



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS  
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA  
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**COLORACIONES HISTOLÓGICAS ALTERNATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DEL CÁNCER EPIDERMÓIDE BUCAL**

**AUTORES:**

Castillo, Estefani  
Hernández, Alberto  
Ibañez, Olimar  
Torrealba, Génesis

**TUTOR ESPECIALISTA:**

Merchor, Gustavo

**TUTOR METODOLÓGICO:**

Argüello, Alcira

**JUNIO, 2017**



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS**  
**T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO**



**CONSTANCIA DE ENTREGA**

La presente es con la finalidad de hacer constar que el trabajo Monográfico titulado:

**COLORACIONES HISTOLÓGICAS ALTERNATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DEL CÁNCER EPIDERMOIDE BUCAL**

Presentado por los Bachilleres

Castillo, Estefani C.I: 25.903.426  
Hernández, Alberto C.I: 24.644.064  
Ibáñez, Olimar C.I: 22.210.659  
Torrealba, Génesis C.I: 24.450.964

Fue leído y se considera apto para su presentación desde el punto de vista metodológico, por lo que tienen el derecho de hacer la presentación final de su **TRABAJO MONOGRÁFICO**. Sin más a qué hacer referencia, se firma a petición de la parte interesada a los \_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año 2017.

Alcira Argüello

CI: 4.463.121

---



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS**  
**T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO**



**CONSTANCIA DE APROBACIÓN**

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Informe Monográfico titulado:  
**COLORACIONES HISTOLÓGICAS ALTERNATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DEL CÁNCER EPIDERMÓIDE BUCAL**

Presentado por los bachilleres:

Castillo, Stefani C.I: 25.903.426  
Hernández, Alberto C.I: 24.644.064  
Ibáñez, Olimar C.I: 22.210.659  
Torrealba, Génesis C.I: 24.450.964

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado el mismo, y que aunque no nos hacemos responsables de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Profesor

\_\_\_\_\_  
Profesor

\_\_\_\_\_  
Profesor



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS**  
**T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO**



**ACTA DE APROBACIÓN**

Quienes suscribimos, Profesora Lisbeth Loaiza, Directora de escuela, Profesora Sandra Planchart, coordinadora del comité de investigación y producción intelectual de la escuela, hacemos constar que una vez obtenidas las evaluaciones del tutor, el jurado evaluador del trabajo en presentación escrita y jurado de la presentación oral del trabajo final de grado titulado **COLORACIONES HISTOLÓGICAS ALTERNATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL CÁNCER EPIDERMÓIDE BUCAL**, cuyo autores son los bachilleres Castillo Estefani, Hernández Alberto, Ibáñez Olimar y Torrealba Génesis presentado como requisito para obtener el título de Técnico Superior Universitario en Histotecnología, el mismo se considera APROBADO.

En valencia a los \_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ del año dos mil diecisiete.

---

Prof. Lisbeth Loaiza  
Directora

Sello

---

Prof. Sandra Planchart  
Coordinadora



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS**  
**T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO**



**COLORACIONES HISTOLÓGICAS ALTERNATIVAS PARA LA IDENTIFICACIÓN  
DEL CÁNCER EPIDERMOIDE BUCAL**

**AUTORES:**

Castillo, Estefani  
Hernández, Alberto  
Ibáñez, Olimar  
Torrealba, génesis

**TUTOR ESPECIALISTA:**

Merchor, Gustavo

**TUTOR METODOLÓGICO:**

Argüello, Alcira

Año: 2017

**RESUMEN**

El carcinoma epidermoide bucal es uno de los tipos de cáncer más frecuente a nivel mundial con un alto índice de mortalidad, este se caracteriza por el crecimiento acelerado de células anormales produciendo lesiones displásicas y neoplásicas. Si esta enfermedad es diagnosticada a tiempo la probabilidad de curación sería aproximadamente del 90%. La detección de esta patología se obtiene mediante el procesamiento histológico empleando ciertas coloraciones específicas para teñir las estructuras tisulares. La técnica de tinción por excelencia es la Hematoxilina- Eosina, y debido a la falta de estos reactivos por motivo de escases y de la gran demanda se ha buscado nuevos métodos de tinción que lo sustituya y que cumpla con la misma función de demostrar la morfología celular. Es por esto que la presente investigación se basó en conocer la utilidad de los colorantes histológicos alternativos para la identificación del cáncer epidermoide bucal. El estudio se realizó bajo una modalidad Monográfica de diseño documental. Como resultado se logró dar respuesta al objetivo planteado en la investigación, permitiendo demostrar y conocer la utilidad de los colorantes Azul de Metileno, de Toluidina, Orange G y Floxina como sustancias alternas en el estudio histopatológico en sustitución de la Hematoxilina o Eosina.

**Palabras claves:** Carcinoma epidermoide, Azul de metileno, Azul de toluidina, Orange G, Floxina.



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**  
**ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS**  
**T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA**  
**TRABAJO MONOGRÁFICO**



**ALTERNATIVES HISTOLOGICAL COLORATIONS FOR THE IDENTIFICATION  
OF ORAL SQUAMOUS CELL CANCER**

**AUTHORS:**

Castillo, Estefani  
Hernández, Alberto  
Ibáñez, Olimar  
Torrealba, Génesis

**SPECIALIST TUTOR:**

Merchor, Gustavo

**METHODOLOGICAL TUTOR:**

Argüello, Alcira

**Year:** 2017

**ABSTRACT**

Oral squamous cell carcinoma is one of the most common cancers around the world with a high rate of mortality, this is characterized by accelerated growth of abnormal cells producing lesions, Dysplastic and neoplastic. If this disease is diagnosed in time the probability of cure would be approximately 90%. Detection of this pathology is obtained by processing histologically using certain specific colours to dye the tissue structures, the staining technique by excellence is Hematoxylin and eosin, due to lack of these reagents because of scarcity and demand new methods of staining that replace it and that fulfills the same function to show the cell morphology is searched. This is why that this research was based on knowing the usefulness of alternative histological colorants for the identification of oral squamous cell cancer. The study is carried out under a mode monographic of design documentary. As result was achieved by responding to the objective in research, demonstrate and learn about the usefulness of the dye Blue methylene, Toluidine and Orange G, Phloxine as substances alternate in the histopathological study instead of Hematoxylin or eosin.

**Keywords:** Squamous Cell Carcinoma, methylene blue, blue toluidine, Orange G and Phloxine.

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
CONSTANCIA DE ENTREGA.....	ii
CONSTANCIA DE APROBACIÓN.....	iii
ACTA DE APROBACIÓN.....	iv
RESUMEN.....	v
SUMMARY.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	8
DESARROLLO.....	10
COLORANTES NUCLEARES Y EXTRA NUCLEARES ALTERNOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL.....	13
VENTAJA Y DESVENTAJA DE LOS COLORANTES NUCLEARES Y EXTRA NUCLEARES ALTERNATIVOS PARA LA DEMOSTRACIÓN DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL.....	16
PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA LA TINCIÓN AUXILIAR Y SU COMPARACIÓN EN LA COLORACIÓN DE LA ESTRUCTURA NUCLEAR Y EXTRA NUCLEAR CON LA TÉCNICA DE RUTINA HEMATOXILINA – EOSINA.....	17
CONCLUSIONES.....	21
RECOMENDACIONES.....	22
REFERENCIAS.....	23

## INTRODUCCIÓN

El ser humano a través de su vida ha tenido que enfrentar una lucha incansable con una de las enfermedades más fuerte en el mundo como es el cáncer, quien hoy día afecta a millones de personas a nivel mundial y es la responsable de miles de muertes al año. Esta afección se caracteriza por una tumoración maligna de células que se dividen de forma atípica y que puede dispersarse a diferentes órganos cercanos por medio de vasos sanguíneos. Uno de los tipos de carcinomas más frecuente es el de epidermoide bucal el cual se desarrolla en cualquier ubicación de la mucosa oral, cuyos factores de riesgos se encuentran asociados con el alto consumo de alcohol, tabaco, dentadura postiza, entre otros. Siendo esto más frecuente en el género masculino que en el femenino. La detección temprana de esta enfermedad juega un papel muy importante para el paciente, debido a que presenta una tasa de curación hasta del 90% cuando se encuentra en una etapa inicial.

El diagnóstico de esta afección radica en el estudio histopatológico por medio de una biopsia incisional del área lesionada, cuyo resultados se darán por medio de técnicas histológicas de coloración con Hematoxilina y Eosina (H-E), el cual es empleado como el método rutinario o estándar. Sin embargo debido a situación de escasos y la falta de estos reactivos las actividades dentro de los laboratorios se han visto afectadas en cuanto a la paralización de los procesamientos, no pudiendo entregar a tiempo el resultado final, por tal motivo el profesional histotecnólogo en vista de la situación tiene que recurrir a emplear otros colorantes alternos. Es por esto que el propósito de la investigación se enfoca en el análisis de los colorantes alternativos que se pueden emplear para diagnosticar el cáncer epidermoide bucal en ausencia de la tinción rutinaria, permitiendo con esto resolver de alguna u otra manera los inconvenientes que se puedan presentar en el laboratorio en cuanto a la ausencia de dichos colorantes y que de igual forma se permita demostrar la morfología tisular.

Por consiguiente, la investigación tuvo como objetivo general conocer la utilidad de los colorantes histológicos alternativos para la identificación del cáncer epidermoide bucal. Seguidamente, de este se desprenden tres objetivos específicos, el primero de ellos es describir los colorantes nucleares y extra nucleares alternos para la identificación de dicha patología; el



segundo se basa en señalar las ventajas y desventajas de los colorantes nucleares y extra nucleares sustitutos y por último, es proponer un protocolo alternativo para la tinción auxiliar y su comparación en la coloración de la estructura nuclear y extra nuclear con la técnica de rutina Hematoxilina – Eosina.

Cabe destacar que la investigación es de gran utilidad para el desarrollo de la histotecnología, debido a que brinda un novedoso método de coloraciones alterno que podrá emplear el profesional histotecnólogo para la detección del cáncer epidermoide bucal en ausencia de Hematoxilina o Eosina, permitiendo describir y exponer de esta manera colorantes no rutinarios que pueden ser empleado en caso de emergencia, ya que permiten evidenciar la patología sin producir cambio en la morfología tisular. De igual forma el estudio toma gran relevancia en el área científica en cuanto al aporte de nuevos conocimientos en la demostración de la enfermedad mediante el empleo de técnicas secundarias.

Asimismo, el estudio genera un impacto positivo en la sociedad, debido a que los pacientes no se verán afectados en el retraso de sus resultados motivados por la ausencia de colorantes rutinarios, evitando con esto un avance significativo de la enfermedad mediante un diagnóstico precoz. Cabe destacar que se encuentra poco contenido con respecto a coloraciones o técnicas alternativas, por tal motivo en la investigación se busca describir, resaltar e impulsar sustancias que puedan emplearse como método secundario para la detección de una patología, demostrando desde un punto de vista práctico una completa novedad en materia de tinciones histológicas sustitutos o auxiliares de la técnicas Hematoxilina y Eosina en carcinoma epidermoide bucal.

El estudio se abordó bajo la modalidad de trabajo monográfico, debido a que se basó en la búsqueda, análisis y desarrollo de un tema en particular. Asimismo, la investigación fue desarrollada sobre un diseño de tipo documental, fundamentado en la recopilación de datos extraídos de fuentes primarias realizados por diversos investigadores con el fin de sustentar los objetivos planteados, así como también dar respuesta a la problemática expuesta, siendo enfocada en las coloraciones alternas para la identificación del cáncer epidermoide bucal en ausencia de la tinción rutinaria.

## DESARROLLO

El carcinoma epidermoide es una tumoración maligna que es frecuente en la mucosa oral y que puede desarrollarse en cualquier ubicación, caracterizándose por un crecimiento rápido de células con mitosis atípicas e infiltración de tejidos vecinos de la cavidad bucal<sup>1</sup>. Esta afección es más frecuente en hombres que en mujeres mayores de cuarenta años de edad, se presenta como un cambio de coloración en la mucosa bucal que posteriormente se puede transformar en una tumoración o una ulceración, así como también en una fisura profunda y de borde duro con fácil sangrado, los factores de riesgos se encuentran relacionados con el consumo excesivo de tabaco, alcohol, irritación crónica a causa de dientes ásperos, dentaduras postizas, infecciones por VPH e higiene oral. En pronóstico, si esta patología se detecta a tiempo mediante los estudios histológicos antes de que se haya diseminado a otros tejidos la tasa de curación sería casi del 90% y si por el contrario el carcinoma ya está muy avanzado el pronóstico no es favorable<sup>2</sup>.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) reseñan que el carcinoma epidermoide bucal se encuentra dentro de los cánceres más comunes alrededor del mundo, con un estimado de 443,000 casos y 241,000 muertes solo en el 2012<sup>3</sup>. Por su parte en Venezuela en el año 2011 según el anuario de mortalidad presentado por el Ministerio Del Popular Para La Salud se registraron 406 muertes por carcinoma epidermoide bucal, representando así el 0,28% de la mortalidad por enfermedades diagnosticadas de ese año, en el cual 32 muertes de dicha patología pertenecieron al estado Carabobo<sup>4</sup>.

En el mundo se ha empleado a la Hematoxilina y la Eosina como tinción rutinaria por excelencia para la detección de esta y otras patologías en estudios histológicos, así como también en el uso de investigaciones debido su fácil accesibilidad, bajo costo y potencialidad que posee para demostrar la morfología celular<sup>5</sup>. Cabe destacar que actualmente los laboratorios de anatomía patológica del país están siendo afectados debido a la escasez y la gran demanda de colorantes que implica el proceso de coloración de las muestras, siendo estas tinciones las más afectadas. Esto ha tenido un efecto poco alentador, ya que si las muestras no

pasan por la estación de coloración ocurrirán retrasos en el diagnóstico del paciente y posteriormente el personal especializado no podrá cumplir con sus funciones, de igual forma la ausencia del mismo trae como consecuencia a nivel educativo la postergación de prácticas de aprendizaje.

**Chhabra, N. Chhabra, S. y Sapra, N. En el año 2015** llevaron a cabo un estudio de tipo documental denominado “Diagnostic Modalities for Squamous Cell Carcinoma: An Extensive Review of Literature-Considering Toluidine Blue as a Useful Adjunct”. Cuya finalidad fue la de seleccionar dentro de distintos métodos de diagnóstico el más efectivo para la detección de lesiones orales pre-malignas y malignas en una etapa temprana para mejorar la tasa de supervivencia de los pacientes. Los datos fueron recolectados de diversos trabajos monográficos de donde fueron recopiladas diversas técnicas para el diagnóstico de lesiones oral. Como resultado, dentro de una amplia gama de técnicas auxiliares fueron elegidos tanto el Azul de Metileno y el Azul de Toluidina como los métodos más precisos y certero, llegando a la conclusión que estas técnicas son las más eficaces en el uso complementario de la biopsia incisional para la detección in vivo, debido a que ambos son eficaces para resaltar las displasias<sup>6</sup>.

Dicha investigación guarda relación con la presente ya que resaltan el empleo de colorantes alternos a la tinción rutinaria para la detección del carcinoma epidermoide oral in vivo, obteniendo resultados satisfactorios y que empleándolos en estudios histológicos se podrá detectar claramente una patología, solo que con una variación en la tonalidad en comparación con la hematoxilina a la cual sustituyen.

Seguidamente, **R, Akhtar, S, Balasundari. K, Mala. En el año 2013** realizaron una investigación de tipo experimental, llamada “Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cáncer”. La cual tuvo como finalidad establecer el colorante Azul de Metileno como método de diagnóstico precoz en lesiones precancerosas y carcinoma oral avanzado, cuya muestra de estudio se basó en 120 personas de ambos sexo, 50 de ellos con lesiones pre-malignas clínicamente sospechosas, otros 50 con cánceres orales clínicamente sospechosos y los 20 restante con mucosa clínicamente normal<sup>7</sup>.

La prueba consistió en aplicar el colorante Azul de Metileno como enjuague bucal para evidenciar las lesiones de la mucosa oral, esto con el fin de realizar una biopsia para el estudio histopatológico de manera de constatar la eficacia de la solución. El estudio histológico arrojó como resultado de las 100 lesiones clínicamente comprobadas, que 88 (92%) de las lesiones retuvieron la tinción de azul de metileno, mientras que 12 (8%) las lesiones no pudieron retener la mancha, de estas 88 lesiones teñidas con azul de metileno, 86 fueron histológicamente demostradas como alteraciones displásicas o carcinomatosas, mientras que 2 (2%) fueron diagnosticadas como hiperqueratosis sin displasia, sin evidencia de malignidad. De las 12 lesiones no teñidas 8 fueron diagnosticadas histopatológicamente como carcinomatosas mientras que 4 fueron diagnosticadas como hiperqueratosis sin displasia, sin evidencia de malignidad<sup>7</sup>.

Al finalizar la prueba se llegó a la conclusión de que este reactivo obtuvo un valor predictivo positivo de 97,7%, valor predictivo negativo 33,3%, sensibilidad 91,3%, especificidad de 70% y 50% en lesiones Pre-malignas y avanzadas. Logrando con estos resultados cumplir con el objetivo planteado en la investigación, confirmando que la tinción de Azul de Metileno es una herramienta de diagnóstico útil en los programas de pesquisa del cáncer oral<sup>7</sup>. Este estudio aporta datos teóricos a la investigación ya que habla sobre las ventajas y la veracidad que posee Azul de Metileno en el diagnóstico precoz de lesiones bucales, sustentando la presente investigación y dando a conocer su uso como un método auxiliar de diagnóstico.

Por otra parte **Albornoz, C. Barrios, O. Rojas, P. Bastián, L. y Santana, J.** En el año 2010 plasmaron un estudio denominado “Eficacia del Azul de Toluidina y lugol en el Diagnóstico Precoz del Cáncer Bucal”. Con el propósito de evaluar tanto al Azul de Toluidina como el lugol en el diagnóstico precoz in vivo, se aplicó a una población de 182 personas con lesiones bucales, en la cual se constataron un total de 267 lesiones clasificadas como lesiones benignas con displasia leve o Carcinomas y displasias moderadas o severas, dando como resultado una sensibilidad de 90% y 92% de especificidad en el Lugol. En el caso del Azul de Toluidina en el diagnóstico de cáncer bucal se obtuvo una sensibilidad de 93% y especificidad de 98%, valor predictivo positivo 84%, valor predictivo negativo de 99%. Llegando a la

conclusión de que la investigación cumplió con el objetivo, mostrando una alta eficacia en el diagnóstico precoz de lesiones displásicas moderadas y severas<sup>8</sup>.

El estudio fundamenta el presente trabajo monográfico al demostrar y describir la eficacia del colorante Azul de Toluidina como método más eficaz de diagnóstico, basándose en las propiedades de teñir componentes ácidos de los tejidos, tales como sulfatos y sus radicales incorporados en el ADN y ARN del núcleo celular, demostrando así su aplicación no solo in vivo sino también en estudio histológico.

## **COLORANTES NUCLEARES Y EXTRA NUCLEARES ALTERNOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL**

Los colorantes histológicos cumplen con propiedades y leyes físicas que las hacen interaccionar con ciertas estructuras específicas de la célula, ya sea con el núcleo o con los elementos extra celulares. Es de allí donde nace su clasificación por afinidad, denominándolo como un colorante nuclear o citoplasmático. Todo esto dependiendo de sus propiedades o cargas eléctricas que posean cada una de ellas. Para que ocurra una reacción entre los reactivos y las estructuras celulares es necesario que exista una atracción entre ellas.

Físicamente dicha atracción se realiza bajo el cumplimiento de la ley de Coulomb la cual dice que entre dos cargas en reposo hay una fuerza de atracción o repulsión que es directamente proporcional al producto de las cargas, e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa. Es decir si las cargas eléctricas aumentan, la fuerza de atracción o repulsión entre ellas será mayor y si las cargas disminuyen la fuerza también lo hará. De igual forma, si la distancia que las separa crece, la fuerza se disminuirá y si la distancia se reduce la fuerza aumentará. La dirección de dicha fuerza es correspondiente a la recta que une las dos cargas, su sentido será de atracción cuando las cargas eléctricas sean de signos diferentes y se repelerán cuando las cargas sean de igual signo.

A pesar de que la ley de Coulomb se estableció en condiciones macroscópicas su aplicación es válida incluso en condiciones de microscopía celular, que debida a que su nivel de

organización está estructuralmente compuesto por moléculas y átomos, en donde el núcleo de un átomo está formado por protones quienes tienen carga positiva y neutrones que poseen carga neutra. En la parte exterior del núcleo atómico están los electrones quienes están cargadas negativamente y se encuentran girando en una órbita alrededor del núcleo. Cuando un cuerpo está en un estado eléctrico neutro es debido a que posee igual cantidad de protones y neutrones, pero cuando ocurre una interacción entre dos cuerpos, los electrones de uno pueden pasar al otro, el que recibió un electrón queda cargado negativamente, mientras que el que cedió el electrón quedara cargado positivamente<sup>9</sup>.

En cuanto a las estructuras celulares, el núcleo debido a la presencia de grupos fosfatos en los ácidos nucleicos presente en el ADN, le proporciona a esta una carga eléctrica negativa o aniónico, la cual la hace ser atraída y le permite interactuar con los colorantes básicos de carga positiva o catiónico, tal y como lo describe la ley de Coulomb<sup>10</sup>. De igual forma ocurre con los componentes extra celulares, que debido a la presencia de proteínas ricas en aminoácidos básicos interactúan con los colorantes ácidos de carga eléctrica negativa o aniónico, dotándolo de una coloración característica.

Hoy día existe una amplia gama de colorantes histológicos que pueden ser empleados como auxiliares para la detección del cáncer epidermoide bucal u otras patologías, las cuales se pueden emplear como método sustituto de la técnica rutinaria. Entre las coloraciones más destacadas tanto nucleares como extra nucleares se encuentra el Azul de Toluidina y de Metileno, Floxina y Orange G, que de acuerdo a la carga que poseen cada uno de ellos ya sea positiva o negativa, tiene una afinidad por una estructura tisular en específica<sup>5</sup>.

El Azul de Toluidina (C.I.52040), es un colorante metacromático, acidófilo, soluble, en agua y en alcohol, que tiñe selectivamente los componentes ácidos del tejido, bien sea sulfatos, carboxilatos y los radicales fosfato, esta sustancia de igual manera forma parte del grupo tiazinas el cual agrupa un conjunto de colorantes sulfatados en los cuales dos núcleos bencénicos están unidos por un anillo cerrado que tiene un átomo de thionium. Esta sustancia se ha utilizado ampliamente como un colorante vital para lesiones de la mucosa oral, aplicándose como enjuague bucal con el propósito de teñir específicamente ciertos

componentes de las lesiones displásicas, debido a su propiedad metacromática y a su afinidad por los ácidos nucleicos, la cual permite que se una al material nuclear de los tejidos con un alto contenido de ADN y ARN<sup>11</sup>.

De igual forma, otro de los colorantes nucleares acidófilo es el Azul de Metileno (C.I. 52015), el cual se encuentra muy relacionado con el Azul de Toluidina, debido a que comparten ciertas propiedades que le permite unirse y tener una alta afinidad con el ADN de doble hélice y los grupos fosfato que lo componen, aumentando la intensidad de color con el incremento del material genético, evidenciando así el núcleo celular<sup>5</sup>.

Entre los colorantes ácidos o extra celulares se encuentra la Floxina (CI: 79350), quien es un derivado hidroxixantenico halogenado con tres grupo de arilo, está compuesto por dos átomos y cuatro de bromo por cada molécula. De igual forma posee autofluorescencia espontánea y colorean los tejidos de diversas tonalidades entre rojo y rosa. Esta coloración por lo general se difunde fácilmente entre las estructuras hísticas, sobre todo en las más compactas, a las cuales tiñen por su carácter ácido. La tinción es atraída fuertemente hacia los radicales básicos de la histona, lisina y arsinina presente en las proteínas celulares. Otro de los colorantes ácido que conforma este grupo es la Orange G (CI: 16230), el cual está formado por un cromóforo azoico, compuesto por un radical aromático, dos nitrógenos y otros radicales alifático, el cual de acuerdo con su número de cromóforo presente en sus moléculas se considera dentro del grupo de monoazóico, por presentar solo uno<sup>11</sup>.

A pesar de que puede existir una amplia gama de colorantes histológicos no todos pueden cumplir una misma función, ni emplearse para un mismo objetivo, debido a que existe una series de factores tanto químicos y físicos que lo delimitan o lo determina a cumplir una acción específica. Sin embargo estos reactivos se pueden agrupan no solo por su naturaleza, derivaciones, composición química o sus cargas eléctricas quienes lo clasifican como un colorante ácido o básico, sino que también por las propiedades de afinidad que puedan poseer cada una de ellas hacia un elemento estructural de la célula, convirtiéndose en un colorante nuclear o extra celular según sea su atracción. Para que ocurra un enlace entre ambos elementos ya mencionados debe existir una fuerza de atracción entre cargas eléctricas, las

cuales se dará cuando se encuentren dos energías opuesta en una misma dirección o sino ocurrirá un repele entre ambas cuerpos.

Debido a lo expuesto se ha seleccionado tanto el Azul de Metileno como El Azul de Toluidina como los colorantes nucleares más óptimos para sustituir a la hematoxilina. No solo por cumplir ciertos requisitos indispensables, sino que también debido a su semejanza en ciertos aspectos de afinidad y propiedades características de cada sustancia, como por ejemplo la de denotar perfectamente el materia genético o nuclear de la célula. De igual forma se ha elegido la Floxina y Orange G como colorantes citoplasmáticos alternativos debido a que estos reactivos cumplen con características necesarias semejantes a la Eosina, son los más óptimos y ofrecen un excelente color de contraste.

#### **VENTAJA Y DESVENTAJA DE LOS COLORANTES NUCLEARES Y EXTRA NUCLEARES ALTERNATIVOS PARA LA DEMOSTRACIÓN CARCINOMA EPIDERMOIDE BUCAL**

En cuanto a las ventajas y desventajas de los colorantes nucleares y extra nucleares alternativos para la demostración de carcinoma epidermoide, se puede decir de forma positiva que a través de estas coloraciones se permiten evidenciar claramente la morfología celular sin ser alterada por la composición química de cada sustancia, sin embargo como punto menos favorable se puede resaltar el resultado final de la coloración ya que la muestra histológica tendrá una tonalidad diferente de acuerdo a lo establecido, la cual será distinta a la de la técnica rutinaria a la que el medico patólogo está adaptado, pudiendo causarle confusión de acuerdo a la tonalidad resultante, más no por la morfología tisular. Sin embargo cada colorante trae consigo sus propias ventajas y desventajas.

Tanto el Azul de Metileno como el de Toluidina pertenecen al grupo de los colorantes básicos de composición química, ambos posee la ventaja de tener gran afinidad al núcleo celular, igualmente esta sustancia presenta como punto a favor que no sólo delimita el contorno nuclear sino que también resalta su contenido, presenta un bajo costo y gran facilidad al momento de adquirirlo. Por otra parte sus radicales juegan un papel muy importante en la



coloración trayendo como punto menos favorable la visualización de las estructuras del tejido, por lo que es diferente a la coloración de rutina<sup>11</sup>.

En cuanto a los colorantes que tiñen el citoplasma, tanto la Floxina como el Orange G tienen a su favor la gran similitud con la Eosina en cuanto a las estructuras a la que colorean y de igual forma a las cargas negativas. Ellos derivan del grupo de los xantenos. Por estas características la Eosina podría ser sustituida por cualquiera de estas dos sustancias alternas. Sin embargo, es de gran importancia resaltar las desventajas que estas tinciones químicas presentan, una de ellas es que la Floxina no siempre es de fácil acceso y cuando se encuentra en el laboratorio de histopatología muchos profesionales desconocen su potencialidad y sus diversas aplicaciones, por ejemplo en la demostración de alguna posible patología como es el caso del cáncer epidermoide oral. Por otro lado en el caso de la Orange G le brindará al tejido una tonalidad rojo brillante, que al ser observado al microscopio se notará la diferencia en cuanto al contraste con respecto a la eosina<sup>11</sup>.

En conclusión, estos colorantes histológicos alternos a pesar de tener ciertos factores poco favorables no significa que su uso será limitado o será descartado y que afectará su potencialidad. Cabe destacar que la principal característica negativa que posee viene dada con la tonalidad particular que cada una de las sustancias le transmite a las estructuras celulares, que debido a la no familiarización por parte del médico patólogo con estas nuevas tinciones como método auxiliar en estudios histológicos pudiera causarle por momento cierta confusión, dejando claro que en ningún momento estos reactivos provocarán alteraciones en la morfología de la célula, demostrando de igual manera en comparación a la técnica rutinaria un óptimo desempeño en estudios histopatológicos siendo posible el diagnóstico de una patología.

#### **PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA LA TINCIÓN AUXILIAR Y SU COMPARACIÓN EN LA COLORACIÓN DE LA ESTRUCTURA NUCLEAR Y EXTRA NUCLEAR CON LA TÉCNICA DE RUTINA HEMATOXILINA – EOSINA**

Partiendo de una muestra que ha sido fijada e incluida en parafina, a la cual se le ha realizado cortes en secciones de 5 micrómetros, extendida en baño de flotación y adheridas a un

portaobjeto, se procede a realizar la técnica de coloración rutinaria (H-E), pero debido a la posible ausencia de algunos de estos reactivos esenciales dentro del laboratorio de histopatología se propone un protocolo alternativo con reactivos alternos que sean capaz de sustituir el colorantes ausente y que de igual manera pueda arrojar un buen diagnóstico, cumpliendo así con el propósito de la misma.

El primer paso consiste en pasar la lámina portaobjeto con el corte histológico por dos estaciones de xilol por un tiempo de 10 minutos en cada uno, esto con la finalidad de eliminar el exceso de parafina. Luego de esto, se lleva la muestra a la batería o estación de hidratación con alcohol al 100%, 95%, 85% de pureza por un tiempo de 5 minutos en cada uno, con el fin de hidratar el tejido para que pueda adquirir la tonalidad de la tinción, ya que estos reactivos están compuestos a basa se agua. En el tercer paso se procede a realizar la tinción nuclear con el colorante alternativo ya sea Azul de Metileno o de Toluidina como sustituto de la Hematoxilina, el tejido se dejará en el reactivo por una duración de 5min en el reactivo. El tiempo de exposición a la misma podría variar dependiendo de las condiciones en la que se encuentre la sustancia.

En el cuarto paso se realiza la diferenciación, la cual consiste en lavar la muestra con agua corriente para eliminar el exceso de colorante en el tejido. Como quinto paso se procede a realizar un Dip para teñir con el colorante alternativo extra nuclear de contraste, bien sea Floxina u Orange G como sustitutos de la Eosina, el tiempo de tinción dependerá de igual forma de las condiciones en las que se encuentren dicha sustancia.

Luego de haber teñido las estructuras extra celulares se vuelve a diferenciar la muestra con agua corriente para remover el excedente, luego de esto, en el sexto paso se tiene que pasar la muestra por una batería de deshidratación con la finalidad que eliminar completamente y de forma gradual la cantidad de agua que posea el tejido mediante una batería de alcoholes de 85%, 95%, 90% y dos alcoholes de 100% de pureza por un tiempo de 5 min en cada uno, por último se pasa por dos estaciones de xilol, en la cual la primera de ella se dejara remojar la muestra por 5 min mientras que en la última se quedara permanentemente hasta que se realice el montaje.

Finalmente con este protocolo se busca resolver de alguna manera la ausencia de la Hematoxilina o Eosina de una manera muy sencilla y siguiendo los mismos pasos de la técnica habitual (H-E), solo que cambiando los reactivos mencionado por uno homologo que cumpla los requisitos necesarios para poder suplantarlos y que de igual forma pueda arrojar un resultado correcto.

En la técnica de coloración rutinaria, la Hematoxilina debido a ser una sustancia básica tiñe la estructuras ácidas de la célula como el núcleo. Este reactivo adquiere y tiñe de un color negro o púrpura dicha estructura celular debido a un proceso de oxidación o maduración al aire libre que ocurre al momento de que la sustancia es extraída de la planta *Haematoxylum campechianum*. Con respecto a los colorantes nucleares sustitutos de la técnica rutinaria, estos presentan una variación notoria en cuanto a su tonalidad en comparación con la antes expuesta. La primera de ella es el Azul de Toluidina el cual es un polvo cristalino de color verde y que soluble en agua adquiere una coloración azul violeta, esta se comporta como un colorante ortocromático en presencia de estructuras ricas en grupos aniónicos como las cromatinas, dotando así de un color Azul al núcleo celular. El segundo es el Azul de Metileno que se encuentra en polvo cristalino de color verde oscuro y que al unirse a disoluciones en agua cambia a una tonalidad azul, la cual es el color que tiñe al núcleo celular<sup>5</sup>.

La tinción de contraste por excelencia en los estudios histopatológico es la Eosina quien es colorante ácido sintético derivado de la fluoresceína y que al unirse esta última con ciertos átomos de bromo a su núcleo le confiere un color rosado claro al citoplasma celular o la estructura extra nuclear. En cuanto a las diferencias que presentan los colorantes sustitutos se puede decir que la Floxina la cual es químicamente similar a la Eosina debido a que pertenece al mismo grupo de las fluoresceínas con átomos de bromo unidos a su núcleo, presenta adicionalmente dos átomos de cloro. Físicamente la Floxina es un polvo rojizo que utilizado en solución acuosa al 1%, tiñe el citoplasma de dicho color o rosado. En segundo lugar el Orange G se encuentra en estado sólido de color anaranjado y que en disolución en agua le otorga un color rojo naranja al citoplasma, esto se debe a la unión del colorante con la tirosina y triptófano que no son más que los aminoácidos de las proteínas<sup>5</sup>.

Considerando esto, es claro que se tendrá como resultado una coloración diferente a la tinción rutinaria de Hematoxilina y Eosina en el estudio histopatológico, en donde el núcleo celular independientemente del colorante auxiliar que se emplee bien sea el Azul de Toloudina o de Metileno se denotará de una tonalidad azul oscuro como lo indican los reactivos. Por otra parte en cuanto a la tonalidad de contraste o citoplasmática se puede presentar distintos tonos de colores según sea el reactivo empleado. El citoplasma tomará una coloración roja o rosado claro mediante el empleo de la Floxina o por lo contrario tendrá un color rojo naranja si se usa el Orange G, dejando claro que indiferentemente del color que posea cada elemento de la célula se podrá en evidencia su morfología.

## CONCLUSIONES

La investigación permitió conocer un poco más a fondo acerca de los colorantes auxiliares propuestos en remplazo de la H-E, también las ventajas y desventajas que presentan cada uno de ellos, así como también las diferencias en cuanto a la tonalidad del tejido con los reactivos sustitutos y la técnica rutinaria, dejando claro que a pesar de tener la propiedad de teñir de color diferente las estructuras celulares del tejido no afectara el diagnóstico. De igual manera se conoció la utilidad de cada uno de ellos para la identificación del cáncer epidermoide bucal, la cual se obtuvo mediante el análisis de diversas investigaciones y de la interpretación de información extraída de libros de textos pertinentes al tema. Con estas investigaciones se pudo constatar la eficacia del uso del Azul de Metileno y de Toluidina como colorantes nucleares en el diagnóstico de lesiones orales malignas tanto en estudios in vivo como en histopatológico y Orange G y Floxina en coloraciones extra nucleares.

Basándose en las propiedades físicas y químicas expuestas en las literaturas bibliográficas acudidas y los antecedentes recopilados, se sustenta el empleo de dichos colorantes en estudio histopatológico. Con esto se llega a la conclusión de que tanto el colorante Azul de Metileno y Toluidina pueden ser empleado en estudio histológico reemplazando a la hematoxilina, debido a que estos reactivos poseen las mismas afinidades por estructuras ácidas celulares como el ARN y la doble hélice del ADN del núcleo, específicamente a los grupos fosfato que lo componen, permitiendo de igual forma la visualización de la estructura nuclear sin causar alteración. Igualmente en el caso del Orange G y Floxina se llegó a la conclusión que a pesar que su mayor uso es para coloraciones especiales también se puede emplear como la tinción de contraste o extra celular, empleándose como un sustituto de la Eosina, debido a que tienen en común propiedades químicas que las hacen afines estructuras básicas celulares como por ejemplo a las proteínas citoplasmáticas, permitiendo así su empleo en estudios histológicos.

Partiendo de esta información se propuso un protocolo de coloración con los colorantes alternos siguiendo el mismo mecanismo de la técnica rutinaria, con la finalidad de brindar una herramienta útil al profesional histotecnólogo para solventar la ausencia de uno de los reactivos y no paralizar las actividades en el laboratorio. En conclusión a todo lo expuesto se

logró dar respuesta al objetivo planteado en la investigación, permitiendo demostrar y sustentar mediante otras investigaciones el uso efectivo de estos colorantes en el estudio histopatológico en sustitución de la Hematoxilina o Eosina, los cuales pueden ser empleado eficazmente en los laboratorios de histopatología basándose en el protocolo de coloración expuesto en la presente trabajo.

## **RECOMENDACIONES**

En ausencia de algunas de las sustancias de la técnica rutinaria y basándose en las fuentes bibliográficas ya estudiadas se recomienda el empleo del Azul de Metileno y Azul de Toluidina para coloraciones nucleares en sustitución de la Hematoxilina, así como también el uso Floxina y Orange G para la tinción extra celular en remplazo de la Eosina.

De igual forma, se recomienda al profesional histotecnólogo estudiar e indagar acerca de las sustancias químicas con las que trabaja diariamente, a fin de solventar de una u otra manera la falta de algún reactivo mediante el empleo de un colorante de composición similar.

Por otro lado, en vista de la carencia de información referente a técnicas y coloraciones histológicas alternativas de tinciones establecidas para ciertas patologías, se le recomienda a los profesionales histotecnólogos iniciar proyectos investigativos con el propósito de promover el uso de nuevos métodos de coloraciones sustitutos que sean confiables, eficaces y que no produzcan alteración en los resultados.

Asimismo, en cuanto al área académica se les recomienda a los profesores que imparten la asignatura pertinente al tema de los colorantes y sus prácticas educativas aumentar la exigencia en el aprendizaje del tema ya que al tener una información clara y consistente se puede generar proyectos de investigación en futuras ocasiones.

Por último, se le recomienda al profesional histotecnólogo promover el uso alternativo de dichos colorantes expuesto en los servicios de anatomía patológica, tomando como base la información suministrada en la investigación realizada.

## REFERENCIAS

1. Navarro, C. Cirugía Oral. 1era edición. España: ARAN Ediciones, S.L; 2008
2. Medlineplus.gov [Internet]. Estados Unidos: A.D.A.M Quality; [Actualización 30 oct 2015; citado 08 jun 2016]. Disponible en: <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001035.htm>
3. Paho.org [Internet]. Estados Unidos: OMS, OPS; [actualizado 24 jul 2015; citado 08 jun 2016]. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11034%3A2015-oral-cancers-human-papillomavirus-hpv-increasing&catid=4717%3Afgl-news&Itemid=39620&lang=es](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11034%3A2015-oral-cancers-human-papillomavirus-hpv-increasing&catid=4717%3Afgl-news&Itemid=39620&lang=es)
4. Bvs.gob.ve [Internet]. Anuario de Mortalidad 2011 en Venezuela, Ministerio del Poder Popular para la Salud [Enero 2014; citado 14 jun 2016]. Disponible en: <http://www.bvs.gob.ve/anuario/Anuario2011.pdf>
5. Bosson, E. Montenegro, C. Compendio de Coloraciones Histológicas. Monfort, C.A. 1era edición. Caracas; 2004
6. Chhabra, N. Chhabra, S. y Sapra, N. Diagnostic Modalities for Squamous Cell Carcinoma: An Extensive Review of Literature-Considering Toluidine Blue as a Useful Adjunct. US National Library of Medicine, National institutes of health [Publicado Jun 2015; citado 29 jun 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4444712/>
7. R, Akhtar, S, Balasundari. K, Mala. Methylene blue as an early diagnostic marker for oral precancer and cancer. [Internet]. SpringerPlus [Publicado March 2013; citado jun 29 2016]. Disponible en: <https://springerplus.springeropen.com/articles/10.1186/2193-1801-2-95>

8. Albornoz, C. Barrios, O. Rojas, P. Bastián, L. Y Santana J. Eficacia del Azul de Toluidina y lugol en el Diagnóstico Precoz del Cáncer Bucal. [Internet]. Scielo [Publicado jul 2010; citado 09 jul 2016] Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02552010000400014](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02552010000400014)
9. López, V. Electromagnetismo I. 1era edición. UNED. Madrid; 2013.
10. Rodríguez, G. Garesse, R. ¿Hablamos de gen o más?. 1era edición. ELITE. Madrid; 2007.
11. Garcia, R. Laboratorio de anatomia patológica. Interamericana McGraw hill s/f.