

Evaluación de las coloraciones Papanicolaou y tricrómica en la tinción de protozoos ciliados ruminales

Evaluation of Pap staining and trichrome staining in rumen ciliate protozoa

*Richard Zapata Salas**, *Diana N. Polanco Echeverry**, *Sandra L. Alzate Uribe†*, *Diana M. Osorno Cano†*, *Isabel C. Martínez Albanés†*, *Paola A. Bedoya Hernández†*, *Lina A. Gutiérrez Builes**, *Leonardo A. Ríos Osorio**

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Los protozoos ciliados ruminales presentan diferencias morfológicas entre sus órdenes, comparten entre ellos la mayoría de sus estructuras internas, variando en forma, tamaño y disposición espacial, lo que hace posible su diferenciación. Por tanto, las coloraciones estudiadas podrían ser una herramienta útil para la identificación morfológica de estos microorganismos.

OBJETIVO

Evaluar la afinidad tintorial y la calidad de las coloraciones de Papanicolaou y tricrómica en la tinción de protozoos ciliados ruminales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio experimental realizado a partir de diseños factoriales analizados a través de pruebas no paramétricas. Las coloraciones de Papanicolaou y tricrómica se evaluaron con 36 tratamientos, por triplicado.

RESULTADOS

Para la coloración de Papanicolaou en el orden Vestibuliferida el conservante formaldehído 10% ($p=0,040$) y el tiempo de exposición del alcohol a 120 min ($p=0,046$) presentaron diferencias estadísticas significativas para la afinidad; el orden Entodiniomorphida no presentó significancia estadística en ninguno de sus factores, al igual que la calidad para dicha coloración para los dos órdenes. En cuanto a la coloración tricrómica, se encontró que para ninguno de los órdenes se presentó un efecto significativo de los factores evaluados sobre la variable de respuesta afinidad; al contrario, la calidad presentó diferencias significativas para los dos órdenes, el orden Vestibuliferida presenta diferencias significativas usando el conservante formalina 10% ($p=0,000$) y el fijado con Schaudinn 30 min ($p=0,023$) y para Entodiniomorphida solo se observaron diferencias con el conservante formalina 10% ($p=0,002$).

CONCLUSIONES

La coloración que presentó los mejores resultados en ambos órdenes para las dos variables de respuesta es la coloración de Papanicolaou.

PALABRAS CLAVES

Coloración de Papanicolaou. Coloración tricrómica. Entodiniomorphida. Protozoos ciliados ruminales. Vestibuliferida.

*Profesor, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. †Estudiante, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia. Grupo de Investigación en Microbiología Veterinaria.
Contacto: lrios_01@hotmail.com
Recepción: 28-04-2011. Aceptación: 12-11-2011.

ABSTRACT

INTRODUCTION

Ruminal ciliated protozoa show morphological differences between their orders, including the majority share of its internal structures varying in size, shape and spatial arrangement, which allows differentiation. Therefore, the colors we studied could be a useful tool for morphological identification of these organisms.

OBJECTIVE

Evaluate Staining affinity and quality of the Pap staining and Trichrome staining in ruminal ciliated protozoa.

MATERIALS AND METHODS

Experimental study made from factorial designs analyzed through nonparametric tests. The Pap and Trichrome stains were tested with 36 treatments in triplicate.

RESULTS

For PAP staining in the order Vestibuliferida the preservative formaldehyde 10% ($p = 0.040$) and time of alcohol exposure to 120 min ($p = 0.046$) showed statistically significant differences for the affinity; Entodiniomorphida order not present statistically significant in none of the factors, like quality to that color for the two orders. As Trichrome staining, we found that none of the orders had a significant effect of the factors evaluated on the response variable affinity, on the contrary, the quality showed significant differences for the two orders, the order Vestibuliferida showed significant differences using the preservative formalin 10% ($p = 0.000$) and fixed with Schaudinn 30 min ($p = 0.023$) and Entodiniomorphida only showed differences with the preservative formalin 10% ($p = 0.002$).

CONCLUSIONS

The coloring of the best results in both orders to the two response variables is the Papanicolaou stain.

KEY WORDS

Entodiniomorphida. PAP staining. Ruminal ciliated protozoa. Trichrome staining. Vestibuliferida.

INTRODUCCIÓN

Los protozoos ciliados del rumen, presentan diferencias morfológicas entre grupos taxonómicos;^{1,2} estos se clasifican con base en la morfología celular;¹⁻³ pertenecen al Phylum Ciliophora, Órdenes Vestibuliferida y Entodiniomorphida. Dentro del orden Vestibuliferida se encuentran los protozoos que tienen el cuerpo elipsoidal con cilios somáticos y uniformes.^{1,3-4} Los protozoos del orden Entodiniomorphida, presentan una, dos o tres zonas ciliares localizadas en diferentes posiciones según el género y la especie.^{1,5-6} Algunos géneros del orden Entodiniomorphida poseen estructuras que los diferencian entre sí, conocidas como placas esqueléticas, que están compuestas de reservas de polisacáridos en forma de gránulos de amilopectina;⁷ otras estructuras son las espinas, extensiones de la membrana celular ubicadas en la zona caudal de algunos géneros de protozoos.¹

En general los protozoos ciliados ruminales poseen macronúcleo y micronúcleo, endoplasma, citoplasma y una o más vacuolas contráctiles, las cuales realizan la función de excreción de gases, líquidos y productos residuales solubles.¹

En cuanto al género, la caracterización de los protozoos ciliados del rumen se basa en la coloración de sus estructuras. Cada organela celular presenta afinidad química por colorantes específicos,⁸ actualmente se emplea el verde brillante, colorante ácido, capaz de colorear estructuras básicas como el citoplasma;⁹ el azul de metileno, colorante básico para colorear estructuras ácidas como los núcleos y lugol para la coloración de las placas esqueléticas;^{2,4,10} sin embargo, el uso de coloraciones monocromáticas limita la observación de características diferenciales entre géneros y especies, además estas técnicas se usan sólo para tinción en fresco.

Las coloraciones de Papanicolaou y tricrómica son métodos policromáticos, que usan colorantes diferenciales, tanto básicos como ácidos,¹¹⁻¹³ lo que podría facilitar la tinción concomitante de varias organelas en una misma célula.

La coloración de Papanicolaou se utiliza para el diagnóstico del cáncer cervicouterino^{11,14} y la han modificado muchos autores,^{12,15} reduciendo el número de alcoholes, suprimiendo el colorante Orange G, modificando algunos tiempos, sin abandonar sus

principios fundamentales.¹⁴⁻¹⁵ La coloración de Papanicolaou ha permitido observar el protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis* en los extendidos cervicovaginales, lo que indica que los protozoos ruminales podrían presentar afinidad por los colorantes hematoxilina y eosina, usados en esta técnica.^{14,16}

La hematoxilina es un colorante básico que presenta afinidad por el núcleo,^{8,14,17} gracias al componente ácido (fosfato) presente en los nucleótidos.¹⁸ Por su parte, la eosina es un colorante ácido de naturaleza alcohólica^{8,14} que tiene afinidad por el citoplasma y las proteínas básicas presentes en la célula.⁸

La tinción tricrómica la desarrolló originalmente Gomori y la adaptó Wheatley, es una coloración policromática, reconocida como una herramienta diagnóstica sensible para la detección de algunos protozoos parásitos intestinales,^{13,19-20} como *Entamoeba* sp., *Balantidium coli* y *Giardia* sp.²⁰ Se constituye como un método simple que logra realzar las características morfológicas definiendo estructuras citoplasmáticas y detalles internos del núcleo a través de una mezcla de dos colorantes: verde brillante y cromótopo 2R, respectivamente.^{13,19-20}

En esta coloración se usa la solución fijadora de Schaudinn, que se prepara con solución saturada de cloruro de mercurio, alcohol etílico al 95% y ácido acético glacial.

Las claves taxonómicas actuales de protozoos ruminales se basan únicamente en la caracterización morfológica, por tanto, la calidad en la caracterización depende en gran medida de la coloración utilizada, la cual favorecerá o no la identificación. Actualmente no se emplean coloraciones que permitan observar claramente las estructuras con diferente afinidad tintorial en la misma muestra. Pese a que las coloraciones Papanicolaou y tricrómica son utilizadas para la tinción de algunos protozoos, aún no se han empleado para la identificación de protozoos ciliados ruminales. En respuesta a la necesidad de la investigación científica dedicada a la comprensión de la dinámica del metabolismo y la interacción de cada especie de protozoo con otras especies y otros grupos de microorganismos relacionados con la producción de leche y carne de alta calidad nutricional; este estudio tiene como objetivo evaluar la afinidad y la calidad de las coloraciones de Papanicolaou y tricrómica en la tinción de protozoos ciliados del rumen.

MATERIALES Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Experimental.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para ambas coloraciones se diseñó un experimento de cuatro factores. Para la coloración de Papanicolaou los factores fueron: conservante (con dos niveles: formalina 10% y formaldehído 10%); tiempo de los alcoholes (con tres niveles: 30, 60 y 120 segundos); tiempo del colorante (con tres niveles: 30, 60 y 90 segundos); y lugol (con dos niveles: con lugol y sin lugol). Para la coloración tricrómica los factores fueron: fijado con Schaudinn (con dos niveles: 15 y 30 minutos); tiempo de alcoholes (con tres niveles: 2, 5 y 7 minutos); tiempo del colorante (con tres niveles: 5, 10 y 15 minutos); y conservante (con dos niveles: formalina 10 % y sin conservante).

Como variables respuesta se evaluaron la afinidad tintorial y la calidad de la coloración.

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de contenido ruminal se obtuvieron de bovinos de raza Holstein, canulados al rumen con cánulas Bar Diamond®. La muestra fue tomada por medio de una sonda metálica con filtro Bar Diamond®.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE FLUIDO RUMINAL

Para el estudio, se usaron como conservantes el formaldehído al 10% y la formalina al 10%; los dos son especies químicas resultantes del formaldehído gaseoso. Para su uso se empleó agua destilada y solución salina 0,95% como medio acuoso, respectivamente.

El fluido ruminal fue depositado en 21 recipientes plásticos con un volumen de 50 mL para cada uno, dispuestos de la siguiente manera: 7 de estos con 10 mL de formalina al 10%, 7 con 10 mL de formaldehído al 10% y 7 sin conservante. Las muestras fueron almacenadas en refrigeración a 4 °C.

Para su uso, las muestras se llevaron a temperatura ambiente; se homogenizaron por inversión 10 veces; se tomaron 200 µL de muestra de fluido ruminal utilizando micropipeta y se depositaron en el centro del portaobjetos; se distribuyeron suave y uniformemente en el total de la placa con hisopo de madera y se dejaron secar a temperatura ambiente.

COLORACIÓN DE PAPANICOLAOU

La coloración de Papanicolaou se basó en el protocolo utilizado por el laboratorio clínico docente asistencial de la IPS universitaria de la Universidad de Antioquia. Para fines del estudio se realizó un diseño experimental, modificando los tiempos de exposición a los reactivos, algunos fueron variables como los tiempos de los colorantes y los alcoholes, mientras otros tiempos permanecieron fijos como los del agua destilada, el alcohol al 70%+NH₃ y el xilol, con 30 segundos para cada uno. La variación en los tiempos de los colorantes y los alcoholes se realizó con base en la búsqueda del mejor nivel de la variable que permitiera visualizar la mejor afinidad de colorante y remoción del exceso de éste después del lavado, dada la diferencia entre las matrices, los componentes variables de la estructura de protozoos ciliados ruminales y protozoos de otros ecosistemas ya estudiados con la coloración. La fijación con alcohol isopropílico al 95% se modificó por la fijación con metanol, ya que ensayos previos demostraron que las muestras eran removidas por el alcohol isopropílico, lo que interfería negativamente en la coloración. Además, se introdujo en la coloración el lugol, para colorear las placas esqueléticas.

El protocolo y los niveles de las variables evaluadas son: fijación con metanol (inmersión de la placa en recipiente y secado a temperatura ambiente); agua destilada (30s); hematoxilina de Harris (variable 30, 60 ó 90s); agua corriente (lavado hasta quitar exceso de colorante); lugol (ausencia/presencia 10 min); alcohol isopropílico al 70%+NH₃ (30s); alcohol isopropílico al 95% (variable 30, 60 ó 120s); E.A50 (eosina Alcohólica) (variable 30, 60 ó 90s); alcohol isopropílico al 95% (variable 30, 60 ó 120s); alcohol isopropílico al 95% (variable 30, 60 ó 120s); alcohol isopropílico al 95% (variable 30, 60 ó 120s); xilol (30 s).

COLORACIÓN TRICRÓMICA

La coloración tricrómica de Wheatley, fue tomada de Winn y colaboradores.²⁰ De acuerdo con el diseño experimental, los tiempos de exposición a los alcoholes, el colorante y la fijación con la solución de Schaudinn, fueron variables para observar cual era su efecto sobre las variables de respuesta, mientras que otros tiempos como la exposición al lugol, al alcohol al 90% acidificado y al xilol, permanecen fijos. En esta coloración se modificó el uso de alcohol yodado por el lugol, ya que

este reactivo presenta mayor afinidad por las placas esqueléticas.^{2,4,10}

El protocolo modificado es el siguiente: fijación de la muestra con solución fijadora de Schaudinn (variable 15-30 min); alcohol etílico al 70% (variable 2, 5 ó 7 min); lugol (10 min); alcohol etílico al 70% (variable 2, 5 ó 7 min); alcohol etílico al 70% (variable 2, 5 ó 7 min); colorante tricrómico (variable 5, 10 ó 15 min); alcohol etílico al 90% acidificado con 1% de ácido acético (5s); alcohol etílico al 100% (1 dip); alcohol etílico al 100% (variable 2, 5 ó 7 min); alcohol etílico al 100% (variable 2, 5 ó 7 min); xilol (1 min); xilol (1 min).

TINCIÓN DE LAS PLACAS

Para ambas coloraciones se evaluaron 36 tratamientos que resultaron de las combinaciones de los factores en el diseño experimental, cada uno de los ensayos tuvo tres réplicas para asegurar la repetibilidad del estudio. En total se colorearon 216 placas, 108 con la coloración de Papanicolaou y 108 con la coloración tricrómica.

AFINIDAD TINTORIAL Y CALIDAD DE LA COLORACIÓN

La afinidad tintorial está dada por la incorporación del colorante a cada una de las estructuras celulares y la calidad es entendida como aquella característica propia de la estructura que permite su diferenciación y reconocimiento de las demás estructuras internas. Para calcularlas se emplearon matrices de identificación, donde dada la intensidad, el color y el número de estructuras observadas se podía determinar si se presentaba afinidad o no por cada una de las estructuras y si estas presentaban diferenciación de las otras estructuras. Posteriormente, se realizó un conteo de 15 protozoos por cada orden (Vestibuliferida y Entodiniomorphida) por placa. Se calculó la proporción por cada estructura visualizada en el microscopio, donde el denominador es 15 (número de protozoos contabilizados por orden) y el numerador, es el número de protozoos que presentaban incorporación del colorante y diferenciación en cada una de las estructuras (macronúcleo, micronúcleo, citoplasma, membrana y cilios para ambos órdenes y placas esqueléticas sólo para el orden Entodiniomorphida) para cada variable.

Consecutivamente a cada una de las proporciones realizadas para cada placa coloreada, se calculó una media aritmética que se convertía en las variables respuesta Afinidad Tintorial y Calidad de la Coloración; este procedimiento se realizó de la misma manera para las dos coloraciones.

PLAN DE ANÁLISIS

La afinidad y la calidad se resumieron para cada uno de los factores evaluados por medio de medidas de tendencia central (media y mediana) y de dispersión (coeficiente de variación).

Para evaluar los efectos de los factores sobre la afinidad tintorial y la calidad de la coloración, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Adicionalmente se usó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para comparar tanto la calidad como la afinidad de cada una de las dos coloraciones en cada orden; así mismo, dicha prueba se usó para comparar ambas variables de respuesta para cada una de las técnicas de coloración.

Todos los análisis se realizaron con un nivel de significancia 0,05. El análisis de los datos se realizó a través del programa estadístico SPSS versión 18.0.

RESULTADOS

AFINIDAD TINTORIAL Y CALIDAD DE LA COLORACIÓN EN LA TÉCNICA DE COLORACIÓN DE PAPANICOLAOU

Para el orden Vestibuliferida la afinidad fue significativamente mayor cuando se usó formaldehído al 10% ($p = 0,04$) y cuando el tiempo en los alcoholes fue mayor: 120s ($p = 0,046$). Para el orden Entodiniomorphida ninguno de los factores tuvo un efecto significativo.

Al comparar la afinidad entre los dos órdenes, se observó que ésta fue mayor para el orden Vestibuliferida (media Vestibuliferida = 0,57, media Entodiniomorphida = 0,42, P de Mann-Whitney < 0,001), (tabla 1).

Tanto para el orden Vestibuliferida como para el orden Entodiniomorphida ninguno de los factores

Tabla 1. Afinidad tintorial para la coloración de Papanicolaou.

Factor	Vestibuliferida				Entodiniomorphida			
	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b
Total	0,57	0,60			0,42	0,40		0,000 ^c
Conservante								
Formalina 10%	0,56	0,60	10,65	0,040	0,41	0,39	29,75	0,281
Formaldehído 10%	0,58	0,60	7,17		0,43	0,42	32,38	
Tiempo en alcoholes (Segundos)								
30	0,56	0,59	10,11	0,046	0,40	0,38	29,13	0,168
60	0,57	0,58	9,57		0,40	0,39	31,26	
120	0,59	0,60	7,52		0,40	0,38	29,13	
Tiempo en colorante (Segundos)								
30	0,58	0,60	9,17	0,334	0,42	0,40	32,20	0,982
60	0,57	0,60	8,82		0,43	0,40	34,74	
90	0,57	0,59	9,99		0,42	0,41	26,46	
Lugol								
Con Lugol	0,57	0,60	8,93	0,834	0,44	0,43	34,52	0,311
Sin Lugol	0,57	0,60	8,89		0,40	0,39	25,60	

^aCoficiente de variación. ^bPrueba Kruskal-Wallis ^cValor P prueba de Mann-Whitney

tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la calidad de la coloración. Al comparar la calidad entre los dos órdenes, se observó que ésta fue mayor para el orden Vestibuliferida (media Vestibuliferida = 0,44, media Entodiniomorphida = 0,24, P de Mann-Whitney < 0,001), (tabla 2).

AFINIDAD TINTORIAL Y CALIDAD DE LA COLORACIÓN EN LA TÉCNICA DE COLORACIÓN TRICRÓMICA

No se encontró ningún efecto significativo de los factores evaluados sobre la afinidad tintorial en los órdenes Vestibuliferida y Entodiniomorphida.

La afinidad tintorial fue mayor para el orden Vestibuliferida (media Vestibuliferida = 0,35, media Entodiniomorphida = 0,25, P de Mann-Whitney < 0,001) (tabla 3).

En el orden Vestibuliferida la calidad fue significativamente mayor cuando se usó el fijador Schaudinn 30 min ($p = 0,023$) y cuando se utilizó como

conservante formalina al 10% ($p = 0,000$), así mismo, se encontró que para el orden Entodiniomorphida al usar formalina al 10% se presentó un efecto sobre la calidad de la coloración ($p = 0,002$) (tabla 4).

Al comparar la calidad entre los dos órdenes, se observó que ésta fue mayor para el orden Vestibuliferida (media Vestibuliferida = 0,15, media Entodiniomorphida = 0,08, P de Mann-Whitney < 0,001) (tabla 4).

La coloración que reveló mejor respuesta para las dos variables respuesta en los dos órdenes fue Papanicolaou: media Vestibuliferida afinidad = 0,57, media Vestibuliferida calidad = 0,44, media Entodiniomorphida afinidad = 0,42, media Entodiniomorphida calidad = 0,24, P de Mann-Whitney < 0,001 (tabla 5).

Al comparar las coloraciones, se encontró que el orden que presentó mejor respuesta a los tratamientos fue el Vestibuliferida para las dos variables evaluadas: afinidad tintorial y calidad de la coloración, (tabla 5).

Tabla 2. Calidad de la coloración para Papanicolaou.

Factor	Vestibuliferida				Entodiniomorphida			
	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b
Total	0,44	0,45			0,24	0,21		0,000 ^c
Conservante								
Formalina 10%	0,46	0,47	21,71	0,051	0,24	0,21	61,97	0,968
Formaldehido 10%	0,41	0,43	32,76		0,24	0,21	65,28	
Tiempo en alcoholes (Segundos)								
30	0,43	0,46	27,15	0,649	0,24	0,22	50,19	0,751
60	0,45	0,47	24,38		0,24	0,22	65,86	
120	0,42	0,435	31,68		0,24	0,20	73,70	
Tiempo en colorante (Segundos)								
30	0,45	0,45	26,51	0,497	0,24	0,23	62,24	0,982
60	0,45	0,47	22,45		0,25	0,20	67,14	
90	0,41	0,45	33,63		0,23	0,20	61,26	
Lugol								
Con Lugol	0,45	0,47	26,52	0,136	0,27	0,23	66,85	0,258
Sin Lugol	0,42	0,45	28,53		0,22	0,18	56,03	

^aCoefficiente de variación. ^bPrueba Kruskal-Wallis. ^cValor P prueba de Mann-Whitney.

Tabla 3. Afinidad tintorial para la coloración Tricrómica.

Factor	Vestibuliferida				Entodiniomorphida			
	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b
Total	0,35	0,39			0,25	0,28		0,000 ^c
Fijado								
Schaudinn 15 min	0,37	0,39	47,36	0,206	0,25	0,28	53,52	0,765
Schaudinn 30 min	0,33	0,38	46,40		0,26	0,29	49,58	
Tiempo en alcoholes (Minutos)								
2	0,33	0,40	53,42	0,538	0,22	0,21	58,98	0,118
5	0,38	0,38	45,94		0,28	0,31	46,03	
7	0,34	0,39	39,91		0,26	0,29	49,07	
Tiempo en colorante (Minutos)								
5	0,35	0,40	46,01	0,746	0,26	0,30	53,94	0,862
10	0,33	0,35	52,99		0,24	0,23	52,74	
15	0,36	0,39	43,48		0,26	0,27	48,38	
Conservante								
Formalina 10%	0,38	0,40	38,75	0,063	0,27	0,30	49,08	0,053
Sin conservante	0,31	0,36	55,03		0,23	0,27	52,69	

^aCoefficiente de variación. ^bPrueba Kruskal-Wallis. ^cValor P prueba de Mann-Whitney.

Tabla 4. Calidad de la coloración para Tricrómica.

Factor	Vestibuliferida				Entodiniomorphida			
	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b	Media	Mediana	CV ^a (%)	p ^b
Total	0,15	0,15			0,08	0,07		0,000 ^c
Fijado								
Schaudinn 15 min	0,13	0,10	92,94	0,023	0,08	0,08	87,20	0,594
Schaudinn 30 min	0,18	0,19	73,88		0,09	0,07	91,86	
Tiempo en alcoholes (Minutos)								
2	0,13	0,12	85,81	0,252	0,07	0,04	114,14	0,259
5	0,19	0,20	79,96		0,09	0,08	79,16	
7	0,15	0,13	80,86		0,09	0,09	81,97	
Tiempo en colorante (Minutos)								
5	0,15	0,13	87,24	0,917	0,08	0,07	91,72	0,963
10	0,15	0,16	82,03		0,08	0,08	89,56	
15	0,16	0,16	82,42		0,08	0,07	91,22	
Conservante								
Formalina 10%	0,21	0,23	63,84	0,000	0,10	0,10	73,41	0,002
Sin conservante	0,10	0,08	99,42		0,06	0,06	108,31	

^aCoefficiente de variación. ^bPrueba Kruskal-Wallis. ^cValor P prueba de Mann-Whitney.

Tabla 5. Comparación Técnicas de coloración.

Orden	Variable Respuesta	Papanicolaou			Tricrómica		
		Media	Mediana	p ^a	Media	Mediana	p ^a
Vestibuliferida	Afinidad tintorial	0,57	0,60	0,00	0,35	0,39	0,00
	Calidad de la coloración	0,44	0,46		0,15	0,14	
Entodiniomorphida	Afinidad tintorial	0,42	0,40	0,00	0,25	0,28	0,00
	Calidad de la coloración	0,24	0,21		0,08	0,07	

^aPrueba Mann-Whitney.

DISCUSIÓN

Cuando se evaluó la afinidad tintorial para la coloración de Papanicolaou, se pudo evidenciar que para el orden Vestibuliferida el método de conservación con formaldehído al 10% tuvo un mayor efecto, posiblemente por la reacción de éste con los grupos amino de las proteínas formando reticulaciones y además conservando las estructuras de las células; así mismo, la exposición a estos agentes provocan la desactivación de enzimas celulares, los cuales interrumpen los procesos de autólisis, confiriéndole resistencia al tejido y reduciendo su degradación.²¹

Por otro lado, se observó que el tiempo en alcoholes fue significativo a 120 segundos, donde a medida que se aumentó el tiempo de exposición, el lavado presentó mejores resultados; esto puede deberse a que al incrementar el tiempo de exposición y la concentración de los alcoholes se produce una deshidratación parcial de la célula,²²⁻²³ permitiendo el ingreso de los componentes de la coloración y posibilitando la remoción de excesos de colorante y detritos que puedan interferir en la identificación de las estructuras internas (figura 1).

No se observó un efecto del factor tiempo de exposición al colorante sobre la afinidad, ya que los niveles 30, 60 y 90 segundos arrojaron resultados similares (media 0,58, 0,57 y 0,57, respectivamente). Para conocer efectos diferenciables de este factor sobre la afinidad es necesario implementar en otros estudios intervalos más separados de tal manera que se pueda establecer su efecto significativamente.

En este estudio se implementó la inclusión del lugol como uno de los factores a evaluar en la co-

loración de Papanicolaou, ya que según la literatura esta sustancia permite la coloración de las placas esqueléticas,^{2,4,10} sin embargo, no se observó un efecto significativo sobre las variables de respuesta. Cuando se analizaron las coloraciones con y sin lugol se encontró que no se observaban las placas esqueléticas en ninguno de los dos experimentos. Esto puede interpretarse como una variable de confusión, no obstante, es un comportamiento del factor para el cual no tenemos ningún sustento teórico que lleve a interpretar este hecho.

Para la coloración tricrómica, la afinidad no se vio influenciada por ninguno de los factores evaluados en los dos órdenes, es decir ninguno de los niveles de los factores presentaron diferencias estadísticamente significativas.

De acuerdo con el estudio, a mayor tiempo de exposición en el fijador Schaudinn, se presentó un me-

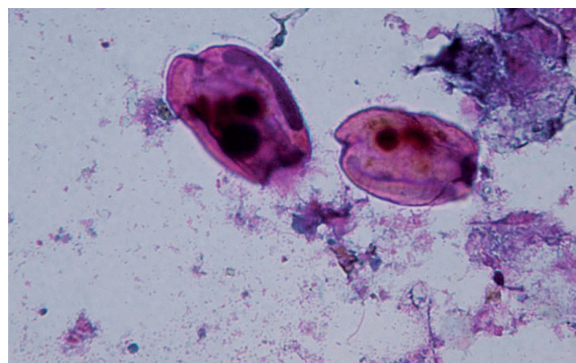


Figura 1. Protozoos del género *Entodinium* sp. Orden Entodiniomorphida. Coloración de Papanicolaou. Evaluación en Microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400X.

mejor resultado sobre la calidad de la coloración, esto puede deberse a que hay mayor tiempo de contacto entre la célula y el fijador, proporcionando, así, la unión entre los iones de mercurio presentes en el fijador con los grupos ácidos de las proteínas y con residuos fosfóricos de las nucleoproteínas; al precipitar el material proteico de la célula, se conservan las características morfológicas, se produce una rápida muerte celular, evitando la autólisis y la degeneración de la misma, además la interacción del fijador con las membranas celulares cambia la permeabilidad de esta última, facilitando el ingreso de los colorantes (figura 2).²⁴⁻²⁵

La formalina presentó un mejor efecto para la tinción tricrómica en ambos órdenes, esto puede deberse



Figura 2. Protozoo del género *Isotricha* sp. Orden Vestibuliferida. Coloración Tricrómica. Evaluación en Microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400X.

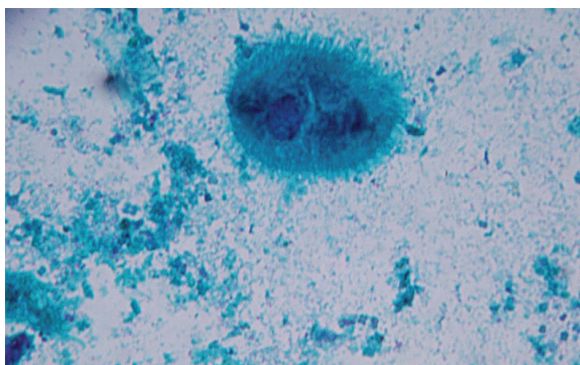


Figura 3. Protozoo de la especie *Dasytricha ruminantium*, Orden Vestibuliferida. Coloración Tricrómica. Evaluación en Microscopio Nikon Eclipse E200, aumento 400X.

a que cuando la célula está en contacto con la solución salina isotónica (solución salina al 0,95%), hay un equilibrio en las concentraciones de agua fuera y dentro de la célula, no se producen efectos osmóticos ni daño consecuente a las células, por su parte, el formol actúa conservando las propiedades químicas y la morfología celular (figura 3).²⁶

CONCLUSIONES

Las técnicas de Papanicolaou y tricrómica hasta el momento se han empleado para el diagnóstico del cáncer cervicouterino^{11,14} y para la detección de algunos protozoos parásitos intestinales,^{13,19-20} respectivamente; este estudio es el primero que propone la implementación de éstas técnicas de tinción policromática para la identificación de protozoos ciliados ruminales.

Al ser la coloración tricrómica una técnica ampliamente utilizada en el diagnóstico de patologías causadas por protozoos en humanos, se planteó la hipótesis de que esta coloración podría tener una mejor respuesta al usarse en la caracterización de protozoos ciliados ruminales; sin embargo, se encontró que fue la coloración de Papanicolaou la que tuvo un mayor efecto de los cuatro factores evaluados sobre las variables de respuesta: afinidad tintorial y calidad de la coloración en ambos órdenes.

Los resultados obtenidos en ambas coloraciones, pueden deberse al tipo de muestra, ya que el fluido ruminal posee características bioquímicas (presencia de ácidos grasos y otros metabolitos de la digestión) y físicas (pH, presencia de material vegetal, entre otras) diferentes que podrían dificultar la adhesión de la muestra al portaobjeto, la permeabilidad de la membrana entre otras características que se puedan ver reflejadas en la coloración final de la célula.

Es posible que variando los niveles en los factores se logre una mayor afinidad tintorial y mejor calidad en las coloraciones. Por lo tanto, es necesario realizar estudios donde se incremente el número de factores evaluados y los niveles de los mismos, así como el número de réplicas, lo cual proporcionaría más potencia al estudio y posiblemente maximizaría el efecto sobre las variables respuesta. Además, es recomendable asegurar una apropiada fijación de la muestra.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio clínico docente asistencial de la IPS Universitaria de la Universidad de Antioquia por su colaboración con la técnica de coloración de Papanicolaou; al Grupo de investigación Infección y Cáncer, en especial al profesor Armando Baena por el apoyo estadístico durante el proceso, a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia por el apoyo académico y logístico.

FUENTES DE FINANCIACIÓN

La caracterización de protozoos ciliados ruminales hace parte de los objetivos del proyecto de investigación 2008D31067-3724, cofinanciado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y a la Alianza Universidad de Antioquia (Escuela de Microbiología) - Fundauniban - Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaramos la ausencia de conflicto de intereses o responsabilidades compartidas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Dehority BA.** Rumen Microbiology. 1ª ed. New York: Nottingham, University Press; 2004.
2. **Makkar HP, Mcsweeney CS.** Methods in gut microbial ecology for ruminants. 1ª ed. Australia: Springer; 2005.
3. **Hobson PN, Stewart CS.** The rumen microbial ecosystem. 2ª ed. Londres: Blackie academic y profesional.; 1997.
4. **Dehority BA.** Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa. 1ª ed. United states of America: CRC press; 1993.
5. **Struder-kypke MC, Kornilova OA, Lynn DH.** Phylogeny of trichostome ciliates (Ciliophora, Litostomatea) endosymbiotic in the Yakut horse (*Equus caballus*). *Eur J Protistol.* 2007. Jun 22; 43: p. 319-28.
6. **Cameron SL.** Taxonomy and phylogeny of endosymbiotic ciliates (Ciliophora: Litostomatea) associated with Australian herbivorous marsupials. *En: Int J Parasitol.* 2003; (33): 347-55.
7. **Lynn D.H.** The Ciliated Protozoa Characterization, Classification, and Guide to the Literature. 3ª ed. Canadá: Springer; 2008.
8. **Gartner LP, Hiatt JL.** Introducción a la histología y técnicas histológicas básicas. *En: Gartner LP. Texto atlas de histología.* 3ª ed. México: Mc Graw Hill; 2008. p. 1-10.
9. **Cid AF, López L.** Fitopatología ginecológica y mamaria. 2ª ed. España: Ediciones científicas y técnicas; 1993.
10. **Gurelli G, Gocmen B.** Intestinal ciliate composition found in the feces of the Cypriot wild donkey, *Equus asinus* Linnaeus, 1758. *Eur J. Protistol.* 2009. Sep 15; 10: 1-5.
11. **Griffith WF, Werner CL.** Lesiones preinvasoras del aparato genital inferior. *En: Williams- ginecología.* 1ª edición. Texas: Mc Graw Hill; 2009. p. 617-45.
12. **Gamble M.** The Hematoxylin and Eosin. *En: Bancroft JD. Theory and practice of histological techniques.* 6a ed. United States of America: Elsevier; 2008. p. 121-34.
13. **López IR.** Comparación del método convencional (observación microscópica en fresco), usado en laboratorios de hospitales nacionales de Guatemala, con la tinción tricrómica de Wheatley en el diagnóstico de *Entamoeba histolytica/dispar*. Trabajo de grado; Química Bióloga. Guatemala: Universidad de San Carlos De Guatemala; 2008. p 42.
14. **Ministerio de Salud.** Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para el diagnóstico en citología cérvico uterina. Serie de normas técnicas N° 43. Lima: Editorial e imprenta de la universidad nacional mayor de San Marcos; 2008.
15. **Escobar S, Galeano A, Londoño M, Villa M.** Atlas de citología cervicovaginal. 1ª ed. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2004.
16. **Bartlett JH.** Microorganisms. *En: Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques.* 6a ed. United States of America: Elsevier; 2008. p. 309-331.
17. **Sims B.** Tinciones generales. *En: Crocker J, Burnett D. La ciencia del diagnóstico del laboratorio.* 2ª ed. México: Mc Graw Hill interamericana; 2007. p. 17-26.
18. **Willey JM, Sherwood LM, Woolvert CJ.** Microbial genetics: gene structure, replication, and expression. *En: Willey JM, Sherwood LM, Woolvert CJ. Microbiology.* 7ª ed. New York: Mc Graw Hill; 2008. p. 247-290.
19. **Ash LR, Orihel TC.** Procedimientos diagnósticos. *En: sh LR. Atlas de parasitología humana.* 5 ed. Argentina: Editorial médica panamericana; 2010. p. 415-484.
20. **Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schreckenberger PC, et al.** Diagnóstico mi-

- crobiológico, texto y atlas en color. 6ª ed. Argentina: editorial medica panamericana; 2008.
21. **Escarabajal MD, Vargas JP, López JC, Portavella M, Carrasco M.** Fundamentos de psicobiología. 1ª ed. Madrid España: Delta publicaciones; 2006.
 22. **Klemm WR.** Biological Water and Its Role in the Effects of Alcohol. Alcohol. 1998. July. 15 (3): p. 249–267.
 23. **Klemm WR.** Dehydration: A new alcohol theory. Alcohol. 1990 Jun; 7. p. 49–59.
 24. **Castro A, Guerrero OM.** Técnicas de diagnóstico parasitológico. 2a ed. Costa Rica: Editorial de la universidad de costa rica; 2006.
 25. **Ochiai E.** Química bioinorgánica. 1a ed. Barcelona, España: Reveté; 2003.
 26. **Sadava D, Heller, HC, Orians GH, Purves WK, Hillis DM.** la membrana celular dinámica. En: Purves W K. vida, la ciencia de la biología. 8a ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2009. p. 96 – 117.