



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



**TÉCNICAS DE COLORACIÓN HISTOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
CANDIDAS**

**AUTORES:**

**BELLERA DANIELA  
GARCÍA ANTONIO  
GONZÁLEZ IBET  
PUENTE JEIDI**

**TUTOR:**

**ARGÜELLO ALCIRA**

**Bárbula, octubre 2016**



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



**CONSTANCIA DE ENTREGA**

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

**TÉCNICAS DE COLORACIÓN HISTOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
CANDIDAS**

Presentado por los Bachilleres:

Daniela Bellera. C.I: 20.386.264  
García Antonio. C.I: 24.942.694  
González Ibet. C.I: 20.967.719  
Puente Jeidi. C.I: 22.548.519

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 2016.

Alcira Argüello

C.I. N°: 4.463.121

---

Firma



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



**CONSTANCIA DE APROBACIÓN**

Los suscritos miembros del jurado designado para examinar el Informe Monográfico titulado:

**TÉCNICAS DE COLORACIÓN HISTOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CANDIDAS.**

Presentado por los bachilleres:

Daniela Bellera. C.I: 20.386.264  
García Antonio. C.I: 24.942.694  
González Ibet. C.I: 20.967.719  
Puente Jeidi. C.I: 22.548.519

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

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

\_\_\_\_\_  
Profesor

\_\_\_\_\_  
Profesor

\_\_\_\_\_  
Profesor



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS  
DIRECCIÓN DE ESCUELA  
COMITÉ DE INVESTIGACIÓN Y PRODUCCIÓN  
INTELLECTUAL**



**CONSTANCIA DE APROBACIÓN**

Quien suscribe Profa. Lisbeth Loaiza, directora de escuela, Profa. Sandra Planchart, coordinadora del comité de investigación y producción intelectual de la escuela, hacemos constar que una vez obtenidas las evaluaciones del tutor, jurado evaluador del trabajo en presentación escrita y jurado de la presentación oral del trabajo final de grado titulado:

**TÉCNICAS DE COLORACIÓN HISTOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CANDIDAS.**

Presentado por los bachilleres:

Daniela Bellera. C.I: 20.386.264  
García Antonio. C.I: 24.942.694  
González Ibet. C.I: 20.967.719  
Puente Jeidi. C.I: 22.548.519

Presentado como requisito para obtener el título de Técnico Superior Universitario en Histotecnología, el mismo se considera APROBADO.

En Bárbula a los veinticinco días del mes de octubre del año dos mil dieciséis

\_\_\_\_\_  
Profa. Lisbeth Loaiza

Directora

Sello

\_\_\_\_\_  
Profa. Sandra Planchart

Coordinadora



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



TÉCNICAS DE COLORACIÓN HISTOLÓGICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE  
CANDIDAS.

**AUTORES:**

BELLERA DANIELA  
GARCÍA ANTONIO  
GONZÁLEZ IBET  
PUENTE JEIDI

**TUTOR**

ARGÜELLO ALCIRA

**RESUMEN**

La candidiasis en mucosas y piel son las enfermedades más frecuentes, de las que llegan al laboratorio de anatomía patológica, y las técnicas de tinción necesarias para una correcta identificación son, la Hematoxilina-eosina que, es un colorante de rutina que se puede utilizar para observación de especies de Candidas, siendo un método viable que nos facilitará la obtención de resultados confiables y eficaces, entre los métodos especiales más específicos, se encuentra la Metenamina-plata de Grocott. El **objetivo general** de esta investigación es analizar las técnicas de coloración para la identificación de Candidas en cortes histológicos y, en cuanto a los **objetivos específicos**, describir las características histológicas de las Candidas, analizar las diferentes técnicas de coloración existentes para la determinación de Candidas en cortes histológicos y determinar la importancia de la técnica de coloración que se utiliza para la identificación de las Candidas. Metodológicamente esta investigación es de tipo documental bibliográfica. Se concluye, que la Hematoxilina-eosina, nos ofrece excelentes resultados a través de su uso, brindando la facilidad para poder resaltar los detalles de los respectivos especímenes y proporcionando resultados donde se exponen suficientemente visibles sus estructuras, al igual, como lo es el caso de la utilización de tinciones especiales con metenamina de plata (Grocott).

**Palabras claves:** Coloración, Candidas, Grocott, Hematoxilina-eosina.

**Línea de investigación:** Método diagnóstico.



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



**HISTOLOGICAL STAINING TECHNIQUES FOR IDENTIFICATION OF  
CANDIDA**

**AUTORES:**

BELLERA DANIELA  
GARCÍA ANTONIO  
GONZÁLEZ IBET  
PUENTE JEIDI

**TUTOR**

ARGÜELLO ALCIRA

**ABSTRACT**

Candidiasis in the mucous and skin are the most common illnesses treated at the Pathology anatomy laboratory. The staining techniques necessary for a correct identification are: Hematoxylin-eosin: It is a commonly used dye that can be applied to the *Candida Albicans*. This is a viable method which can facilitate trustworthy and efficient results. The most specific methods are Grocott's Methenamine-silver. The main objective of this summary is to analyze the staining techniques for *Candida Albicans*'s identification in histological cuts. As far as the specific goal is concerned, the idea is to describe the histological characteristics of the *Candida Albicans*. Furthermore, to analyze the different staining techniques in existence to determine the *Candida Albicans* in histological cuts. Also, to see the importance of the use of staining techniques in order to identify the *Candida Albicans*. Regarding the methodology, this investigation is a document type bibliography. The conclusion we draw from this is that using Hematoxylin-eosin offers excellent results. It also allows us the opportunity to outline the specimen's details. Moreover, it provides the results in which the visible structures are exposed. The same happens with the use of a particular staining like methenamine silver (Grocott)

**Key Words:** Staining, *Candida Albicans*, Grocott, Hematoxylin-eosin.

**Investigation Line:** Diagnosis Method.

## ÍNDICE

CONSTANCIA DE ENTREGA.....	ii
CONSTANCIA DE APROBACIÓN .....	iii
CONSTANCIA DE APROBACIÓN .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
DESARROLLO.....	11
Antecedentes de la Investigación.....	11
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA CANDIDA.....	14
DIFERENTES TÉCNICAS DE COLORACIÓN.....	15
La Metenamina-plata de Grocott.....	15
Coloración de Hematoxilina-eosina.....	17
IMPORTANCIA DE LA TÉCNICA CON HEMATOXILINA-EOSINA Y GROCOTT ....	18
CONCLUSIONES.....	19
REFERENCIAS.....	21
ANEXOS .....	23
Pueden visualizarse hifas Técnica de Grocott. ....	23
Presencia de numerosas hifas irregulares con esporas ovales más gruesas (Grocott).....	23
AGRADECIMIENTOS .....	24

## INTRODUCCIÓN

Para estudiar la estructura de las células, tejidos y órganos que constituyen los componentes del cuerpo humano y organismos pluricelulares, el hombre ha desarrollado diversos métodos y técnicas; ha ido perfeccionando los instrumentos necesarios para conocer con más profundidad la morfología y función de los diferentes niveles de organización de la célula. Por lo tanto, se dispone de algunos métodos, técnicas e instrumentos para llegar a estos conocimientos. La mayoría de los tejidos, son incoloros y por ello necesitamos teñirlos para observar sus características morfológicas. Así, las diferentes técnicas y procedimientos, nos permitirán fundamentar respuestas inmediatas para lograr un diagnóstico oportuno de las alteraciones anatomopatológicas.<sup>1</sup>

Las tinciones generales están basadas en el uso de colorantes, sustancias mediante las cuales se consigue colorear a los tejidos. Ahora bien, los colorantes, se utilizan normalmente para teñir las células y componentes tisulares que van a ser observados con el microscopio óptico. Según la naturaleza química, los colorantes se clasifican en: básicos, los cuales son sales cuya base aporta el color, mientras que la parte ácida es incolora. Los colorantes básicos, tienen afinidad por sustancias ácidas del tejido como el ADN o ciertos componentes de la matriz extracelular como los glicosaminoglicanos, así como ciertas matrices extracelulares ricas en componentes ácidos. Ejemplos de colorantes básicos son la tionina, safranina, azul de toluidina, el azul de metileno o la hematoxilina. Los colorantes ácidos, son sales con el anión coloreado y la base incolora. Tienen afinidad por sustancias básicas, sobre todo estructuras proteicas localizadas en el citoplasma celular y también por el colágeno de la matriz extracelular. Ejemplos de colorantes ácidos son la fucsina ácida, verde rápido, naranja G o la eosina.<sup>2</sup>

Los colorantes neutros, poseen una porción ácida y otra básica, ambas con capacidad para aportar color. Por tanto, un mismo colorante puede teñir tanto las



estructuras básicas como las ácidas de los tejidos. Por ejemplo, el eosinato de azul de metileno y los colorantes indiferentes, realmente no se unen a elementos de los tejidos por afinidad química sino porque se disuelven en ellos. Por ejemplo, el colorante Sudán se disuelve en los lípidos y por tanto teñirá los elementos de naturaleza lipídica, especialmente en los adipocitos. La Tinción en general, más comúnmente usada en histología es la hematoxilina-eosina sobre cortes de parafina. Como vemos se usa un colorante básico y otro ácido para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula.<sup>2</sup>

Hay una gran variedad de tinciones, que se han ido desarrollando para la detección de los diferentes agentes infecciosos en los que se incluyen bacterias, parásitos y hongos. Hay técnicas tintoriales específicas de gran utilidad, como la tinción de Ziehl-Neelsen, que se utiliza para el diagnóstico de enfermedades crónicas como la tuberculosis o la actinomicosis, o la tinción de azul de lactofenol, que preserva e identifica a los componentes estructurales de los hongos. Las diferentes tinciones en el laboratorio microbiológico tienen una utilidad fundamental para el diagnóstico y tratamiento oportuno de múltiples patologías de etiología infecciosa.<sup>3</sup>

Ahora bien, la candidiasis es una micosis causada por diversas especies de levaduras del género *Candida*. Cualquier tejido puede ser afectado por lo que se presentan diversos cuadros clínicos, cada uno de ellos asociado directamente al estado inmunológico del paciente. La candidiasis en mucosas y piel son las más frecuentes, mientras que las sistémicas son de evolución aguda o crónica y generalmente severas. En estudios anatomopatológicos, la citología e histopatología, pueden demostrar los elementos parasitarios. Y además las coloraciones utilizadas son, la tinción hematoxilina-eosina, y también se recomienda el uso de P.A.S, Papanicolau y tinciones argénticas: Gomori, Grocott o Gridley.<sup>4</sup>

Con respecto a lo anterior, se debe tener en cuenta que existen numerosas clases de hongos que producen enfermedades en humanos, plantas y animales. Para su detección deben utilizarse las distintas coloraciones de acuerdo a su localización.

Entre las tinciones que pueden ser utilizadas encontramos las siguientes: tinciones simples: se basa en la afinidad del colorante por los componentes celulares. Estas utilizan un solo colorante, safranina, azul de lactofenol, anaranjado acridina y tinción de eritrosina. Tinciones diferenciales: son técnicas que utilizan dos o más colorantes, Ziehl-Neelsen, técnica de Schiff, tinción de Giemsa y Wright. Tinciones especiales: se utilizan para colorear y aislar partes específicas de microorganismos, como endosporas y flagelos, y para detectar la presencia de cápsulas, tinción negativa con tinta china, tinción de esporas, tinción de Gomori-Grocott, blanco de carcoflour, negro de clorazol.<sup>5</sup>

Es por ello que el objetivo general de esta investigación es analizar las técnicas de coloración para la identificación de Candidas en cortes histológicos y, en cuanto a los objetivos específicos, podremos describir las características histológicas de las candidas, analizar las diferentes técnicas de coloración existentes para la determinación de Candidas en cortes histológicos y determinar la importancia de la técnica de coloración que se utiliza para la identificación de las Candidas, así lograremos mejoras en cuanto al conocimiento necesario acerca de las distintas tinciones que deben de ser utilizadas para la detección de hongos tipo Candida, ya que la candidiasis en mucosas y piel son las enfermedades más frecuentes, de las que llegan al laboratorio de anatomía patológica.

## DESARROLLO

### Antecedentes de la Investigación

Bocaranda, A (2012) tuvo como objetivo en su trabajo determinar la frecuencia de infecciones vaginales en embarazadas a las consultas de control prenatal de la Maternidad “Dr. Armando Castillo Plaza”. La investigación fue de tipo experimental, de campo, prospectiva, transversal. La población estudiada estuvo constituida por 144 mujeres embarazadas entre 15 y 40 años con síntomas de infección vaginal. Los datos se recopilaron a través de la historia y el registro de resultados de la citología cervico-vaginal y del cultivo de secreción vaginal de las pacientes embarazadas. Los resultados arrojaron que 47,9% de las gestantes tenían entre 15 y 22 años de edad, habitantes en su mayoría del Municipio Maracaibo, que viven en casas-quintas o ranchos con 58,3% de estrato socioeconómico III.

Los signos y síntomas encontrados se correspondieron en su mayoría con los resultados de citología y del cultivo bacteriológico para candidiasis, vaginosis bacteriana y trichomoniasis, pero también se identificaron entidades mixtas. Así mismo, al menos una cuarta parte de las valoraciones médicas como entidades patológicas fueron negativas al cultivo bacteriológico. Como microorganismos responsables de las entidades patógenas se aislaron la *Candida sp*, *Gardnerella vaginalis*, y *Trichomonas vaginalis*, lo cual coincide con la literatura y se consiguieron además *Stephanoascus ciferrii*, *C. lipolytica*, *C. Famata*, *C. tropicalis*, *haemophilus haemolyticus* y *Staphilococcus aereu*.<sup>6</sup>

García, L (2014) quien expuso su trabajo, en el cual, presentó como objetivo, evaluar la actividad antifúngica “in vitro” de 5 derivados de triazol empleando las técnicas de microdilución en placa propuesto por el CLSI documentos M27-A3 para levaduras del género *Candida* y determinar su concentración mínima inhibitoria” donde da a conocer que, para la identificación por microscopía óptica, un raspado o frotis de la

zona afectada se coloca en un portaobjetos de un microscopio. Luego se le añade a la muestra una sola gota de solución de hidróxido de potasio (KOH) al 10%.

El KOH disuelve las células cutáneas, pero deja las células *Candida* intactas, permitiendo la visualización de pseudohifas y las células de la levadura en ciernes típico de muchas especies de *Candida*. La identificación de las levaduras de importancia médica se basa en su morfología, incluyendo estructuras tales como: cápsula, tubo germinativo, clamidosporas, artrosporas, blastosporas, pseudohifas, hifas, ascosporas y basidiosporas, entre otras. Para mejorar la observación se puede realizar tinción, para buscar la fase parasitaria de la levadura, entre las tinciones más comunes se encuentran el azul de algodón-lactofenol, blanco de calcoflúor y la tinción de Gram que es la más fácil, rápida y económica además de confiable.<sup>7</sup>

Es por ello que este trabajo brinda un soporte a la investigación, aportando información acerca de que la *Candida* es un microorganismo el cual, puede diagnosticarse haciendo la utilización de colorantes de rutina.

González, X; Correnti, M Rivera, H; Perrone, M (2009) quienes presentaron su trabajo, desarrollaron como objetivo, determinar la prevalencia de la infección por este hongo en lesiones de Leucoplasia Velloso Bucal en un grupo de pacientes con VIH+ en una muestra de la población venezolana, en la que dicha investigación fue de tipo experimental, indicando así, que la infección por *Candida albicans* se determinó mediante biopsias de las lesiones, para su estudio histopatológico empleando dos técnicas diferentes, coloración de Pass, método de Grocott, y cultivo microbiológico en medio Agar Sabouraud. En la presente investigación se incluyeron 21 pacientes adultos VIH+, con lesiones clínicas de Leucoplasia Velloso Bucal, 11 bajo terapia antiretroviral y 10 sin terapia, y 10 pacientes adultos VIH- con lesiones hiperqueratósicas de la mucosa bucal. Obteniendo como resultados en pacientes VIH, según los distintos métodos empleados se pudo observar que mediante el cultivo en Agar Sabouraud 6/21 (29%) de los pacientes fueron positivos y 15/21 (71%) fueron negativos. Con respecto a la coloración de Grocott, todos los 21 pacientes fueron positivos, mientras que con la coloración de PAS, 17/21 (81%) de

los pacientes fueron positivos y 4/21 (19%) fueron negativos. En el caso de los pacientes VIH- con leucoplasia bucal, 1/10 (10%) resultó positivo mediante el cultivo en Agar Sabouraud y 9/10 (90%) fueron negativos. Mediante la coloración de Grocott todos los pacientes (10) fueron negativos para la presencia del hongo, e iguales resultados fueron obtenidos con la coloración de PAS, provenientes del Centro para la Atención de Pacientes con Enfermedades Infectocontagiosas de la Facultad de Odontología de la Universidad Central de Venezuela. Se excluyeron de este estudio pacientes con lesiones blancas previamente diagnosticadas como liquen plano bucal.<sup>8</sup>

Puras A; Montes M; Fernández P; López A (2000) en su investigación, tiene por objetivo realizar una revisión de la problemática actual del tema, referido a las micosis graves que con mayor frecuencia encontramos en nuestro entorno. Donde además señalan las técnicas de tinción necesarias para una correcta identificación de las características del hongo, las cuales son: hematoxilina-eosina y de modo más específico, metenamina-plata de Gomori o Grocott y ácido periódico de Schiff (PAS); otra técnica de plata, de Masson-Fontana, ha demostrado ser más útil que otras para la identificación de las características de los hongos dematiáceos (hongos pigmentados), causantes con frecuencia de la sinusitis fúngica alérgica, ya que tiñen su pared y la contrastan mejor. Estos hongos están presentes en el moco eosinófilo laminado, procedente de los senos paranasales; estas muestras de material mucoide, sin tejido, deben ser teñidas siempre, para detectar las formaciones micóticas. A su vez, enuncian que para estudiar esta respuesta tisular, que puede ser de expresión variable, utilizar además de la hematoxilina-eosina ya citada, el tricrómico de Masson o Van-Giesson. Para teñir fibras elásticas e identificar así los vasos trombosados podemos utilizar la tinción de elastina o la de Van-Giesson-elastina. Ante una necrosis caseosa debe realizarse la técnica de Ziehl-Nielsen, para descartar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistente.<sup>9</sup>

## CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LA CANDIDA

Los hongos son células eucariotas, por lo tanto, poseen un núcleo con membrana nuclear, nucleolo y varios cromosomas. También poseen mitocondrias, retículo endoplasmático, ribosomas, vacuolas y otras inclusiones. Su membrana citoplasmática contiene fosfolípidos y una elevada cantidad de esteroides, especialmente ergosterol. La pared celular es rígida, la protege de los cambios de presión y determina su forma; no contiene peptidoglicano. Está compuesta por cadenas largas de polisacáridos como la quitina y glucanos, varias capas de carbohidratos y lípidos que tienen importancia en la patogenicidad del hongo ya que media la adhesión de este a la célula del huésped y activa la cascada del complemento, provocando una respuesta inflamatoria.<sup>10</sup>

Dentro de las especies fúngicas causantes de enfermedades se encuentra la Candida, esta suele presentarse como una célula oval con un tamaño medio de 2 a 4 micras; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas cuyos extremos presentan diámetros de 3 a 5 micras. Para lograr una mejor comprensión sobre este tipo de hongo, principalmente, debemos de tener conocimientos acerca de su morfología y también de sus distintas ubicaciones corporales, donde puede encontrarse situada dicha patología, ya que, a través ello, se logra determinar de mejor manera los tipos de técnicas que deben de ser utilizadas para el análisis de la misma, y así, logrando una mejor apreciación. Además, la obtención de resultados satisfactorios en cuanto a la detección precisa de este espécimen. Una vez conocida su estructura, nos permitirá realizar la escogencia y utilización de técnicas específicas para este tipo de hongo.<sup>11</sup>

## **DIFERENTES TÉCNICAS DE COLORACIÓN**

A través de los años, las técnicas de tinción necesarias para una correcta identificación de las características de los hongos, se encuentran: Hematoxilina-eosina que es un colorante de rutina que se puede utilizar en la Candida y entre los métodos especiales más específicos, se encuentra la Metenamina-plata de Grocott, las mismas, han sido de gran ayuda para la detección de distintos tipos de hongos, entre ellas, se destacan algunas técnicas especiales, sin embargo, tales variedades de métodos se han podido ir reduciendo a solo las más puntuales y necesarias brindándonos resultados más precisos y eficaces.

### **La Metenamina-plata de Grocott**

En este caso se resaltaré el uso de una de las técnicas especiales llamada Grocott. Dicha técnica consta de los siguientes procesos:

Se realiza una observación macroscópica que permite observar cambios histopatológicos en el espécimen, se reciben generalmente en un medio fijador como lo es al formol al 10%. Como selección, nos referimos al seccionamiento de las piezas de biopsia realizando una serie de cortes seriados, con el objeto de determinar las áreas más representativas de las lesiones, para su procesamiento en vistas a un estudio microscópico en detalle. Este paso será imprescindible en el caso de especímenes de gran tamaño. Se procederá a deshidratar el tejido, para poder incluirlos en parafina. Los tejidos deben adquirir una consistencia firme para poder ser seccionados en cortes muy finos. La parafinación es la metodología más usada. Por otra parte, se debe incluir y orientar el tejido en el bloque de manera correcta. Los cortes del bloque pueden realizarse de forma seriada o a demanda. Estas secciones, de entre 2-3  $\mu\text{m}$  de grosor, se depositan sobre portaobjetos para su tinción. Luego la muestra deberá mantenerse en la estufa durante 30 min. a 60°. <sup>12</sup>

Posteriormente, se deben sumergir en xilol durante 10 o 15 min. Luego, debe sumergirse el espécimen en alcohol absoluto con una duración aproximada de 5 min, después en alcohol 96% por 5min y una vez más en alcohol 70% por 5min. Lavar en H<sub>2</sub>O destilada.

Colocar ácido crómico al 10% sobre la muestra durante 15 minutos, luego lavar con agua corriente. Si se utilizan cortes histológicos parafinados, oxidar con ácido crómico al 5% (p/v) durante 1 hora, posteriormente lavar 10 minutos con agua corriente y enjuagar con agua destilada. Si se observa la muestra de color amarillo, agregar bisulfito de sodio al 1% (p/v) durante 1 minuto, esto es para eliminar el exceso de ácido crómico. Lavar con agua destilada 4 o 5 veces. Sumergir en la solución colorante de metenamina-plata y calentar en microondas a una potencia de 60% durante 20 segundos, 5 o 6 veces hasta que la muestra tome color pardo. Si no se dispone de microondas agregar solución colorante sobre la muestra y calentar con hisopo hasta obtener un color pardo u dorado. Lavar con agua corriente, agregar tiosulfato de sodio al 2% durante 2 a 5 minutos, para eliminar el exceso de plata, finalmente lavar con agua corriente y contra colorear con solución de verde luz diluido 1/20 durante 5 minutos. Deshidratar con alcohol de 96%, posteriormente alcohol absoluto y por último xilol, dejar secar y montar.<sup>13</sup>

Una vez conocida la técnica de Grocott, debemos tener en cuenta que, a parte, existen varios métodos de tinción que se han desarrollados para observar componentes celulares y tisulares, la tinción empleada más a menudo es una coloración compuesta por dos colorantes como lo son la hematoxilina-eosina, la cual, es una combinación de sales de aluminio, hierro, cromo y cobre, que permite una tinción nuclear excelente, un beneficio es que esta tinción puede ser combinada con muchos otros procesos para teñirse, además de que usa un colorante básico y otro ácido para teñir de diferentes colores diversas estructuras de la célula. Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones, como es el desaparafinado, y la



hidratación, puesto que estos colorantes son hidrosolubles. Los núcleos aparecen de color violáceo gracias a la hematoxilina y el citoplasma de color rosado por la eosina.

### **Coloración de Hematoxilina-eosina**

El procedimiento de coloración de Hematoxilina-eosina es el siguiente:

Desparafinar los cortes sumergiendo el tejido dos veces en recipientes con xilol por un tiempo de 3 minutos cada uno. Luego hidratar los cortes en baños decrecientes de alcohol de la siguiente manera: 100%, 100%, 95%, 95%, 70% cada uno, durante 3 minutos, luego se procederá a lavar con agua corriente por 5 minutos, después por agua destilada (2 baños), con una duración de 1 minuto cada uno. Colorear con la solución de hematoxilina, en este paso es conveniente respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Dependiendo de la fórmula de preparación el tiempo puede variar de 3 a 20 minutos. Lavar en agua destilada (2 baños), un minuto cada uno. Diferenciar, para eliminar el exceso de colorante, se emplea el alcohol ácido, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean los únicos que permanezcan teñidos, luego, se procede a lavar en agua corriente por 2 minutos. Colorear con una solución alcohólica o acuosa de eosina de 3 a 5 minutos. Deshidratar en baños crecientes de alcohol etílico, en alcoholes de 70%, 95%, 95%, 100%, por un minuto y el último alcohol al 100%, durante 2 min. Se aclara la muestra empleando xilol por 1 min, luego, por otro recipiente de xilol, por 2 min. Finalmente se realiza el montaje, este procedimiento consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en xilol (resina natural como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.<sup>14</sup>

## **IMPORTANCIA DE LA TÉCNICA CON HEMATOXILINA-EOSINA Y GROCOTT**

Una vez comparadas estas coloraciones, podemos inferir en que, la técnica de Grocott nos aporta resultados más precisos y eficaces, poniendo en manifiesto la presencia de hifas y blastosporas que se ramifican en las capas superficiales del epitelio, a su vez, colorea sus paredes, debido a la afinidad con los polisacáridos, otra de sus ventajas es la de teñir a los hongos muertos, situación que no ocurre con el PAS y otras coloraciones histológicas. Por otra parte, se debe acotar que, entre las técnicas de tinción más resaltantes y necesarias se encuentra la Hematoxilina-eosina, la cual, igualmente puede ser utilizada para la observación de la Candida en muestras histológicas, siendo esta una de las más adecuadas, debido a que la misma, resulta muy útil para visualizar la respuesta tisular en infecciones, así como también permite diferenciar entre colonización e invasión, y a su vez, tiñendo las paredes de las levaduras.

## CONCLUSIONES

Las especies del género *Candida*, son la causa más frecuente de infecciones fúngicas invasivas en las personas, las cuales, se manifiestan de manera aguda, subaguda o crónica en la piel, mucosas, y muy raramente, puede encontrarse en vísceras o generalizada. Dependiendo de la localización de las lesiones, las mismas se van estableciendo a consecuencia de un incremento de la población local de *Candidas*, generando daños en la piel o mucosa. El agente causal es la *Candida albicans* y otras especies. Estos hongos crecen como levaduras ovaladas en gemación. Forman pseudohifas cuando las yemas o gemaciones continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas. Las formas mucocutáneas a menudo se encuentran relacionadas con defectos en la inmunidad celular.

Como puede observarse, aproximadamente un 90% de episodios de vaginitis, son provocados por *Candida albicans*, y para ello, se han creado diferentes técnicas de coloración, permitiendo la detección de la misma, entre ellas, la utilización de coloraciones especiales, ej. La técnica de Grocott que, es de gran utilidad al emplearla en las respectivas muestras, logrando la visualización de distintas estructuras necesarias para la identificación del tipo de hongo, evidenciando así, estructuras como la reticulina, membranas basales, mucinas y glucógeno, otorgándole a estas un color negrozco, mientras que, su núcleo con una tonalidad marrón oscuro y, el fondo dependerá según la tinción de contraste utilizada.

Pero, aun así, muchas veces pueden encontrarse laboratorios los cuales no cuentan con este tipo de reactivo, debido a diversas problemáticas, bien sea, porque no pueden hallarse estas sustancias en el interior del país y, al solicitar su importación puede ser de alto costo, es por ello que, en muchos laboratorios histopatológicos suelen hacer el uso de un colorante más factible, como lo es la Hematoxilina-eosina, una técnica bastante habitual, de la que pueden obtenerse resultados precisos y favorables, brindando la misma veracidad y, siendo esta mucho más económica.

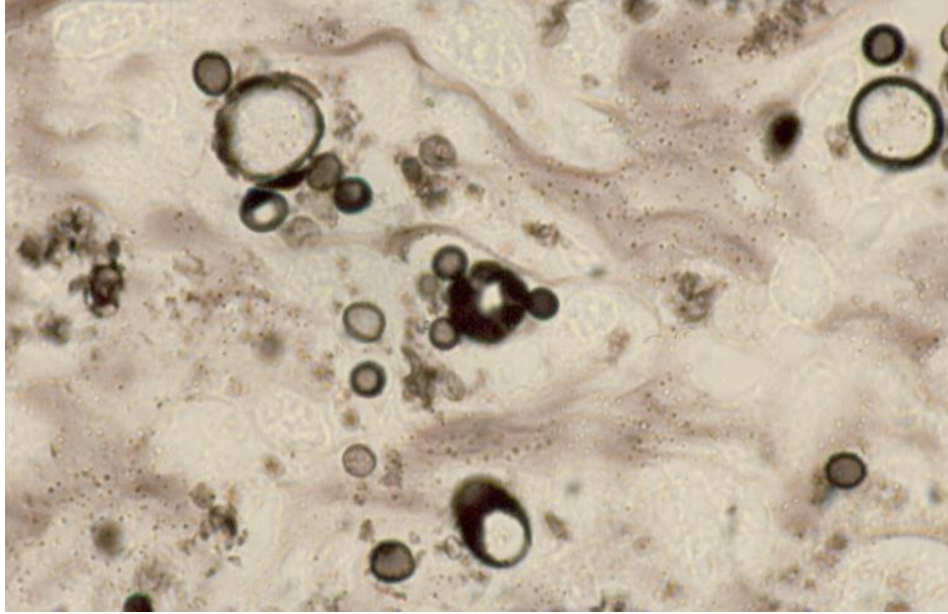
Una vez analizadas las técnicas existentes y desarrolladas para la detección de hongos, se pudo dar a conocer a través de ello, que a pesar de las restricciones que puedan existir para la adquisición de colorantes especiales, estas limitaciones se pueden superar haciendo la utilización de tinciones más factibles, como la Hematoxilina-eosina, que de igual manera, nos ofrece excelentes resultados a través de su uso, brindando la facilidad para poder resaltar los detalles de los respectivos especímenes y proporcionando resultados donde se exponen suficientemente visibles sus estructuras, al igual, como lo es el caso de la utilización de tinciones especiales con metenamina de plata (Grocott).

## REFERENCIAS

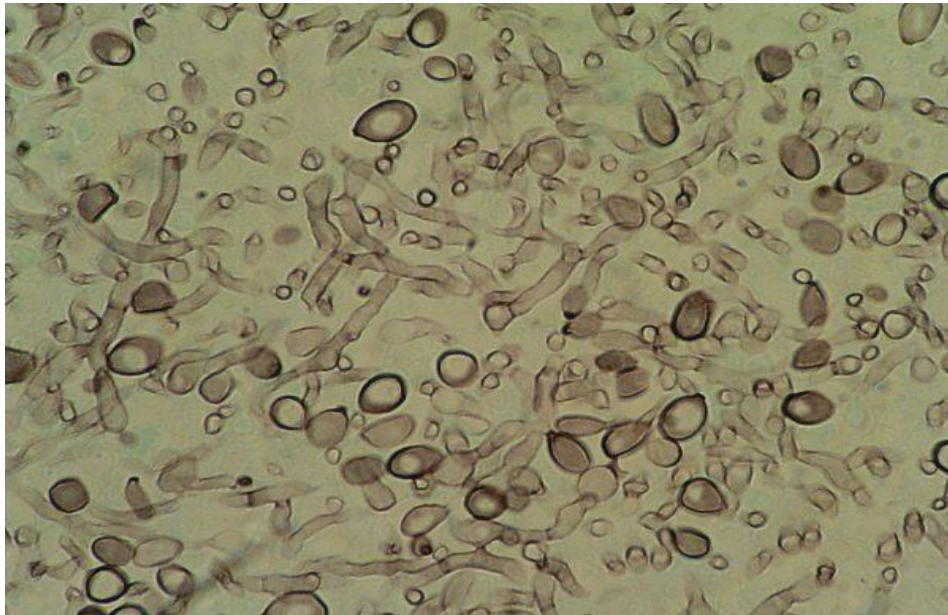
1. Escalona C. La Histotecnología [Soporte en línea]. 2010, [Fecha de acceso julio 2014].
2. Pollard, T.D, Earnshaw, W.C, Lippincott-Schwartz, J. (2008). Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Cell biology. Saunders, Elsevier (2ª Edición). Philadelphia.
3. López E, Hernandez M, Hernández M, Colín C, Ortega S, Cerón G, Franco R. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. [Revista en línea] 2014; 3: 10-18.
4. Castañón L. R. El género *Coccidioides*. En: Actualidades en micología médica. México Ed. Sefirot. 6ª ed. 2012: 155-158.
5. Gerard J. Tortora, Berdell, R. Funke, Christine L. Case. Introducción a la Microbiología 9ª Edición. Caracas: Médica Panamericana; 2005.
6. Bocaranda, A. Infecciones Vaginales en mujeres embarazadas. Maracaibo. LUZ; 2012.
7. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular. 4a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.
8. Gonzales X, Correnti M, Rivera H, Perrone M. Detecciones de *Candida albicans*. En lesiones de leucoplasia vellosa bucal de un grupo de pacientes Venezolanos VIH+. Acta Odontol Venez. 2010; 48(2): 1- 10.
9. Puras A, Montes M, Fernández P, López A. Expresión morfológica de las infecciones fúngicas graves. Participación del patólogo en el diagnóstico. Rev Iberoam Micol 2000; 17:34-40.
10. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular. 4a. ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2005.

- 11.Pardi G, Cardozo EI. Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez.* 2002; 40(1): 1-9.
- 12.Mayayo E. Diagnóstico histopatológico de las micosis. *Rev Iberoam Micol.* 2004; 24: 1-19.
- 13.Guelfand L, Perrone M. Manual de medios y reactivos del laboratorio de micología. 2008; 1-50.
- 14.Montalvo C. Técnica Histológica. [Revista en línea]. 2010

## ANEXOS



Pueden visualizarse hifas Técnica de Grocott.



Presencia de numerosas hifas irregulares con esporas ovales más gruesas (Grocott).

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, a Dios por guiarnos en este paso tan importante.

A la profesora Alcira Argüello, por su completa disposición, porque que en todo momento nos brindó su apoyo con mucha paciencia, y una total dedicación.

A nuestros familiares, que han creado en cada uno de nosotros las bases fundamentales en nuestras vidas para formarnos espiritual y profesionalmente.

Al Sr. Alfredo Palacios, por su gran ayuda al momento de la realización de la presente investigación.