



IV CONGRESO VIRTUAL HISPANOAMERICANO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

Presentación

*Volver al
Índice*

*Volver al
Inicio*

Conferencia Invitada:

**"ELIMINACIÓN DEL MOCO EN
BRONCOASPIRADOS POCO
CELULARES. Descripción de una
nueva técnica que no altera a la
morfología celular ni a la
inmunocitoquímica"**

Ana M. Puig Rullán*, Fernanda Relea Calatayud*,
Soledad del Campo Rodríguez (TAP)*, M. José
Navajas (TAP)*, Marta Arteta Jiménez (Farmacia
Hospitalaria)**, José Miguel Urra Ardanaz***

*Servicio de Anatomía Patológica (Hospital Santa Bárbara. Ciudad
Real)

** Farmacia Hospitalaria (Hospital Santa Bárbara .Ciudad Real)

***Sección Inmunología (Complejo Hospitalario. Ciudad Real)

simarro@cim.es

INTRODUCCION

Uno de los problemas habituales en la tecnología de
los broncoaspirados remitidos por los Servicios de

Neumología deriva de la gran cantidad de moco que presentan estas muestras. Este moco dificulta la obtención de muestras suficientemente celulares.

Siempre hemos creído que en este moco quedan atrapadas células, lo cual impide que las extensiones que obtenemos después de los citocentrifugados sean en muchas ocasiones poco celulares.

Procesábamos habitualmente los broncoaspirados tomando una cantidad abundante y centrifugábamos este material a 1500 revoluciones durante 15 minutos en una citocentrífuga, posteriormente fijábamos los extendidos en alcohol de 96° y procedíamos a la tinción de las extensiones con el método de Papanicolau.

Objetivo:

Pensamos que si conseguíamos diluir el moco bronquial obtendríamos muestras mas representativas. En primer lugar estudiamos la posibilidad de utilizar la alfatripsina para eliminar el moco de los broncoaspirados. Para conseguir una correcta dilución del moco del broncoaspirado con solución de alfatripsina precisábamos 0,5 ml de la misma, el elevado precio de la alfatripsina y la frecuencia de recepción de estas muestras nos hizo descartar esta hipótesis.

Nos planteamos la posibilidad de utilizar un compuesto mucolítico y elegimos la N-Acetil-L-Cisteina (Fluimicil), cuya presentación comercial es en solución al 10% en ampollas de 3 ml. El precio por ampolla es de 50 ptas.

La fórmula química de la Acetilcisteína (N-acetil-L-Cisteína) es: $C_5H_9NO_3S$, su peso molecular es 163,20. Solubilidad: 1 en 5 de agua y 1 en 4 de alcohol; es prácticamente insoluble en cloroformo, en diclorometano y en éter.

Presentación comercial: Solución al 10% (ampollas de 3ml.) Acción y Mecanismo: Mucolítico que reduce la viscosidad de las secreciones por desdoblamiento de los puentes disulfuro.

Método:

Decidimos utilizar la siguiente metodología en el procesado de los broncoaspirados.

1. - Método habitual descrito en la introducción
2. - Procesado de los broncoaspirados utilizando el Fluimucil.

Según la cantidad de BAS recibido tomamos 3 partes de la muestra objeto de estudio y una parte de Fluimucil en un tubo de ensayo dejando actuar el mismo durante 30 segundos aproximadamente. Posteriormente añadimos 2 partes de agua destilada y homogeneizamos la dilución

La medición de cada una de las partes se realiza mediante una pipeta graduada. Toda esta solución se centrifuga en una citocéntrifuga durante 10 minutos a 1000 r.p.m.

Decantamos el sobrenadante y antes de separar el porta objetos de la cámara añadimos unas gotas de alcohol de 96° dejando actuar durante 2

minutos.

Posteriormente retiramos el portaobjetos de la cápsula y fijamos la muestra en alcohol de 96°.

A continuación procedemos a la tinción de los extendidos, deshidratación y montaje de los mismos.

Efecto de la N-Acetil-L-Cisteina sobre Inmunohistoquímica

Para evaluar el efecto del Fluimucil sobre los anticuerpos en su uso en inmunofluorescencia hemos realizado dos tipos de pruebas. Inicialmente se preparó la solución de trabajo (1,5ml. de fluimucil+2ml. de agua).

1- Inmuno fluorescencia indirecta: Se utilizaron 3 sueros positivos para anticuerpos antinucleares (ANA) de diferentes patrones y con títulos diferentes, y portas con células Hep-II (células de un tumor de piel que se utiliza para determinar ANA porque tienen un núcleo enorme. Se realizaron cuatro pruebas con cada suero en diferentes pocillos del porta.

- ≈ a-Incubación previa de las Hep-II con la solución de trabajo, para ver si afectaba al tejido fijado al porta.
- ≈ b-Dilución del suero en la solución de trabajo, para ver si afectaba al anticuerpo presente en el suero.
- ≈ c-Incubación con la solución de trabajo tras incubar con el suero y antes de incubar con anti-IgG humana marcada con fluorescencia, para comprobar si altera el anticuerpo una vez unido al tejido.

◀ d-Control utilizando la técnica normal

2. - Citometría de flujo: La citometría básicamente es una inmunofluorescencia directa, pero realizada en una suspensión de células en vez de en material fijado a un porta.

En este caso se diluyeron dos muestras, sangre total, 3.1 con la solución de trabajo.

Posteriormente realizamos la técnica de marcaje con dos anticuerpos monoclonales (CD3 y HLA-B27), uno marcado con FITC (verde) y al otro con PE (rojo). Como control utilizamos las muestras diluyéndolas con agua. Los informes del citometro realizados en una muestra B27 + y en otra B27-, el Fluimucil no afectó al resultado en cuanto al porcentaje de células CD3. Las diferencias no fueron significativas, fueron las típicas de diferencias entre ensayos.

Resultados:

Hemos procesado de esta forma 60 Broncoaspirados de los cuales 50 eran varones y 10 mujeres, cuyas edades oscilaban entre 24 a 76 años, siendo la edad de mayor incidencia entre 60 a 71 años.

Inmunofluorescencia indirecta

No hubo alteración ni del patrón de fluorescencia ni del título de anticuerpo con ninguno de los sueros ni en ninguna de las pruebas realizadas en la inmunofluorescencia indirecta

Citometría de Flujo

No hubo diferencias con respecto a los controles ni en integridad celular ni en el marcaje con los

monoclonales. La solución no afecta a la actividad de los anticuerpos monoclonales

Conclusiones:

En todos los casos hemos obtenido más celularidad que con el método habitual y con ello el número Broncoaspirado insuficientes ha disminuido.

La N-Acetil-L-Cisteina no altera la morfología celular en microscopia óptica, ni ocasiona alteraciones que puedan afectar a los estudios de inmunofluorescencia ni a los de citometria de flujo.