:

La investigación se caracteriza por ser de tipo descriptiva- explicativa de campo no experimental.

DESCRIPTIVA:

También conocida como la investigación estadística, describen los datos de los pacientes que acuden al Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica en el periodo Marzo –Agosto, valorando la presencia o ausencia de antígenos de tal forma que permita la detección oportuna del cáncer de endometrio.

EXPLICATIVA:

La expresión de la proteína p53, mediante la inmunorreacción del antígeno-anticuerpo, permite obtener un diagnóstico específico que contribuye a un mejor control en el tratamiento que necesita el paciente.

3.3 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

Esta investigación fue de campo no experimental: porque vamos a realizar pruebas de diagnóstico que están basados en técnicas y protocolos proporcionados por la casa comercial Biogenex.

DE CAMPO:

Este método es utilizado porque nos ayuda a recolectar información de pacientes del Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la Ciudad de Latacunga, utilizando los medios recolección de muestras, diferenciado las necesidades de cada persona, sus historias clínicas y las pruebas en general que realizamos.

DOCUMENTAL:

Nos regimos a las técnicas inmunohistoquímica proporcionada por la casa comercial biogenex cumpliendo con los parámetros establecidos para la aplicación de los protocolos.

3.4 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.4.1 Población

La población es de 60 pacientes atendidas en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica de la Ciudad de Latacunga Durante el Periodo Marzo-Agosto 2014.

3.4.2 Muestra

Por ser la población pequeña no se procede a extraer muestra y se trabaja con toda la población.

3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

Técnica:

- Observación

Instrumento:

- Guía de Observación
- Registro de observación mediante grupos de discusión

3.6- ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

1.- CANTIDAD DE ENSAYOS REALIZADOS EN EL PERÍODO INVESTIGATIVO

Tabla No.- 4.1 De acuerdo a la Cantidad de ensayos realizados.

MES	ENSAYO
Marzo	11
Abril	10
Mayo	10
Junio	10
Julio	10
Agosto	9
Total	60

Gráfico N° 4.1 De acuerdo a la Cantidad de ensayos realizados.



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica

AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños

INTERPRETACIÓN

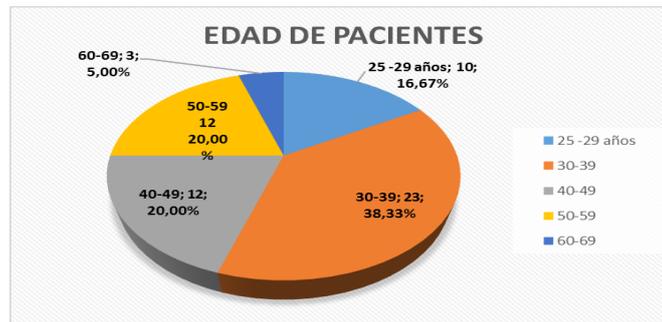
Podemos manifestar que en el mes de mayor recolección de muestras fue en Marzo con 11 ensayos correspondiente al 18% de la población analizada y en Agosto se recolectan 9 muestras su relación porcentual es de 15% de la población analizada.

2. EDADES DE LAS PACIENTES ATENDIDAS EN EL LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA.

Tabla No.- 4.2 De acuerdo a las Edades de las Pacientes.

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
20-29 años	10	16.67%
30-39 años	23	38.33%
40-49 años	12	20.00%
50-59 años	12	20.00%
60-69 años	3	5.00%
TOTAL	60	100%

Gráfico N° 4.2 De acuerdo a las Edades de las Pacientes.



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica

AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños

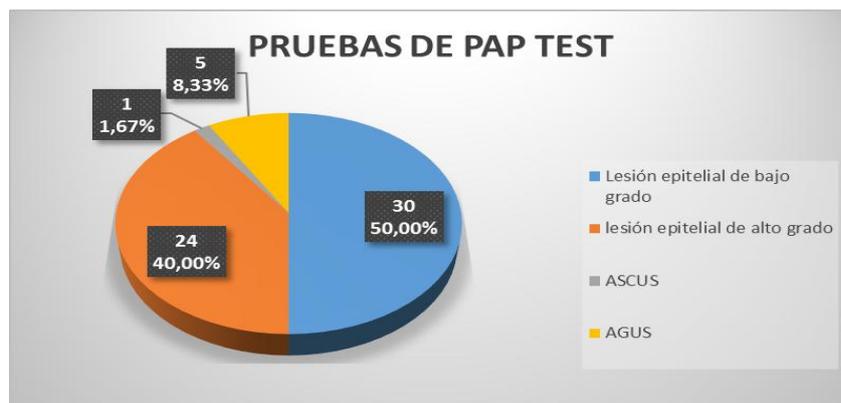
INTERPRETACIÓN: Existen una mayor cantidad de pacientes que requieren atención para un diagnóstico histopatológico las mujeres que fluctúan en una edad de 30 a 39 años de edad, y por lo tanto constituyen las pacientes de mayor interés en descartar patologías referentes al sistema reproductor femenino.

3. PRUEBA DE PAP TEST REALIZADA A LAS PACIENTES ATENDIDAS LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA.

Tabla No.- 4.3 De acuerdo a la prueba de Pap Test

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
LIE Bajo grado	30	50.00%
LIE Alto grado	24	40.00%
AGUS	1	1.67%
ASCUS	5	8.33%
TOTAL	60	100%

Gráfico No.- 4.3 De acuerdo a la prueba de Pap Test



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnóstica.

AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños.

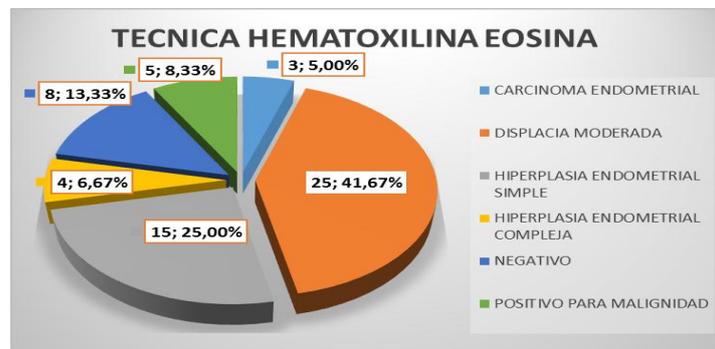
INTERPRETACIÓN: Existen una mayor incidencia de mujeres con un porcentaje de 50.00 % que presentan un diagnóstico de LIE de bajo grado, lo que tiende a desarrollar una patología de mayor complejidad como el cáncer de Útero u origen endometrial.

4. PRUEBA DE HEMATIXILINA EOSINA REALIZADA A LAS PACIENTES ATENDIDAS LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA.

Tabla No.- 4.4 De acuerdo a la prueba de Hematoxilina Eosina

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
CARCINOMA ENDOMETRIAL	3	5.00%
DISPLACIA MODERADA	25	41.67%
HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	15	25.00%
HIPERPLASIA ENDOMETRIAL COMPLEJA	4	6.67%
NEGATIVO	8	13.33%
POSITIVO PARA MALIGNIDAD	5	8.33%
TOTAL	60	100%

Gráfico No.- 4.4 De acuerdo a la prueba de Hematoxilina Eosina



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica.

AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños.

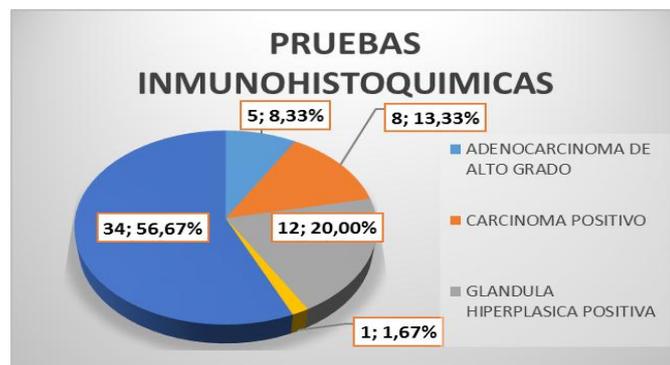
INTERPRETACIÓN: Existen una mayor incidencia de mujeres con un porcentaje de 41.67% que presentan un diagnóstico de displasia moderada, por lo que se debe hacer seguimiento y un control post tratamiento.

5. PRUEBAS DE INMUNOHISTOQUIMICAS REALIZADA A LAS PACIENTES ATENDIDAS LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA.

Tabla No.- 4.5 De acuerdo a la prueba de Hematoxilina Eosina

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO	5	8.33
CARCINOMA POSITIVO	8	13.33
GLANDULA HIPERPLASICA POSITIVA	12	20.00
GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA	1	1.67
NEOPLASIA INTRAEPITELIAL NEGATIVA	34	56.67
TOTAL	60	100%

Tabla No.- 4.5 De acuerdo a la pruebas Inmunohistoquímica



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnostica
AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños

INTERPRETACIÓN: Existen una mayor incidencia de mujeres con un porcentaje de 56.67% que presentan un diagnóstico negativo para neoplasia intraepitelial endometrial permitiendo descartar patologías de mayor complejidad, proporcionándonos un diagnóstico específico y confiable.

6. PRUEBA DE INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEINA P53 EN LA CÁMARA HÚMEDA HORIZONTAL REALIZADA A LAS PACIENTES ATENDIDAS LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA.

Tabla No.- 4.6 De acuerdo a la prueba de Inmunohistoquímica de la proteína p53 en la cámara húmeda horizontal

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
POSITIVOS PARA MALIGNIDAD DE CÁNCER DE ENDOMETRIO	14	23.33%
NEGATIVO PARA MALIGNIDAD DE CÁNCER DE ENDOMETRIO	46	76.67%
TOTAL	60	100%

Gráfico No.- 4.6 De acuerdo a la prueba de Inmunohistoquímica de la proteína p53 en la cámara húmeda horizontal



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnóstica
AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños

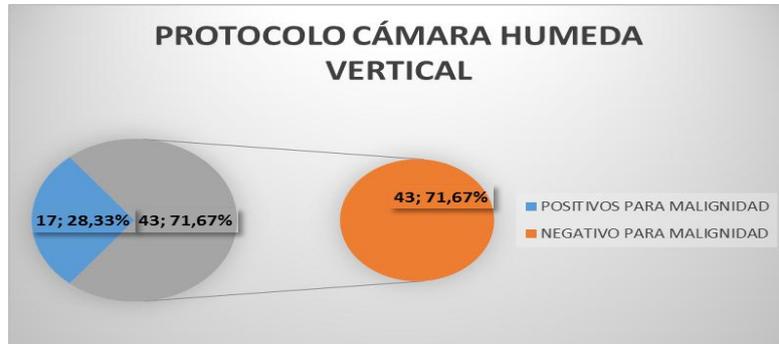
INTERPRETACIÓN: Existe una mayor incidencia de mujeres con un porcentaje de 76.67% que presenta un diagnóstico negativo para malignidad endometrial, ya que permite descartar el cáncer de endometrio, diagnóstico y nos permite descartar cualquier tipo de patología y tratamiento específico.

7. PRUEBAS INMUNOHISTOQUIMICA DE LA PROTEÍNA P53 EN LA CÁMARA HÚMEDA VERTICAL REALIZADA A LAS PACIENTES ATENDIDAS LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNOSTICA DE LA CIUDAD LATACUNGA

Tabla No.- 4.6 De acuerdo a la prueba de Inmunohistoquímica de la proteína p53 en la cámara húmeda vertical.

ALTERNATIVA	FRECUENCIA	%
POSITIVOS PARA MALIGNIDAD	17	28.33%
NEGATIVO PARA MALIGNIDAD	43	71.67%
TOTAL	60	100%

Tabla No.- 4.6 De acuerdo a la prueba de Inmunohistoquímica de la proteína p53 en la cámara húmeda vertical.



FUENTE: Datos obtenidos del área de laboratorio de Anatomía Patológica del Centro Médico DG Diagnóstica
AUTORA: Wendy María Armijos Bolaños

INTERPRETACIÓN: Existen una mayor incidencia de mujeres con un porcentaje de 71.67% que presentan un diagnóstico negativo para malignidad endometrial ya que el protocolo utilizado para el estudio nos permite una mejor interpretación diagnóstica en las patologías endometriales.

3.7 COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Los resultados obtenidos con el uso del protocolo de la cámara Húmeda vertical de los cortes sometidos a la técnica inmunohistoquímica se observó una inmunomarcación positiva más intensa debido a las características de la cámara y utilización de los coverplates para la realización de la misma, así como también la cantidad exacta en la utilizada del Anticuerpo primario. La interpretación de los resultados se basa en la valoración visual mediante el microscopio de la presencia o ausencia del antígeno de la p53 mediante la coloración pardo amarillenta en el sitio de lesión.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- ❖ Mediante la implementación y aplicación de la técnica inmunohistoquímica permite identificar y mostrar rasgos suficientemente distintivos que aportan con elementos de comprobación en el diagnóstico histológico.
- ❖ Existen una mayor cantidad de pacientes que requieren atención para un diagnóstico histopatológico en mujeres que fluctúan en una edad de 30 a 39 años, y por lo tanto constituyen las pacientes de mayor interés en descartar patologías referentes al sistema reproductor femenino.
- ❖ Existen una mayor incidencia de mujeres con edades que fluctúan entre 30 a 39 años que presentan un diagnóstico de LIE de bajo grado, lo que tiende a desarrollar una patología de mayor complejidad como el cáncer de Útero u origen endometrial.
- ❖ Hay una mayor incidencia de mujeres que fluctúan en una edad entre 30 y 39 años que presentan un diagnóstico de displasia moderada, generando alternativas de controles y seguimientos.
- ❖ Hay una prevalencia de mujeres que presentan un diagnóstico negativo para neoplasia intraepitelial endometrial permitiendo descartar patologías de mayor complejidad, proporcionándonos un diagnóstico específico y confiable.
- ❖ Existen una mayor incidencia de mujeres con edades de entre 30 a 39 años que presentan un diagnóstico negativo para malignidad endometrial ya que el protocolo utilizado para el estudio nos permite una mejor interpretación diagnóstica en las patologías endometriales.
- ❖ Existen una mayor incidencia de mujeres con edades de entre 30 a 39 años que presentan un diagnóstico negativo para malignidad endometrial en el cual el protocolo utilizado para el estudio nos permite una mejor interpretación

diagnóstica en las patologías endometriales debido a la alta sensibilidad de la prueba.

4.2 RECOMENDACIONES

- ❖ Es necesario los controles periódicos y permanentes para evitar situaciones complejas, pues aquellos resultados no descartan que en lo posterior aparezcan cambios morfológicos celulares.
- ❖ La prevención mediante los controles ginecológicos durante una vida sexual activa, independientemente de la edad, reducen el riesgo de desarrollar patologías que pueden desencadenar cualquier tipo cáncer a nivel del aparato genital femenino.
- ❖ Todo diagnóstico que muestre como lesión intraepitelial escamosa tiene la prevalencia a desarrollar una lesión de alto grado y de mayor complejidad, por lo que es vital la asistencia médica posterior con los exámenes respectivos.
- ❖ La utilización de la cámara húmeda horizontal no permite llevar un control exacto en la cantidad de reactivo a utilizar en cada prueba ya que depende del tamaño del tejido y esto provocará una mayor inversión de tiempo y dinero.
- ❖ Para la utilización de la cámara húmeda vertical se necesita 100ul de reactivo para la realización de la prueba. esto nos permite un mayor control de los reactivos y un ahorro económico de los mismos por la característica de capilaridad de la cámara.
- ❖ La aplicación de las técnicas histológicas se deben realizar en la cámara húmeda vertical, por su característica de capilaridad y utilización de controles a la disminuye la manipulación de las laminillas histológicas durante la prueba.
- ❖ Para una mejor visualización e interpretación de resultados es necesario tomar en cuenta el inserto de cada uno de los marcadores que se someterán a estudio respetando tiempos de incubación de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

1. ARENAS, C. E. (2010). *Tecnica Histologica*. Mexico: CAPES.
2. Badia, L. M., Sesma, P., & Calvo González, A. (2014). *Tecnicas en Histologia y Biologia Celular*. Barcelona: Elsevier MASSON.
3. Botella Llusía, J. (1997). *El Utero Fisiologia y Patologia*. Madrid: Díaz de Santos, S.A.
4. Buys DL, J. (2007). Interpretacion Basica Inmunohistoquimica. *Patologia Revista Americana*, 132.
5. Castellero. (2001). Inclusión de Muestras en Parafina . *Revista Médica*, 36-37.
6. Cediél, J. F., Cárdenas, M. E., García, A., Chuaire, L., Payán, C., Villegas, V., y otros. (2009). *Tecnicas Histologicas*. Bogotá: Univercidad del Rosario.
7. Garcia Bermeo, J. (2006). *Tecnico Esoecialista en Anatomia Patologica en el Hospital Gallegos de Salud*. España: MAD,S,L.
8. Gómez, G. (2001). Introducción a la Histologia y Tecnicas Básicas. En L. P. Gartner, & J. L. Hiatt, *Texto Atlas de Histologia* (págs. 1-2). Mexico: Interamerica.
9. G-R, H. (20 de 6 de 2005). *tecnica-basica-de-inmunohistoquimica*. Recuperado el 24 de 8 de 2014, de <http://inmunohistoquimica.blogspot.com/>: <http://inmunohistoquimica.blogspot.com/2005/06/tecnica-basica-de-inmunohistoquimica.html>
10. Hanson, M. (1985). *The pronistic significance of lymph-vascular space invasion in stage I endometrial cáncer*. Van NagellJR.
11. Hidalgo, C. O. (2007). Interpretacion Basica Inmunohistoquimica. *Patologia Revista Americana*, 128-129.
12. Joaquin, H. d. (2011). *HISTOLOGIA tecnicas histologicasd*. Recuperado el 22 de junio de 2014, de Institucional de la Universidad de Alicante: http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/18704/1/HISTOLOGIA_P2.pdf
13. Martín Lacave, I., & García Caballero, T. (2012). *Atlas de Inmunotinción*. España: Díaz Santos.
14. Martín Lacave, I., & Garcpia Caballero, T. (2012). *Atlas de Inmunohistoquimica Caracterización de Células , Tejidos y Organos*. Madrid: Díaz de Santos.

15. Montenga Badia, I., Ruiz, F. E., & Clavo González, A. (2009). *Técnicas en Histología y en Biología Molecular*. Barcelona: Elsevier España S, L.
16. Negrete, J. H. (2006). *SOBOTTA LEHRBUCH Histologie*. Madrid: Elsevier.
17. Rolls, G. (2010). *Microtomy_booklet_spanish_online*. Recuperado el 18 de 8 de 2014, de Leica The Pathology Company: http://www.leicabiosystems.com/fileadmin/img_uploads/histology_systems/2010/Microtomy_booklet_spanish_online.pdf
18. Seco Torres, F. (2002). *Manual de Técnicas Histología y Anatomía Patológica*. Barcelona: Ariel, S.A.
19. Vázquez Nin, G., & Echeverría, O. (2000). *Introducción a la Microscopía Electrónica Aplicada a Las Ciencias Biológicas*. México.

ANEXOS

PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO DEL CENTRO MÉDICO DG DIAGNÓSTICA



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

INCLUSIÓN O FORMACIÓN DEL BLOQUE DE PARAFINA



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

OBTENCIÓN BLOQUE PARAFINA

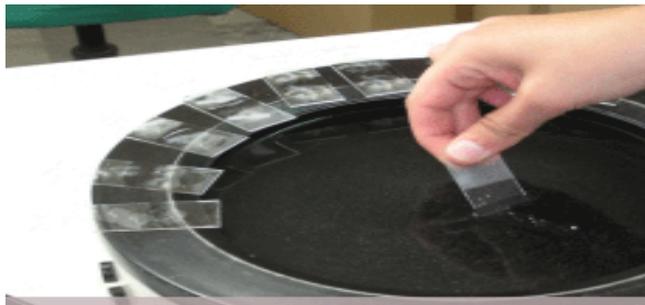


Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

OBTENCIÓN DE LOS CORTES



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

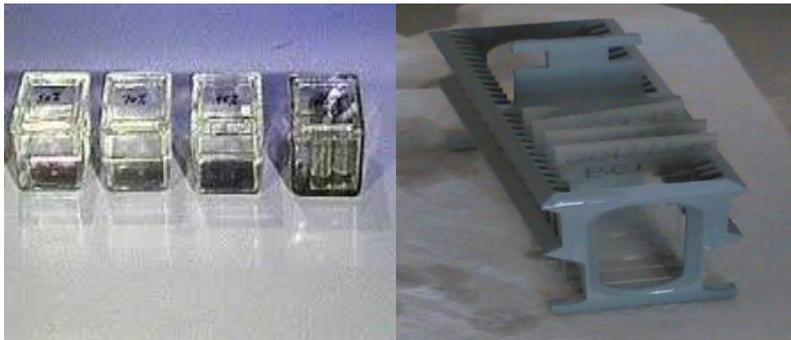


Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

DESPARAFINACIÓN DE CORTES



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

PREPARACIÓN DE LAS LAMINILLA



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

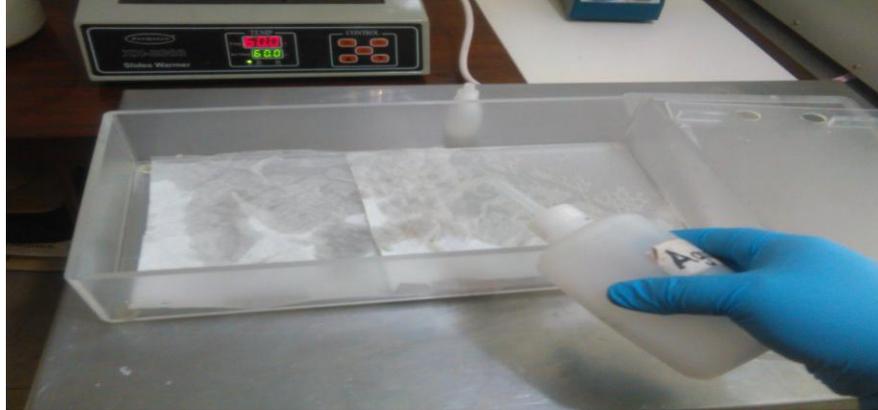


Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

PREPARACIÓN DE LA CÁMARA HÚMEDA HORIZONTAL



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

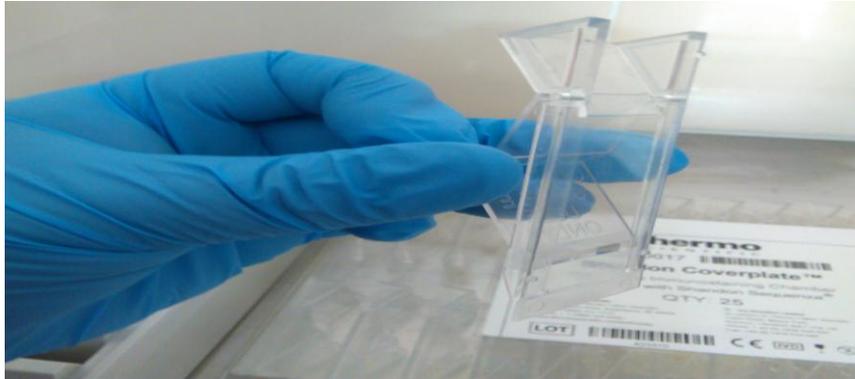


Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

PROCEDIMIENTO CÁMARA HÚMEDA VERTICAL CON COVERPLATES



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

REACTIVOS PARA LA PRUEBAS



Fuente: Laboratorio de Anatomía Patológica CMDG
Autores: Wendy Armijos

MUESTRA	EDAD	PAP TEST	ENSAYO HEMATOXILINA EOSINA	INMUNOHISTOQUIMICA
1	31	LIE ALTO GRADO	POSITIVO PARA MALIGNIDAD	ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO
2	54	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
3	36	LIE ALTO GRADO	DISPLASIA MODERADA	CARCINOMA POSITIVO
4	41	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL COMPLEJA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
5	57	LIE DE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
6	34	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL COMPLEJA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
7	26	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASI ENDOMETRIAL	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
8	74	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL COMPLEJA	CARCINOMA POSITIVO
9	29	LIE BAJO	HIPERPLASIA	CARCINOMA POSITIVO

		GRADO	ENDOMETRIAL COMPLEJA	
10	20	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
11	32	LIE ALTO GRADO	CARCINOMA ENDOMETRIAL	ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO
12	33	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
13	41	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE CON ATIPIA	CARCINOMA POSITIVO
14	21	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
15	48	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE CON ATIPIA	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
16	35	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
17	25	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL

				NEGATIVA
18	53	LIE ALTO GRADO	DISPLASIA MODERADA	CARCINOMA POSITIVO
19	36	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
20	26	LIE ALTO GRADO	POSITIVO PARA MALIGNIDAD	ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO
21	25	LIE ALTO GRADO	NEGATIVO	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
22	39	LIE ALTO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
23	28	LIE ALTO GRADO	POSITIVO PARA MALIGNIDAD	ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO
24	60	LIE ALTO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
25	30	LIE ALTO GRADO	CARCINOMA ENDOMETRIAL	ADENOCARCINOMA DE ALTO GRADO
26	55	LIE ALTO GRADO	POSITIVO PARA MALIGNIDAD	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
27	53	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASI ENDOMETRIAL	GLANDULA HIPERPLASICA

				NEGATIVA
28	31	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASI ENDOMETRIAL	GLANDULA HIPERPLASICA POSITIVA
29	35	LIE ALTO GRADO	CARCINOMA ENDOMETRIAL	CARCINOMA POSITIVO
30	46	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASI ENDOMETRIAL	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
31	53	LIE ALTO GRADO	HIPERPLASI ENDOMETRIAL	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
32	48	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
33	37	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
34	37	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
35	30	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
36	53	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
37	31	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA	NEOPLASIA

		GRADO	MODERADA	INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
38	36	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
39	20	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
40	40	LIE BAJO GRADO	NEGATIVO	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
41	51	LIE BAJO GRADO	NEGATIVO	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
42	57	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
43	53	LIE BAJO GRADO	NEGATIVO	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
44	36	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
45	72	LIE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL

				NEGATIVA
46	44	LIE BAJO GRADO	NEGATIVO	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
47	52	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
48	35	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
49	48	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
50	49	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
51	24	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
52	37	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
53	45	AGUS	NEGATIVO	GLANDULA HIPERPLASICA NEGATIVA
54	57	LIE DE BAJO	DISPLASIA	NEOPLASIA

		GRADO	MODERADA	INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
55	31	LIE DE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
56	31	LIE DE BAJO GRADO	NEGATIVO	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
57	43	LIE DE BAJO GRADO	DISPLASIA MODERADA	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA
58	40	LIE ALTO GRADO	NEGATIVO	CARCINOMA POSITIVO
59	36	LIE ALTO GRADO	POSITIVO PARA MALIGNIDAD	CARCINOMA POSITIVO
60	34	LIE BAJO GRADO	HIPERPLASIA ENDOMETRIAL SIMPLE	NEOPLASIA INTRAEPITELIAL ENDOMETRIAL NEGATIVA