

Técnica Histológica

Es un conjunto de pasos a seguir para la obtención de preparados histológicos aptos para su estudio mediante el microscopio óptico.

1- Obtención del material: se efectúa mediante biopsia, necropsia o autopsia.

- **Biopsia:** consiste en tomar un trozo de tejido de un ser vivo. Este procedimiento de uso frecuente en medicina requiere el mismo cuidado de asepsia, antisepsia, etc., que se utiliza en todo acto quirúrgico menor o mayor.
- **Necropsia:** es el procedimiento en el cual se extrae material de un cadáver
- **Autopsia:** consiste en el estudio analítico y sistemático completo. macroscópico y microscópico de los órganos, aparatos y sistemas de un cadáver. Se realiza para establecer causas de muerte.

2- Fijación: una vez obtenido el material que se desea estudiar por cualquiera de los procedimientos descriptos se procede a su fijación con lo que se evita la destrucción o lisis celular. Es un proceso físico — químico complejo por el cual se mantiene a las estructuras orgánicas en el estado más parecido al que poseían en vida.

Los objetos de la fijación son:

- Mantener las estructuras en el estado más parecido al que poseían **in vivo**.
- Evitar la lisis celular y la proliferación bacteriana - -
- Dar cierta solidez o dureza al tejido o material. La fijación detiene los procesos vitales pero en ciertas condiciones mantiene las actividades de algunos componentes moleculares, por ejemplo la actividad de algunas enzimas

Tipos de fijadores

- **Físicos:** Por ebullición. Por congelación: bajas temperaturas de -190°C a -70°C (Nitrógeno líquido. dióxido de carbono) permiten excelentes fijaciones.
- **Químicos:** se usan soluciones simples como alcoholes (etanol o metanol que pueden fijar células en extendidos) y el formol al 10%. El formol es una solución de aldehído fórmico al 40% en agua destilada. De esta solución se toman 10 ml y se le agregan 10 ml de agua destilada (10%). Esta es la solución más usada. Se puede agregar a esta acetato de calcio, el que evita la oxidación del aldehído fórmico o ácido fórmico, el que perjudica la fijación. El formol puede disolverse al 10% en buffer de fosfato en lugar de agua destilada para mantener el pH a 7.4.

- Mezclas fijadoras: se usan diferentes fijadores en una sola mezcla para facilitar la fijación de ciertas estructuras. Ej.: líquidos de Bouin, Zenker, etc.
- Relación del volumen del tejido a fijarse con el volumen del fijador: es necesario que los trozos a fijar sean de un espesor no mayor de 0.5 mm. Para una buena fijación es necesario que la relación volumen del tejido - volumen del fijador sea de 1/40.
- Tiempos de fijación: depende del tejido, su volumen y el fijador usado. Cuando se usa el formol las piezas pequeñas requieren algunas horas y ya a las 24 horas se fijan bien. La fijación se puede controlar a simple vista por el cambio de color del tejido y su consistencia (se endurece) pero una buena fijación solo se aprecia en el corte ya preparado observando al microscopio óptico.
- Lavado: después de la fijación el tejido debe ser convenientemente lavado con agua o bien con otras sustancias que eliminan restos de fijadores especiales.

3- Deshidratación: se coloca la muestra en alcoholes de concentración creciente para eliminar el agua que contenga ya que la parafina no es miscible con agua. Se utiliza etanol 70%, 80%, 96% y 100%.

4- Aclaración: son solventes que producen transparencia en los tejidos, además de solubilizar la parafina. Entre ellos se encuentran: xilol, toluol, acetona, benceno. El más usado es el Xilol.

5- Inclusión en parafina: la parafina es una mezcla de hidrocarburos saturados que tienen diferentes puntos de fusión. Parafina blanda funde a 44 – 48°C y la parafina dura a 56 – 58°C. La parafina se pone en estufa de cultivo a unos grados por encima de su punto de fusión. Se sumerge la muestra, se lleva a estufa unos minutos para que la parafina penetre en los tejidos. Luego se enfría bruscamente colocando el recipiente en hielo.

6- Preparación del taco: se corta un trozo de parafina que contiene la muestra en forma de pirámide truncada, de manera tal que la misma quede sobre la base menor.

Se pega la base mayoría un taquito de madera que servirá para sostenerlo en el micrótopo.

7- Corte: se realiza mediante el uso del micrótopo. El micrótopo de congelación permite cortar el tejido después de fijarlo por frío, congela con dióxido de carbono y lo endurece para que luego pueda ser cortado. Es un método rápido y por eso se usa para el diagnóstico de biopsias obtenidas en el acto quirúrgico para que el cirujano proceda según este informe. Se lo usa también para visualización de lípidos y es muy útil en el estudio de tejido nervioso. Los micrótopos para corte incluidos en parafina son: el de deslizamiento, en el que la cuchilla es móvil y el tejido que se corta está fijos y el tipo Minot, en el que el tejido se moviliza y la cuchilla está fija. Los cortes pueden tener un espesor de 4 a 4 a 100 µm o más, según los tejidos que se deseen estudiar.

8- Colocación sobre portaobjeto: efectuados los cortes se colocan en agua tibia para que se extiendan y luego se recogen con un pincel y se los extienden en el portaobjetos y se dejan secar para su posterior coloración.

9- Desparafinización: se debe extraer toda la parafina del tejido y aclararlo nuevamente. Se utiliza Xilol.

10- Hidratación: se debe hidratar el tejido ya que la mayoría de los colorantes son de base acuosa. Para ello se coloca el portaobjeto en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes. Etanol 100%, 96%, 80%, 70% y Agua destilada

11- Coloración: es un completo complejo físico-químico que le confiere color a los tejidos durante tiempos prolongados. Las moléculas de colorantes tienen un grupo que es el que le confiere el color: cromóforo y otro que lo fija auxocromo. Los colorantes son sales pero se los clasifica en:

- **básicos:** en donde la molécula de sal que colorea es la base como por ejemplo el azul de toluidina, azul de metileno, hematoxilina;
- **ácidos:** donde la molécula de sal que colorea es el ácido como por ejemplo la eosina
- **neutros:** donde las dos partes de la solución salina proporcionan color, es un ejemplo de esta el eosinato de azul de metileno.

Tipos de coloración:

Comunes: hematoxilina y eosina, azul de metileno.

Específicas método de Regaud. Impregnación argéntica de Cajal o Golgi

Vitales: Intravitales: La coloración intravital consiste en inyectar una sustancia inocua para el animal pero que es fagocitada, por ciertas células, como por ejemplo los macrófagos o fagocitos.

Supravitales: La coloración supravital es la que colorea a los tejidos **vivos** pero separados del organismo. Ejemplo: verde jano para las mitocondrias.

Metacromáticas: La coloración metacromática es aquella que confiere al tejido un color diferente al del colorante utilizado. Por ejemplo al colorear gránulos de las células cebadas de color rojo.

12- Deshidratación: para preparar los preparados por tiempo prolongado. Se sumerge el preparado en soluciones de etanol de graduación crecientes (70%, 80%, 96%, 100%).

13- Aclaración: se utiliza xilol o benzol, y sirve para diluir la resina adhesiva utilizada para pegar el cubre objeto.

14- Colocación de cubreobjeto: se cubre el corte con un delgado vidrio (el cubreobjeto) que se adhiere con resina (bálsamo de Canadá) y permite su uso prolongado.

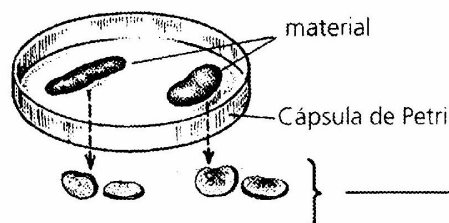
Artifícios de Técnicas:

Son todas las alteraciones que se producen en los preparados histológicos por defectos o fallas en una o más de las etapas de la técnica.

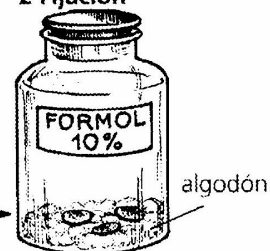
- Defectos de fijación, deshidratación, inclusión, pueden causar desgarros y retracciones.
- Si la acidez del formol no fue neutralizada, pueden aparecer gránulos coloreados por interacción del ácido fórmico con la hemoglobina.
- Durante el corte pueden aparecer desgarros por melladuras en la cuchilla.
- Si el corte no es cuidadosamente extendido pueden aparecer pliegues o arrugas.
- Defectos en la coloración son inherentes a la calidad y preparación de los colorantes así como insuficiente coloración.

Pasos de la técnica histológica.

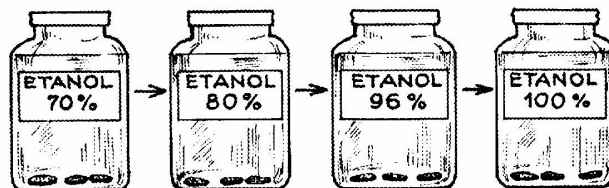
1 Toma de una muestra



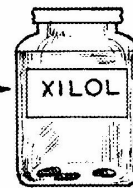
2 Fijación



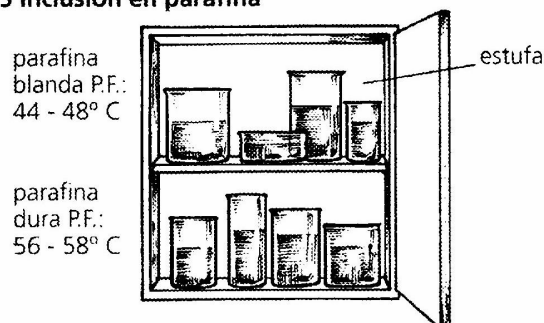
3 Deshidratación



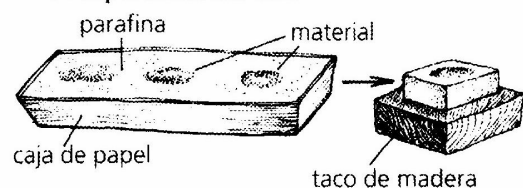
4 Aclaramiento



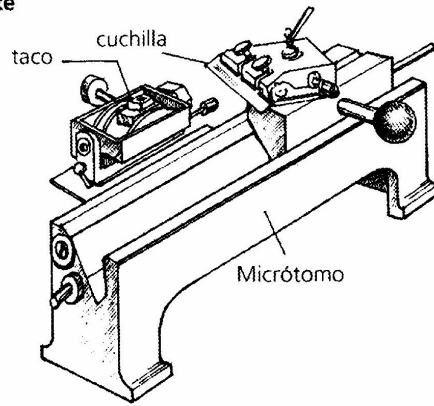
5 Inclusión en parafina



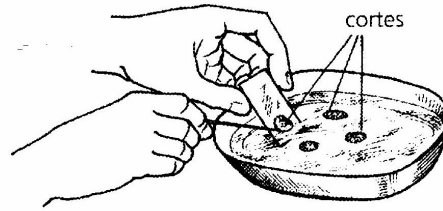
6 Preparación del taco



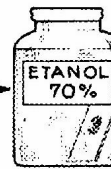
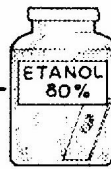
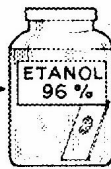
7 Corte



8 Colocación del sobre portaobjeto



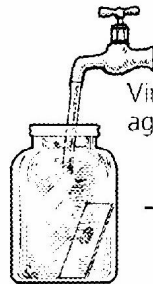
9 Desparafinización



10 Hidratación

11 Coloración

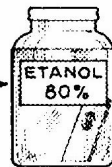
Hematoxilina



Eosina



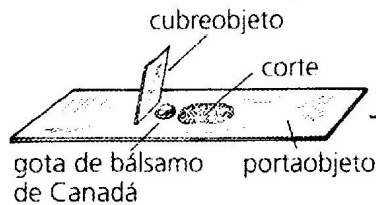
12 Deshidratación



13 Aclaramiento



14 Colocación de cubreobjeto



Preparación histológica en condiciones de ser examinada en el microscopio.

Actividades

1. Enumere los pasos de la técnica histológica.
2. A su criterio ¿cuál es el paso clave de la misma? ¿por qué?
3. ¿Cuáles son los colorantes más usados? ¿Qué estructuras celulares tiñen cada uno?
4. ¿Por qué debe desparafinarse el preparado antes de colorearlo?
5. ¿Cuál o cuáles piensa usted que son los artificios de técnicas más frecuentes de encontrar?
6. ¿Esta técnica histológica se usa para tejidos vivos o muertos?