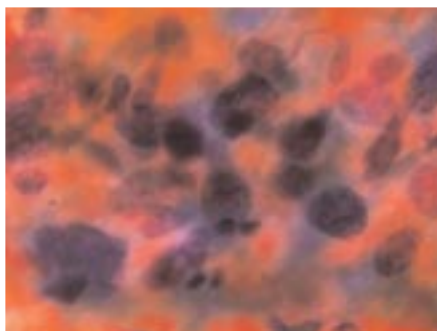
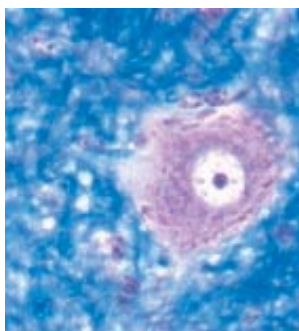


PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS BÁSICAS APLICADAS A LA HISTOTECNOLOGÍA

MÓDULOS

- Fijación, decalcificación, procesamiento.
- Citología
- Inmunohistoquímica
- Bioseguridad



REPRESENTANTE
EN ARGENTINA DE:

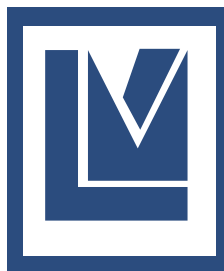


J. E. Uriburu 950 • Piso 5
(1114) Cdad. Autónoma de Buenos Aires
www.ht.org.ar • sah@ht.org.ar



REPRESENTANTE
EN ARGENTINA

LUIS MARSAN



Toda la gama de micrótomos,
procesadores de tejidos,
e insumos para la histología.



Deán Funes 427 (C.P 1214)
Buenos Aires – Argentina
Tel./Fax: 4931-6439 / 4130
www.luismarsan.com.ar

1.

FIJACION Y MEZCLAS FIJADORAS

Ht. Cristina T. Chaves

Ht. Mónica Elizabaraz

H.t. Patricia Alejandra Aragón

Dr. H.J. Aldana Marcos

Ht. Carlos Nastasi

PREPARACIÓN DE MUESTRAS



LUIS MARSAN

Deán Funes 427
Buenos Aires - Argentina
Tel: 4931-6439 / 4130
www.luismarsan.com.ar

Leica
MICROSYSTEMS



EG 1160



TP 1020



EG 1120

FIJACIÓN TISULAR

Cristina T. Chaves / Mónica Elizabaraz

Consiste en interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo.

TIPOS DE FIJACIÓN

En función de las características del estudio microscópico, se distinguen dos tipos de fijación.

Fijación histológica o citológica, que apunta principalmente a la conservación de la arquitectura y estructura de los tejidos y células, sin considerar los cambios moleculares inducidos sobre sus componentes bioquímicos.

Fijación histoquímica, que apunta a preservar la composición molecular y bioquímica de los tejidos por sobre los detalles morfológicos celulares.

CLASE DE AGENTES FIJADORES

Los agentes fijadores se clasifican, según su mecanismo de actuación en dos grupos: fijadores por métodos físicos y fijadores por métodos químicos. En el primer caso se utiliza un enfriamiento por congelación de por lo menos -50°C o menos, como método para detener la autólisis y la putrefacción tisular. En el segundo, los agentes fijadores generalmente en forma líquida, actúan desnaturalizando e insolubilizando las proteínas tisulares, lo cual bloquea la autólisis por inactivación enzimática. Además varios de éstos fijadores impiden el crecimiento bacteriano.

La fijación por métodos físicos de frío, es el método de elección para realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiere conservar intacta la estructura proteica o antigénica del tejido o su contenido enzimático. Una correcta fijación por congelado requiere de una realización inmediata: un congelado lento provoca la formación de microcristales intratisulares de hielo que pueden agregarse con el paso del tiempo y producir rotura y laceración tisular. Por esto, el enfriamiento de tejidos en congeladores o criostatos, por muy potentes que sean, no es lo ideal, salvo el estudio de congelación intraoperatorio. La congelación por inmersión directa en nitrógeno líquido (-180°C), previo enfriado en isopentano a -50°C para evitar la formación de cristales de agua, es el procedimiento ideal de criofijación. Existen otros métodos alternativos pero la criopreservación de una muestra continuada en el tiempo, requiere de éstos métodos.

CARACTERÍSTICAS QUE DEBE POSEER UN FIJADOR QUÍMICO

- Capacidad para bloquear de inmediato la autólisis. Este efecto depende principalmente de su poder para producir la desnaturalización proteica tisular, de manera que la actividad enzimática quede paralizada.
- Efecto microbicida que impide la acción bacteriana desencadenante de la putrefacción.
- No provocar en el tejido retracciones o distorsiones que determinen anomalías en su arquitectura.
- Inducción de cambios en la textura y composición tisular que favorezcan la inclusión, corte y coloración del material.

Se denomina **velocidad de penetración** a la rapidez con la que un fijador se difunde en el interior de un tejido. Por lo tanto el tamaño de la pieza que se ha de fijar deberá ser directamente proporcional a la velocidad de penetración del fijador. Tengamos en cuenta este parámetro ya que es muy variable entre los distintos fijadores. Aunque en la superficie de la muestra la fijación puede ser rápida, el fijador no llega al interior de la pieza hasta algún tiempo después de iniciada la autólisis, lo que puede hacer dificultoso un diagnóstico en piezas de gran tamaño.

Se denomina **velocidad de fijación**, al fenómeno químico determinado por el tiempo que tarda cada fijador en precipitar y estabilizar los componentes químicos de los tejidos. La velocidad de fijación de un agente químico no está siempre en concordancia con su velocidad de penetración, por ejemplo el formol es un fijador que penetra con relativa rapidez en el tejido pero sin embargo lo fija con cierta lentitud.

La capacidad de un fijador para provocar fenómenos de retracción o distorsión depende principalmente de los cambios inducidos sobre la **presión osmótica** de los tejidos. En condiciones normales es de 300 miliosmoles en los tejidos y se relaciona directamente con su contenido en sales y proteínas. Si la presión del tejido es superior a la del fijador, el agua es arrastrada hacia el interior, produciéndose su hinchamiento. En el caso contrario, el agua fluye hacia el fijador y ocurre una retracción tisular.

La **capacidad de inducción** sobre un tejido de efectos potenciadores que favorezcan su inclusión y corte depende de su capacidad para provocar desnaturalización proteica que determine un endurecimiento óptimo.

La inducción de un fijador potenciando cierto tipo de coloración depende del llamado **efecto mordiente**, por el cual a través de mecanismos diversos, se produce un incremento de la tinción provocada por un colorante determinado.

REGLAS GENERALES EN LA FIJACIÓN

- Para evitar la autólisis, el tejido debe ser colocado rápidamente en el fijador.
- El tejido debe estar seccionado en láminas que no superen los 0,4 cm de espesor máximo.
Si fuera necesario fijar un órgano en bloque, se deben realizar incisiones sobre la superficie y abrir las cavidades internas, para que el fijador alcance lo más rápidamente posible el interior del tejido.
- El volumen necesario de fijador está determinado por el volumen de la pieza y la relación debe ser veinte veces el volumen de la pieza.
- La presión osmótica del líquido fijador y la de la muestra serán equivalentes, de ser necesario se compensará la presión osmótica del fijador, utilizando soluciones salinas.
- El pH del fijador debe aproximarse al pH fisiológico, salvo que en su composición deba contener ácidos.
- El tiempo de fijación es específico para cada fijador, pero existe un tiempo máximo de fijación que no debe ser sobrepasado.

FIJADORES POR RETICULIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La fijación se produce por desnaturalización de las moléculas tisulares por rotura masiva de los puentes de hidrógeno determinantes de la estructura helicoidal y la formación ulterior de una malla reticular polipeptídica por enlaces químicos entre los grupos activos desmascarados por el líquido fijador.

Los principales agentes fijadores que actúan por éste mecanismo son el formaldehído, el Glutaraldehído, el Paraaldehído y el tetróxido de osmio.

• FORMALDEHÍDO (H-C=O H)

Detallaremos el proceso químico de fijación de éste agente fijador, por ser el más frecuentemente usado. La formalina es el nombre comercial de una solución que contiene un 40% de formaldehído y un 60% de agua.

El formaldehído forma complejos con la mayor parte de las macromoléculas tisulares. Su grupo aldehído (doble unión al oxígeno), se une a un único átomo de carbono. Esta unión es muy inestable (posee una alta energía) y se tratará de unir a otros grupos para disminuir esa energía. Específicamente el formaldehído se une a sitios que contienen átomos de hidrógenos reactivos, como las aminas, amidas, hidroxilos, péptidos, sulfidrilos, anillos aromáticos de aminoácidos, azúcares, grasas y posiblemente carboxilos. Se fijan proteínas, glico-proteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

La fijación con formaldehído produce “uniones cruzadas” mediante puentes metilenos entre las biomoléculas como proteínas, péptidos y los ácidos nucleicos. Produce un anclaje del citoesqueleto en los tejidos, manteniendo así la forma de la célula. Este fijador, puede también reducir los enlaces disulfuro de dos grupos sulfhidrilo, que a su vez, pueden reaccionar con el formaldehído y tomar parte en los enlaces metileno.

Este efecto de fijación denominado “*cross-linking*” (uniones o enlaces “cruzados” que se producen entre la molécula del fijador y la de la proteína), consigue su efecto de “fijar” las proteínas, pero éstas pueden perder su conformación espacial. Al momento de realizar técnicas de detección de antígenos en tejidos fijados en formol, puede ocurrir que los determinantes antigénicos, queden “ocultos”, impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico. En éstos casos, para revertir el efecto “*cross-linking*” del fijador, se realizarán métodos de reconversión antigénica.

El formaldehído disuelto en agua (formol), se hidrata a radical metilenglicol o sea es rápidamente convertido en metilenglicol (alcohol) que es su forma reactiva, quedando poca cantidad de aldehído (formaldehído). Posteriormente se produce un equilibrio entre formaldehído y metilenglicol.

Cuando los tejidos son inmersos en formol, son rápidamente penetrados por metilenglicol y el formaldehído presente en solución.

La fijación se produce por la unión covalente del aldehído con las proteínas, al principio, la cantidad de formaldehído es escasa, pero a medida que se une covalentemente a las proteínas, se produce mas formaldehído a partir del metilenglicol de la solución fijadora, continuando la fijación. De ahí es que una correcta fijación lleve su tiempo, según el tamaño de la muestra y de la temperatura, el grado de penetración del fijador establecerá un tiempo mínimo (de 4 a 24 hs estándar, para biopsias, 48 hs o más para piezas enteras).

Los aldehídos forman uniones cruzadas entre proteínas adyacentes. A ésta función de formar enlaces entre cadenas proteicas adyacentes, debe el formaldehído su éxito como fijador polimerizante. A medida que el formaldehído interactúa con los aminoácidos de las proteínas, se produce un gran número de grupos hidroximetilos. Mientras que el formaldehído reacciona con los hidroximetilos o con los residuos de aminoácidos aún no reactivos, crea puentes metilenos que producen la unión cruzada (cross-links) típica de la fijación con formol. El ADN también es afectado con la fijación con formol produciendo puentes metilenos entre las bases del ADN. También se producen puentes metileno entre el ADN y las histonas.

El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria, en muchos casos altera la reacción antigénica o la enmascara.

Se une a aminoácidos básicos como la lisina y forma los puentes metilénicos ya mencionados. Las uniones cruzadas forman una fuerte malla que inmoviliza todas las macromoléculas, asociándolas con la membrana y el citoesqueleto del citoplasma y del núcleo.

Las moléculas fijadas, se unen por numerosas uniones cruzadas con varias moléculas de formol y otras uniones iónicas, puentes de hidrógeno, de van der Waal que desnaturalizan las macromoléculas.

Los tejidos fijados en formol por 24 a 48 hs adquieren numerosas uniones cruzadas y otras uniones que no son alteradas con los subsecuentes pasos de la técnica histológica. En contraste, los tejidos fijados por menor tiempo (4 a 24 hs), son alterados luego por los pasos de la técnica histológica, por ejemplo las proteínas o los ácidos nucleicos son desnaturalizados por el alcohol, o el calor de la estufa.

La cantidad de uniones cruzadas dependerá de la concentración, pH, temperatura y tiempo de acción del fijador. Algunos autores señalan que el formol ácido (pH aproximado 4), produce fuertes uniones cruzadas a diferencia del formol bufferado neutro o básico. También indican (dando lugar a la polémica), que la fijación con formol bufferado inactiva mas grupos reactivos que el formol ácido, pudiendo producir un mayor enmascaramiento de grupos antigénicos.

El formol penetra 5 mm por cada 4 horas, aproximadamente, a temperatura ambiente. Si elevamos la temperatura hasta 37°, acortaremos los tiempos de penetración del fijador. Puede reducirse el tiempo, si la fijación se realiza a baja presión dentro de equipos automáticos de procesamiento de muestras. El microondas puede utilizarse para aumentar la difusión y reacción química del fijador. En cualquier caso se debe tener en cuenta que una rápida fijación de la superficie externa de la pieza, produce una lentitud en la penetración del fijador y puede producir una mala fijación del centro de la muestra. Por lo tanto es aconsejable si se ha de usar microondas, colocar las muestras por inmersión en el fijador a temperatura ambiente por una o dos horas y luego colocar los bloques en microondas durante 15 - 30 minutos a 30°.

Una fijación prolongada puede producir un decremento en el reconocimiento de los determinantes antigénicos. A mayor cantidad de uniones cruzadas entre proteínas adyacentes, aumenta la trama química y también se cubren los sitios antigénicos. Lo ideal es que se conozca el tiempo que lleva la muestra en formol. Las muestras no deben superar el espesor de 5mm y la cantidad de fijador debe ser igual o mayor a 10/20 partes por 1 de muestra.

Ventajas

1. Es el fijador más barato.
2. Es un muy buen fijador único.
3. No endurece excesivamente los tejidos y es un buen antimicrobiano.
4. Provoca escasa retracción tisular.
5. Posee una velocidad de penetración intermedia.
6. Excelente fijador para tejido adiposo y para lípidos en general.
7. El proceso de fijación puede ser acelerado o retrasado variando la temperatura o por agitación molecular.
8. Es compatible con la mayor parte de las tinciones.

Desventajas

1. Por acción de la luz y el oxígeno atmosférico se transforma progresivamente en ácido fórmico.
Debe guardarse en frascos opacos o emplearse en forma de solución neutra o tamponada.
2. Se consume durante el proceso de fijación, por lo cual debe encontrarse siempre en exceso.
3. Posee baja presión osmótica. El peso y volumen de la muestra una vez fijada se incrementa notablemente.
4. Puede originar pigmento formólico tras una utilización prolongada.
5. Puede desplazar sustancias, como hidratos de carbono.

Actualmente, se hace referencia al glyoxal, compuesto muy parecido al formol pero con dos grupos aldehídos reactivos ($O=CH-CH=O$). A diferencia del formol no produce vapores tóxicos y reduce los tiempos de fijación. La experiencia con éste fijador en nuestro medio, es poco conocida.

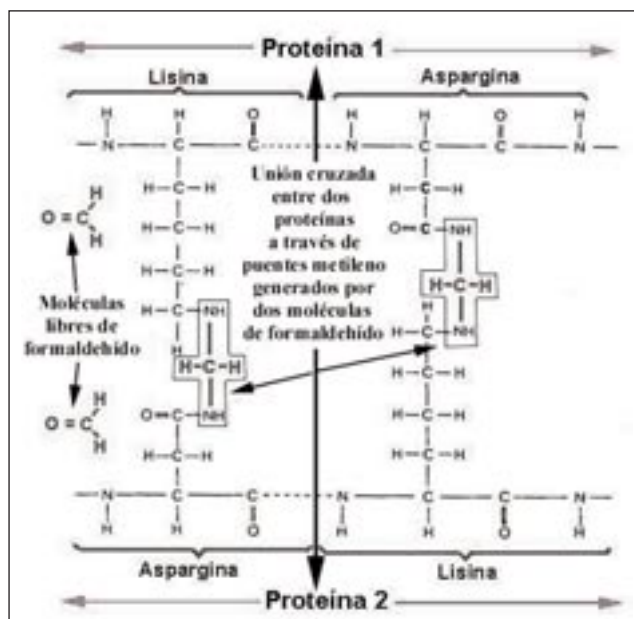
En la figura de la página 8, se observa la entrada de dos moléculas de Formaldehído reaccionando con grupos aminos. Entre las dos moléculas de proteínas se establece puentes de metileno formando uniones cruzadas.

Pasos de la fijación con formol

- El metilenglicol penetra rápidamente en los tejidos.
- El formaldehído lo hace mas lentamente (5mm cada 4 hs).
- El formaldehído se une lentamente en forma cruzada con las proteínas y los ácidos nucleicos.
- A partir del metilenglicol se forman más grupos formaldehído que continúan fijando el tejido.

• GLUTARALDEHÍDO ($COHCH_2CH_2CH_2COH$)

El Glutaraldehído forma más uniones cruzadas que el formaldehído, causando desnaturalización de las proteínas por alteración de la estructura alfa hélice.



Ventajas

1. Fija rápidamente y es un excelente fijador de microscopía electrónica.
2. Excepcional capacidad para preservar la morfología celular.

Desventajas

1. Tiene una velocidad de penetración muy baja, por eso el tamaño y grosor de las muestras deben ser milimétricas.
2. Al producir múltiples uniones cruzadas, no es fijador de elección para inmunohistoquímica en microscopio óptico.
3. Produce una gran retracción y endurecimiento tisular, que impide prolongar el tiempo de fijación más allá de las 4 horas.
4. Su osmolaridad es muy baja por lo que debe ser empleado en soluciones tamponadas.

• TETRÓXIDO DE OSMIO (OsO₄)

El tetróxido de osmio o ácido ósmico actúa por reticulación de las proteínas y grasas al formar peróxidos con ellas.

Ventajas

1. Es un excelente fijador estructural. Se utiliza en microscopía electrónica como segundo fijador y como agente de contraste.
2. Es ideal para fijar lípidos complejos, especialmente esfingolípidos y esfingomielina.

Inconvenientes

1. Es muy caro y se descompone en presencia de la luz.
2. Es muy insoluble, dificultoso de preparar en soluciones acuosas.
3. Es muy tóxico
4. Posee muy baja capacidad de penetración.
5. Es incompatible con fijadores reductores.
6. Dificulta la coloración nuclear y la reacción de PAS.
7. Inactiva casi por completo a las enzimas y altera notablemente la composición antigénica.

FIJADORES POR DESHIDRATACIÓN TISULAR

Sustancias altamente higroscópicas, que actúan eliminando tanto el agua libre como el agua ligada a las moléculas proteicas. Este cambio proteico provoca una desnaturalización, con alteraciones en la organización y estructura celular. Alteran poco la estructura antigénica. El fundamento de la fijación por deshidratación radica en la competencia que entablan éstos fijadores con las proteínas por las moléculas de agua cuando se encuentran en solución concentrada. Estas sustancias higroscópicas tienden a estabilizarse molecularmente cuando forman puentes de hidrógeno a través de los iones dipolares del agua sustraída de las proteínas.

Estos agentes fijadores ejercen sobre las grasas una disolución parcial y sobre los hidratos de carbono, una completa conservación. Por la rápida salida de agua tienden a un endurecimiento excesivo de los tejidos. Dentro de este grupo se encuentran: El alcohol etílico, el alcohol metílico, la acetona y el cloroformo.

Los fijadores alcohólicos como el metanol, el etanol y la acetona, son considerados fijadores precipitantes ya que desnaturalizan las pro-

teínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria (tridimensional) de la molécula proteica. La estructura primaria y secundaria se mantiene intacta y si la secuencia aminoacídica es la que actúa como antígeno, son fijadores ideales para técnicas inmunohistoquímicas. La acetona y el metanol son poco penetrantes, se los utiliza generalmente para frotis o secciones de criostato.

• **ALCOHOL ETÍLICO (CH₃-CH₂OH)**

Ventajas

1. Fija y deshidrata el tejido al mismo tiempo.
2. Posee gran velocidad de penetración.
3. Precipita muy rápidamente las proteínas y el glucógeno.
4. Es un potente agente bactericida y por lo tanto un buen conservante.

Desventajas

1. Es un fuerte reductor, incompatible con fijadores oxidantes como el Dicromato de potasio y el Tetróxido de osmio.
2. Fija parcialmente la cromatina, pues disuelve en parte los ácidos nucleicos.
3. Extrae parcialmente los lípidos
4. Endurece y contrae excesivamente los tejidos.
5. A medida que ocurre el proceso de fijación, se va diluyendo al incorporar el agua que extrae de los tejidos, por lo que pierde actividad progresivamente.
6. Carece de efecto mordiente.
7. Da origen al desplazamiento de sustancias.

• **ACETONA (CH₃-C=O-CH₃)**

Ventajas

1. Preserva la estructura antigénica y la actividad enzimática para métodos inmunohistoquímicos e histoquímicos.
2. Es de rápida penetración, por lo tanto es la alternativa para fijar cortes congelados

Desventajas

1. Provoca una gran contracción tisular
2. Debido a su rapidez de acción y a su capacidad de endurecimiento, es imprescindible controlar el tiempo de fijación, que no deberá superar las 2 a 3 horas.
3. Disuelve las grasas, a excepción de algunos lípidos complejos como los fosfolípidos y galactolípidos.

FIJADORES POR CAMBIOS EN EL ESTADO COLOIDAL DE LAS PROTEÍNAS

Los fijadores contemplados en este grupo son de carácter ácido, se emplean formando parte de mezclas fijadoras, tienen una gran velocidad de penetración en los tejidos y algún poder decalcificador.

Las soluciones coloidales que forman las proteínas, precipitan en presencia de éstos fijadores ácidos, que disminuyen el pH de la disolución hasta alcanzar el punto isoeléctrico de las moléculas en disolución coloidal.

• **ÁCIDO ACÉTICO (CH₃-COOH)**

Ventajas

1. Es un fijador ideal para nucleoproteínas y ácidos nucleicos.
2. Al precipitar las proteínas sin sustraer el agua de los tejidos (no es higroscópico), produce en ellos un edema intersticial que compensa la excesiva retracción causada por otros agentes fijadores.

Desventajas

1. Es un mal fijador de membranas y citoplasmas celulares.
2. Destruye las mitocondrias.

• **ÁCIDO TRICLOROACÉTICO (Cl₃ C – COOH)**

Ventajas

1. Fija adecuadamente todo tipo de estructuras nerviosas.
2. Actúa como medio decalcificador.

Desventajas

1. Disuelve las nucleoproteínas y ácidos nucleicos.
2. Produce un hinchamiento excesivo de los tejidos que provoca artefactos tras la deshidratación previa a la inclusión en parafina.

• **ÁCIDO CRÓMICO (H_2CrO_4)****Ventajas**

1. Es un excelente fijador estructural
2. Por ser un fuerte agente oxidante, actúa como mordiente en tinciones que emplean colorantes básicos.

Desventajas

1. Es incompatible con fijadores reductores como el formol y los alcoholes.
2. Posee una escasa velocidad de penetración
3. Impregna de una coloración verdosa los tejidos, que requiere de lavado abundante en agua destilada luego de su acción.

FIJADORES POR FORMACIÓN DE SALES CON LOS TEJIDOS

En éstos casos, el agente fijador es un catión metálico, fundamentalmente cromo o mercurio, o un derivado orgánico como el ácido pícrico, que forman con los tejidos proteínatos metálicos o picratos.

Los agentes de éste grupo poseen una gran velocidad de fijación, ya que la formación de las sales se produce instantáneamente. Sin embargo se forma un efecto barrera al actuar como obstáculo mecánico los proteínatos formados en superficie, dificultando la penetración del fijador. La precipitación metálica produce además un gran endurecimiento, lo que obliga a emplearlo en mezclas fijadoras que amortigüen éste efecto.

• **CLORURO MERCÚRICO O SUBLIMADO ($HgCl_2$)****Ventajas**

1. Es un excelente fijador de los caracteres morfológicos celulares, de elección para patologías hematopoyéticas y renales.
2. Provee de la observación de los finos detalles nucleares y citoplasmáticos
3. Es un excelente mordiente, ya que los puentes de hidrógeno intramoleculares de las proteínas quedan preservados tras la fijación y pueden reaccionar luego con los colorantes.
4. Produce una intensa y brillante coloración nuclear y citoplasmática.
5. Post-fijación, los tejidos pueden conservarse indefinidamente en alcohol 70° - 80°

Desventajas

1. No es un buen conservante
2. Escasa capacidad de penetración. Requiere un fraccionamiento delgado del tejido.
3. Si se prolonga la fijación, contrae y endurece los tejidos dificultando mucho la obtención de los cortes en el micrótom. Por esto el tiempo máximo de fijación no debe extenderse a más de 4 a 6 horas.
4. Da origen a precipitados metálicos de color pardo que deben tratarse para su eliminación con soluciones alcohólicas yodadas como el Lugol.
5. Por la intensa eosinofilia citoplasmática que provoca, puede dificultar el reconocimiento de zonas de necrosis.

• **DICROMATO DE POTASIO ($K_2Cr_2O_7$)****Ventajas**

1. Produce un fuerte efecto mordiente, al oxidar los grupos alcohólicos de las grasas y polisacáridos a aldehídos e incrementa la basofilia de las proteínas cuando se emplea a un pH muy ácido. Es aconsejable emplearlo en mezclas fijadoras como amortiguador de la intensa eosinofilia citoplasmática que provocan otros fijadores.
2. Es un excelente fijador para lípidos complejos, por ejemplo la mielina, las mitocondrias y el aparato de Golgi que los contienen en abundancia.
3. Es un fijador ideal para demostrar la reacción cromafín y para realizar técnicas de impregnación argéntica de las células del sistema nervioso central.

Desventajas

1. Por ser un fuerte oxidante es incompatible con agentes reductores como alcoholes y formaldehído.
2. Posee una baja velocidad de penetración y endurece escasamente los tejidos

3. Provoca artefactos tisulares como aparición de vacuolas citoplasmáticas, retracciones y cambios en la morfología nuclear.
4. En soluciones no acidificadas, el Dicromato disuelve la cromatina. Por eso es necesario asociarlo con ácido acético en mezclas fijadoras.
5. Post-fijación los tejidos deben ser lavados en solución salina o tamponada para evitar el depósito de pigmento verde.

• **ÁCIDO PÍCRICO (2,4,6- TRINITROFENOL)**

Ventajas

1. Excelente fijador estructural, que conserva la composición proteica.
2. Óptima contracción de los tejidos.
3. Buena velocidad de fijación.
4. No disuelve el glucógeno ni los lípidos.
5. Posee acción decalcificante.
6. Gran estabilidad en soluciones.

Desventajas

1. En estado puro es explosivo si se somete a la acción del calor. Debe mantenerse alejado de las fuentes de calor.
2. Si se prolonga el tiempo de fijación (4 a 18 hs) provoca una excesiva retracción tisular.
3. Disuelve precipitados cálcicos y hemosiderina.
4. No puede ser utilizado para fijar ciertos tejidos porque los hace frágiles y quebradizos para el corte.
5. Si el ácido pícrico no es completamente eliminado antes de la inclusión, provoca un continuo deterioro de la estructura tisular. La eliminación se efectúa mediante lavados sucesivos en alcohol de 70° a 80°.

MEZCLAS FIJADORAS

MEZCLAS FIJADORAS A BASE DE BICLORURO DE MERCURIO

El cloruro de mercurio (sublimado, bicloruro de mercurio) así como otras sales de mercurio fueron comunes fijadores histológicos en el pasado. Penetra rápidamente y precipita todas las proteínas, reaccionando con un número de residuos aminoacídicos, incluidos los grupos tiol, amino, imidazol, fosfato e hidroxilo. Los cristales de mercurio depositados en el tejido, necesitan ser removidos antes de continuar la técnica histológica con soluciones a base de sales de yodo (Lugol). El cloruro de mercurio está contenido en mezclas como el Zenker, Helly, Ridley y la solución de B 5.

• **SOLUCION DE B-5:** Mezcla a base de cloruro mercúrico, acetato de sodio y formol especialmente indicada para la conservación de la morfología del sistema hematopoyético y linfóide. Otorga la observación de los finos detalles nucleares en patologías de ganglio, bazo, timo y médula ósea. También está indicado para riñón, hígado, fibras de tejido conectivo y fibrina. Conserva muy bien la estructura antigénica celular. El espesor máximo de las muestras no debe superar los 0.4 cm a causa del escaso poder de penetración de la mezcla y el tiempo de fijación no debe superar las 4 a 6 hs. Tras la fijación, los tejidos pueden conservarse indefinidamente en alcohol 70–80.

• **ZENKER FORMOL (Líquido de Helly):** Mezcla parecida al B-5 con las mismas utilidades en la elección de fijaciones de tejidos. A base de cloruro mercúrico, dicromato de potasio, sulfato sódico y formol. En cuanto a la conservación de la estructura antigénica, no es tan buena como el B-5 debido a la intensa oxidación inducida por la sal de cromo. Post- fijación es necesario eliminar el pigmento mercúrico con soluciones yodadas (Lugol o Gram), que transforman el mercurio metálico en yoduro mercúrico que luego se torna soluble en tiosulfato sódico. Este procedimiento se realiza sobre los cortes, antes de las coloraciones.

OTRAS MEZCLAS A BASE DE DICROMATO DE POTASIO

• **FIJADOR DE MÜLLER:** Solución acuosa a base de dicromato de potasio y sulfato sódico. Su importancia actual radica en que se emplea para preparar los fijadores de Orth y Zenker. El tiempo de fijación oscila entre 24 a 48 hs. Tras la fijación es necesario lavar abundantemente en agua corriente durante unas horas.

• **FIJADOR DE ORTH:** Se emplea casi exclusivamente para demostrar reacción cromafín o en ciertas técnicas de impregnación argéntica para tejido nervioso (técnica rápida de Golgi). Contiene dicromato de potasio, sulfato sódico y formol. El tiempo de fijación para tejido nervioso es de 48 hs. Tras la fijación se lava abundantemente en agua y los tejidos pueden ser almacenados en alcohol 70° a 80°.

SOLUCIONES DE METALES PESADOS, SALES DE ZINC

Las sales de zinc pueden ser potentes precipitantes proteicos, formando complejos insolubles con los polipéptidos.

La solución de Zinc formalina ha sido propuesta por algunos autores como un fijador de preservación antigénica para mejorar los resultados de una inmunotinción. La introducción de una mezcla fijadora a base de sulfato de zinc y formol no bufferado dentro de los procesadores automáticos de tejidos, no han producido efectos deletéreos en los mismos.

Otra mezcla fijadora propuesta es el fijador de Fish (descubierto por F.Blum, Alemania 1893), a base de cloruro de zinc, formalina y agua.

MEZCLAS FIJADORAS A BASE DE ÁCIDO PÍCRICO

- **BOUIN:** Este fijador es conocido por penetrar rápidamente y causar una leve contracción en los tejidos. Contiene ácido pícrico, formol y ácido acético, los cuales precipitan las proteínas, coagulándolas, que se combinan para formar picratos y también producen uniones salinas intermoleculares. (Pearse, 1980). El tiempo de fijación es de entre 4 a 24 hs, según el tamaño de la pieza. Tras la fijación, se lava abundantemente en alcohol de 70° a 80° para eliminar totalmente el ácido pícrico. Tiene poder decalcificador y se lo utiliza alternativamente para fijación de médula ósea y también para testículo.

- **BOUIN HOLLANDE:** Variante del Bouin que contiene acetato de cobre, ácido pícrico, formol y ácido acético. Indicado para biopsias de médula ósea. La solución se conserva indefinidamente a temperatura ambiente. El tiempo de fijación oscila entre 48 a 72 hs. Tras la fijación debe lavarse abundantemente en alcohol 70° a 80°.

- **DUBOSCO-BRASIL (Bouin Alcohólico):** Alternativa de la mezcla de Bouin que posee una velocidad de penetración más elevada. Especialmente indicado para fijación de sustancias hidrosolubles como el glucógeno, ya que evita su disolución. Es un excelente fijador de membranas, glucógeno y de fibras del tejido conectivo. Está indicado para fijación de biopsias renales. Mordiente ideal para evidenciar PAS, tricrómicos y técnicas de metenamina plata. Tras la fijación se lava varias veces en alcoholes de gradación creciente.

- **LÍQUIDO DE GENDRE:** Variación del Bouin alcohólico indicada para la fijación de glucógeno y pigmentos derivados de la hemoglobina.

FIJACIÓN PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN Y/O PROCESADO HISTOLÓGICO SOBRE LOS ANTÍGENOS:

Desnaturalización de las proteínas

Por acción de diversos agentes las proteínas pueden alterarse y perder su estructura terciaria o cuaternaria, o aún su estructura secundaria. Este fenómeno se denomina desnaturalización, por ésta causa la proteína pierde en gran medida su actividad biológica.

El fenómeno en algunos casos es reversible y en otros irreversible.

Algunos factores que desnaturalizan las proteínas son:

- Físicos: por ejemplo calor (encima de 37°), las radiaciones, los ultrasonidos, etcétera.
- Químicos: por acción de ciertos fijadores, solventes y reactivos como:
 - Fijadores simples como el formol o alcohol 96° o 100°.
 - Mezclas fijadoras
 - Ácidos fuertes, que las coagulan irreversiblemente, como el nítrico, el tricloroacético y el pícrico.
 - Soluciones a pH extremos, menores de 3 o mayores de 10.
 - Disolventes orgánicos, como los alcoholes, acetona, intermediarios.
 - Sales de metales pesados, con las que las proteínas forman sales complejas.
 - Sales neutras como el sulfato de amonio, de sodio, etc.

Las proteínas, son macromoléculas con una “conformación espacial determinada”, que puede perderse parcialmente bajo los efectos de una fijación química determinada.

FIJADORES

El fijador, no sólo debe encontrarse en forma rápida y disponible, de fácil preparación, sino además preservar la integridad antigénica, limitando la extracción, difusión o remoción del antígeno procesado.

También debe brindar una buena preservación de los detalles morfológicos y permitir una adecuada penetración en el tejido de los reactivos, sin interferir en las subsecuentes reacciones antígeno-anticuerpo.

De la variedad de fijadores que utilizamos frecuentemente, indudablemente es el formaldehído, el que reúne todas las anteriores con-

diciones. Por lo tanto al elegir un fijador debemos tener en cuenta que si hemos de usar mezclas fijadoras, preferentemente deben contener en su composición formol, además de un determinado pH, que no provoque una desnaturalización irreversible, o que directamente destruya a un antígeno determinado.

Técnicas efectuadas por fijación a temperaturas que superen los 30° C hasta 37°C o más, combinando fijación química y física por calor, pueden llevar a la destrucción antigénica, proceso que, por supuesto, es irreversible.

Principios generales de la fijación

1. No existe un método universal de fijación, o lo que es lo mismo, un agente fijador adecuado para un tejido, puede no serlo para otro.
2. No todos los fijadores conservan indefinidamente el tejido, ya que la fijación no equivale a conservación tisular.
En el caso del formol, el fijador más utilizado, es al mismo tiempo un excelente conservante.
3. Un "defecto de fijación" jamás puede ser corregido.
4. Es inútil realizar cualquier estudio histológico sobre un material con graves defectos de fijación.

Propósito de la fijación en inmunocitoquímica

- Frenar rápidamente la actividad enzimática que produce la autólisis celular.
- Evitar la difusión hacia fuera o hacia adentro de la célula, de proteínas o péptidos.
- Fortalecer el tejido para soportar los efectos deletéreos de los tratamientos de la técnica histológica.
- Preservar el tejido.

Si el antígeno se halla en péptidos de menor tamaño, conviene utilizar fijadores que produzcan uniones cruzadas ya que éstas evitan la difusión del péptido.

Se pueden utilizar también mezclas fijadoras mixtas es decir, precipitantes y formadoras de uniones cruzadas a la vez, como el Bouin o el Zamboni que llevan ácido pícrico (precipitante) y formol o mezclas fijadoras que contienen formol (formador de uniones cruzadas).

FACTORES QUE PUEDEN INFLUENCIAR EN EL RESULTADO DE UNA INMUNOMARCACIÓN

1. La fijación
2. El procesamiento de la muestra.
3. La naturaleza del antígeno
4. Su concentración en la muestra
5. Su distribución (nuclear, citoplasmática, relacionado a membranas, sean citoplasmáticas o nucleares, o extra celular)

Como ya se ha referido, los mejores para las técnicas de inmunohistoquímicas son los que contengan en su composición formol, o mezclas fijadoras con formol (Zenker, B5, formol con sales de zinc, etc.). También se usa frecuentemente Bouin o Duboscq-Brasil, que por regla general, no provocan una desnaturalización irreversible de las muestras. Otro fijador utilizado, buen preservador de cantidad de antígenos, pero de penetración más lenta que el formol, es el etanol 96°, que se utiliza usualmente en citología. Para tejidos, el etanol solo, produce generalmente una retracción y distorsión de la morfología. Puede usarse con mejores resultados morfológicos y antigénicos en mezclas fijadoras, o bajo una fijación en frío que es la base del método de Sainte-Marie, indicado especialmente para la demostración de algunos antígenos. Cada uno de éstos fijadores, tiene un poder de penetración distinto. Un buen fijador, debe brindar el mejor detalle morfológico, en un tiempo de fijación lo más breve posible.

El siguiente cuadro esta basado en una modificación de guías de Taylor, Battifora y otros autores, sobre la base de la experiencia de nuestro Laboratorio

PRESERVACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD	
CALIDAD DE PRESERVACIÓN	FIJADOR
Buena	Formol neutro, B5, Fish, Zinc Formol
Intermedia	Formol pH ácido, Bouin, Duboscq-Brasil, Zenker, Helly, Zamboni
Mala	Fijadores oxidantes, dicromatos, permanganatos ácidos.

CONTROL DE FIJACIÓN (BATTIFORA 1987)

Puede usarse como molécula indicadora de labilidad de marcación debida a la fijación, la identificación de vimentina. Ésta es una molécula lábil, que se ve adversamente afectada por la fijación y el procesado. Por lo tanto, si la vimentina es detectable en la muestra de

estudio, se puede presumir de que otros antígenos puedan también ser detectados. Pueden usarse otros controles, tales como Keratinas o factor VIII, pero la vimentina es la más indicada, ya que casi siempre los cortes contienen algunas células de origen mesenquimático o endotelios, cuya reacción debe ser positiva.

• **pH de fijación**

En general, la mayor preservación morfológica y antigénica, se obtiene usando fijadores a pH neutro o fisiológico. A pH ácido, la antigenicidad puede verse afectada según el fijador. Por debajo de pH 3, la antigenicidad de las moléculas puede perderse, probablemente como resultado de la destrucción de la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de las proteínas.

Los agentes descalcificadores ácidos, en especial si se usan por largo tiempo, pueden también provocar la pérdida parcial o total de la antigenicidad. No obstante, la inmunoreactividad puede ser recuperada por pretratamiento de los tejidos con una base fuerte.

• **Temperatura**

Dentro de los límites indicados, la temperatura de fijación, no es probablemente crítica. Para la mejor preservación de la morfología y antigenicidad, la fijación a temperatura ambiente o en frío, es aún el método indicado. De cualquier manera, la temperatura de fijación no debe exceder los 30°C hasta los 37°C, siendo ya crítica a los 40°C. De fijar una muestra a estas temperaturas (entre 32°C a 37°C), se tendrá especial cuidado en el tiempo.

SOLUCIONES FIJADORAS MÁS UTILIZADAS

• **FORMOL TAMPONADO**

Agua destilada	900 ml
Fosfato sódico monobásico	4 gr
Fosfato sódico dibásico anhidro	6,5 gr
Formaldehído puro (40%)	100 ml

• **LÍQUIDO DE BOUIN**

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	750 ml
Formol concentrado	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml

• **DUBOSCO-BRASIL (Bouin alcohólico)**

Alcohol etílico al 80%	75 ml
Ácido pícrico	0,5 gr
Formol concentrado	30 ml
Ácido acético glacial	7,5 ml

• **SOLUCIÓN DE B-5**

Solución stock

Bicloruro de mercurio	12 gr
Acetato sódico	2,5 gr
Agua destilada	200 ml

Solución de trabajo

En el momento de uso, mezclar:

Solución stock de B-5	20 ml
Formaldehído concentrado 40%	2 ml

• **SOLUCIÓN DE ZENKER - FORMOL (Líquido de Helly)**

Solución stock de Zenker

Bicloruro de mercurio	5 gr
Bicromato de potasio	2,5 gr
Sulfato sódico	1 gr
Agua destilada	100 ml

Solución de trabajo

Solución stock de Zenker	95 ml
Formol concentrado 40%	5 ml

• **ELIMINACIÓN DEL PIGMENTO MERCÚRICO (para B-5 y Zenker)**

Solución de Lugol

Yoduro de potasio..... 2 gr

Yodo en cristales..... 1 gr

Alcohol etílico de 70°- 80°..... 100 ml

Solución de tiosulfato sódico

Tiosulfato de sodio..... 5 g

Agua destilada..... 100 ml

• **ZINC FORMOL**

Formol 37 / 40%..... 100 ml

Agua destilada..... 900 ml

Sulfato de zinc..... 10 gr

• **FIJADOR DE FISH**

Agua destilada..... 2000 ml

Formol concentrado 40%..... 50 ml

Cloruro de zinc..... 15 gr

BIBLIOGRAFIA

- Laboratorio de anatomía patológica: Raimundo García del Moral (Editorial Interamericana 1993).
- Fijación en inmunocitoquímica: Prof.Dr. Hernán J. Aldana año 2002.
- Histochemistry Theoretical and Applied 3rd ed.: A.G. Everson Pearse, 1968.
- Fixation for the 1990s: a review of needs and accomplishments (Biotechnic & Histochemistry): R.W. Dapson 1993.
- Formaldehyde: Past, Present & Future: Richard W. Dapson 2002.
- Histopathologic Technique and Practical Histochemistry 3rd ed.: Lillie RD, Mc Graw-Hill, 1965.
- Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist: Taylor & Cote (second edition), 1995.
- Inmunohistochemistry in tumor diagnosis: Congreso Argentino de Patología: Héctor Battifora, Mar del Plata, 1992.
- Fijación y técnicas especiales en biopsias renales: Ht. Claudio Núñez 2003 hernan_1332@hotmail.com

Páginas de internet

www.137.77.9/sakura/pdf#.formaldehyde
www.mastertechs.com/literature/library/minimizs.htm
www.home.primus.com.au/royellis/fix.htm
www.keithlynch.net/cryonet/48/05.html
www.medlib.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html
www.publish.uwo.ca/-jkieran/faqulist.htm
www.dakousa.com/ihcbook/ihc_pdf/fixation.pdf
www.cvm.missouri.edu/vmdl/ramos/ihc/Review%20of%20IHC/html/Fixation.htm
www.my.net-link.net/-anatech/www/anatech/Innovator4.html

Referencias

- Ht. Cristina T. CHAVES / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar
- Ht. Mónica ELIZABARAZ / Hospital de Clínicas "José de San Martín" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / elizabaraz@hotmail.com

DECALCIFICACIÓN

Ht. Cristina Chaves

Se denomina **decalcificación** a la completa eliminación de sales de calcio presentes en los tejidos después de haber realizado su fijación. Los principales agentes decalcificadores están formados por ácidos fuertes o débiles, empleados en forma aislada o conjuntamente con distintos líquidos fijadores. Además se utilizan resinas de intercambio iónico, quelantes químicos, disociación electrolítica y emisores de ultrasonido, como aceleradores del proceso decalcificador.

DECALCIFICACIÓN QUÍMICA

- **Ácidos inorgánicos fuertes:** ácido nítrico, ácido clorhídrico.
- **Ácidos inorgánicos débiles:** ácido sulfuroso.
- **Ácidos orgánicos:** ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido pícrico.
- **Agentes quelantes:** ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA).

La elección de un agente decalcificador depende de la dureza de la muestra a decalcificar y de los estudios posteriores que se deben realizar. No es lo mismo tratar huesos compactos o dientes, que huesos esponjosos. Siempre se tendrá en cuenta que si se decalcifica excesivamente, se destruirán los componentes titulares y no se arribará a un diagnóstico apropiado.

El ácido nítrico es el agente más rápido y eficaz, sin embargo utilizado en altas concentraciones (superiores al 6%), tiende a producir gran destrucción tisular, además de interferir en las coloraciones posteriores. En nuestra experiencia, su uso quedará limitado a huesos compactos o dientes. El ácido clorhídrico si bien no es tan rápido como el nítrico, produce menor agresión tisular y no precisa lavado post-decalcificación.

Los ácidos orgánicos producen escasos artefactos tisulares e interfieren poco en los resultados finales de la tinción. Sin embargo actúan lentamente y requieren la renovación frecuente del líquido decalcificador. Se usan frecuentemente en tejido óseo esponjoso.

Para disminuir en lo posible las alteraciones del agente decalcificador, la fijación de la muestra debe haberse completado, antes de iniciar el proceso. Los fijadores que contienen dicromato de potasio, bicloruro de mercurio (B-5, Zenker, Helly) o formaldehído tamponado, mejoran notablemente el procedimiento de decalcificación, aceleran el proceso, reducen la hinchazón del colágeno, del estroma y de la matriz ósea.

El método a seguir lo determina el tamaño y dureza del material: si son huesos grandes conviene cortarlos con sierras finas en tacos de no más de 5 mm. de espesor. Cuando el tejido óseo está infiltrado por tumor, se deben separar las partes blandas para su procesado rutinario y las partes óseas para el proceso de decalcificación.

Si bien temperaturas mayores a 25°C aceleran la decalcificación, también producen más alteraciones tisulares. A los 60°C la maceración es máxima. Para evitar éstos procedimientos irreversibles, es conveniente tratar las muestras a temperatura ambiente con una agitación suave manual o mecánica que también acelera el proceso decalcificador.

Debe usarse un volumen óptimo del líquido decalcificador, mínimo 1/20, que será renovado con frecuencia. Los bloques deben ser suspendidos en el centro del recipiente de decalcificación, ya que el fondo acumula la mayor concentración de sales cálcicas solubles.

Las muestras se controlan diariamente por medio de agujas de histología u hojas de bisturí hasta que la penetración sea óptima, o cuando el espécimen tenga la consistencia de "goma de borrar". Se puede realizar alternativamente una prueba química para controlar la decalcificación.

Después del proceso de decalcificación en el que se han empleado ácidos, el exceso de estos últimos deberá ser eliminado mediante lavados en soluciones neutralizantes. En el caso del ácido nítrico, el más potente y agresivo decalcificador, el primer lavado se realiza en solución de sulfato sódico al 5% y luego abundante lavado en agua corriente.

La coloración de tejidos decalcificados puede ser interferida por un exceso residual de los ácidos empleados. Un pretratamiento de los cortes en solución acuosa de carbonato de litio al 1% mejora la neutralización.

LOS DECALCIFICADORES MÁS USADOS EN NUESTRO MEDIO SON

- Ácido fórmico - Ácido clorhídrico
- Bouin
- EDTA
- Jenkins
- Ácido nítrico

Se determina el decalcificador de acuerdo a la pieza recibida. Si es hueso compacto, se puede utilizar Jenkins o nítrico y para huesos más blandos o médulas, EDTA, ácido fórmico - clorhídrico, o Bouin.

DECALCIFICACIÓN DE MÉDULA ÓSEA

Estas biopsias se obtienen por punción aspiración (de 1 a 2 cm. de longitud) y frecuentemente se realizan improntas o extendidos que son utilizados en hematología.

En el caso del tratamiento de las biopsias de médula ósea, es imprescindible la combinación de una fijación y decalcificación adecuada. Si bien en la literatura encontraremos variados procedimientos, en nuestro medio se plantean controversias en cuanto a la fijación y decalcificación ideal. Sin embargo, varios autores coinciden que lo más importante en éstos procedimientos, será la conservación morfológica y bioquímica de la estructura linfóide, lo más adecuada posible para la demostración de antígenos tisulares.

Los artefactos de extracción del material, del proceso de fijación y/o de decalcificación, pueden tornarse irreversibles para su estudio anatomopatológico.

En nuestra experiencia, el procedimiento ideal para médula ósea se obtiene con una fijación en Bouin (máximo 4 hs) seguida de una decalcificación en EDTA.

El Bouin es un excelente fijador con cierto poder decalcificador. Por eso es que frecuentemente se lo utiliza en nuestro medio como fijador-decalcificador. Sin embargo como agente decalcificador debe someterse la muestra a un tiempo de exposición generalmente mayor a las 24 hs. Este tiempo prolongado en el agente, perjudica la demostración de antígenos tisulares.

OTRAS COMBINACIONES ADECUADAS SON

- Fijación en formol tamponado – Decalcificación en EDTA
- Fijación en B5 – Decalcificación en EDTA
- Fijación en formol tamponado, B5 o Helly - Decalcificación en ácido fórmico-clorhídrico

APÉNDICE: SOLUCIONES

• FORMOL TAMPONADO

Formol al 38 % - 40 %	100 ml
Agua destilada	900 ml
Fosfato de sodio monobásico	4 gr
Fosfato de sodio dibásico	6,5 gr

• BOUIN

Solución saturada en agua destilada de ácido pícrico.....	750 ml
Formaldehído 38% - 40%.....	250 ml
Ácido acético glacial	50 ml

pH final aproximado: 2.5

Controlar la decalcificación. Una vez concluido el proceso, lavar abundantemente en alcohol 70° como paso previo a la deshidratación e inclusión en parafina.

• EDTA (ácido etilendiaminotetracético)

Sal disódica de E.D.T.A.....	5,5 gr
Formol neutro al 10%	100 ml

El tiempo medio de decalcificación para médula ósea es de 4 a 7 días. Con el tiempo ésta solución puede enturbiarse. Para aclararla se neutraliza la acidez de la solución hasta pH 7 con 2,5 gr de hidróxido de sodio por cada 100 ml. Es el decalcificador que mejor preserva las estructuras de los tejidos para las coloraciones y la inmunohistoquímica.

• EDTA-CLORHÍDRICO

Sal disódica de EDTA	0,7 gr
Tartrato de sodio y potasio.....	0,08 gr
Tartrato de sodio.....	0,14 gr
Acido clorhídrico.....	99,2 ml
Agua destilada.....	900 ml

Tiempo de decalcificación: de 24 a 48 hs para médula ósea.

- **ÁCIDO FÓRMICO-CLORHÍDRICO**

ÁCIDO FÓRMICO

Agua destilada 400 ml

Ácido fórmico 100 ml

ÁCIDO CLORHÍDRICO

Agua destilada 420 ml

Ácido clorhídrico 80 ml

Solución de uso:

Mezclar ambas soluciones. Cambiar diariamente y controlar.

Una vez decalcificada la muestra, lavar durante 1 hora en agua corriente, deshidratar, aclarar e incluir en parafina.

Tiempo de decalcificación para médula ósea: de 24 a 48 hs.

- **JENKINS**

Ácido clorhídrico concentrado 40 ml

Ácido acético glacial 40 ml

Cloroformo 100 ml

Agua destilada 100 ml

Alcohol absoluto 730 ml

Este decalcificador es de uso frecuente en huesos duros y semiduros. El control y renovación del agente decalcificador debe hacerse diariamente. No precisa lavado post-decalcificación.

- **ÁCIDO NÍTRICO**

Ácido nítrico P.A. al 5% - 6% en agua destilada

Decalcificar entre 1 a 2 días. Renovar el líquido decalcificante. El tiempo para la decalcificación depende del tamaño de la pieza. Cuando la aguja penetre fácilmente o cuando la muestra tenga la consistencia de "goma de borrar", neutralizar con sulfato de sodio al 5% 1 a 2 horas y lavar en agua corriente durante 24 horas. Deshidratar, aclarar e incluir en parafina.

PRUEBA QUÍMICA PARA CONTROLAR LA DECALCIFICACIÓN

MÉTODO DEL OXALATO CÁLCICO

Se toman 5 ml de la solución decalcificadora y agitando se añade amoníaco concentrado gota a gota, hasta que la solución se torne neutra (control con tiras de papel tornasol o cualquier otro instrumento medidor de pH). Luego se añaden 5 ml de solución saturada de oxalato de amonio y se agita bien. Se deja reposar durante 30 minutos.

Resultados: Si se forma precipitado de hidróxido cálcico luego de la adición del amoníaco, la cantidad de calcio presente en el fluido decalcificante es tan alta, que la decalcificación completa de la muestra es improbable. Si la precipitación ocurre tras añadir el oxalato, la decalcificación, aunque mayor, es incompleta. Si la solución final permanece clara, se considera que el proceso se ha completado.

BIBLIOGRAFÍA

- Raimundo García del Moral: Laboratorio de Anatomía Patológica. Primera Edición.
- Ht. Ema Ester González-Dr. Miguel Gustincic: Resumen para la "Carrera de Médico Especialista en Patología" 2003 -HIGA EVITA – LA-NÚS -Servicio de Anatomía Patológica - laurencena@hotmail.com
- Mac Manus J.F.A. y Mouri R.: Tratado de técnica histológica
- Cejas H.R.: Manual de técnicas histológicas
- Jhon D. Bancroft, Alan Stevens, David R. Turner: Técnica histológica
- Martoja: Técnica histológica

Referencias

- Ht. Cristina T. Chaves / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar

FORMAS Y TÉCNICAS DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

ORIENTACIÓN DE MUESTRAS

Ht. Patricia Alejandra Aragón

INTRODUCCIÓN

La calidad de los cortes de tejido depende de cada paso del procesamiento, y la calidad de cada paso depende del paso anterior.

Una deshidratación deficiente que no permite la salida total del agua del tejido, hace que luego de la inclusión, el taco muestre un área blanca y blanda que impide que se realicen buenos cortes.

Hasta con adecuada fijación, procesamiento perfecto y un técnico experto, un corte de tejido puede ser destruido por un defectuoso embebido, inclusión y orientación de la pieza.

Cuando en un preparado histológico aparece el EFECTO TIERRA SECA debemos hacernos las siguientes preguntas:

- ¿El tejido ha sido mal procesado?
- ¿El agua donde se estiró el corte estaba muy caliente?
- y si el tejido proviene de una congelación ¿Fue colocado inmediatamente en formol, sin descongelarlo lentamente?

INCLUSIÓN EN PARAFINA

La mayor parte de las muestras para estudio histopatológico requieren de un medio sólido de inclusión.

Este confiere a los tejidos una dureza que impide su fragmentación durante el corte, mantiene la estructura y las relaciones arquitecturales entre los distintos elementos y asegura la obtención de cortes muy finos, regulares y homogéneos.

La parafina es una sustancia de tipo céreo, compuesta por mezcla de hidrocarburos saturados de cadena larga, que puede obtenerse con una amplia variación en su punto de fusión. Las de uso habitual poseen una temperatura de fusión entre 54° - 58°C.

La dureza de la parafina está en función de la plasticidad más que del punto de fusión. El punto de plasticidad está unos pocos grados por debajo del punto de fusión y se define como "la temperatura más baja a la que puede ocurrir una deformación permanente sin fractura".

Las parafinas clásicas tienen el inconveniente de oxidarse con el paso del tiempo, adoptando una tonalidad amarillenta y consistencia más blanda.

Las de uso habitual son una mezcla de parafinas con polímeros plásticos de peso molecular controlado y otros aditivos que mejoran sus características como agente de inclusión.

Estas mejoras permiten obtener:

- Cortes más uniformes
- Aumento de la dureza y homogeneidad del taco o bloque
- Tiras de cortes continuas, con mayor facilidad
- Menor fragilidad de los bloques

Los vasos con parafina deben usarse de 4° a 6° C por arriba del punto de fusión y deben ser renovados con frecuencia (una vez cada 5 ó 10 días hábiles) porque se cargan de solventes cuya presencia provoca un descenso en el punto de fusión de la parafina, volviéndola más blanda y menos apropiada.

La temperatura en las parafinas, tanto para el embebido como para la inclusión, debe ser estrictamente controlada ya que, artefactos de encogimiento celular que podrían atribuirse a un defecto de la fijación en formol, realmente pueden corresponder a temperaturas excesivas.

PROCEDIMIENTO DE INCLUSIÓN

Hay diversas formas de confeccionar un taco o bloque.

Antiguamente se utilizaban cajas de papel, barras de Leuckhart, moldes llamados "ravioleras", cubeteras, moldes para tarteletas y todo lo que pudiera adaptarse para este fin.

Como complemento de estos elementos de inclusión era necesario contar con:

- un jarro metálico con parafina, el que era llevado a la temperatura ideal sobre mechero, en el momento de confeccionar los tacos.
- una tela de amianto sobre el trípode para que la llama del mechero se difundiera en forma pareja por el fondo del jarro y luego servía para calentar el agua en una cápsula de Petri de borosilicato en el momento de estirar los cortes.
- una espátula de 16 cm. aproximadamente, para derretir la parafina cuando comenzaba a solidificarse y no se había terminado la inclusión y para pegar los tacos sobre las maderitas.
- era **imprescindible** contar con una lupa para la orientación de biopsias pequeñas.

Actualmente, si bien en algunos lugares se siguen utilizando estos métodos antiguos, los laboratorios que cuentan con una tecnología más actualizada utilizan, con el consecuente ahorro de tiempo, dispensadores de parafina líquida o centros de inclusión.

Los centros de inclusión constan de un dispensador de parafina líquida (que la mantiene a 65°C, aproximadamente), una bacha caliente para mantener líquida la parafina que impregna las muestras a incluir, una placa caliente para la orientación del tejido y una placa fría para la solidificación del taco.

Para confeccionar tacos individuales con esta tecnología, se utilizan moldes que suelen ser de base metálica o plástica (descartables), de fondo de tamaño variable, que se encastran perfectamente al cassette, el cual está rotulado con el número correspondiente, lo que evita la pérdida o confusión de papelitos numerados.

Los técnicos histológicos están obligados a observar todos y cada uno de los fragmentos de tejido, analizar las estructuras y decidir la posición del tejido en el taco de parafina.

Un trabajo delicado, con conocimiento de la mayoría de las estructuras de los tejidos y la anatomía, es un requerimiento fundamental para un técnico y es imprescindible una comunicación fluida y constante con el patólogo.

Distintos autores aconsejan sobre la utilidad de disponer, durante la inclusión, del libro de entradas o del listado diario de estudios, en el caso de disponer de un sistema informatizado de ingresos, para tener la información sobre qué tipo de tejido se está incluyendo, pero ambos carecen de los datos obtenidos durante el estudio macroscópico, tales como: letras adicionales al número, cantidad de fragmentos colocados en cada cápsula, si contamos con material de reserva, si la muestra es muy pequeña, etcétera.

Nuestros residentes confeccionan, durante el estudio macroscópico de las muestras, un listado que incluye:

- Número de ingreso
- Letra identificatoria de órgano o servicio de procedencia (antepuesto al número de estudio en el cassette o papel que acompaña al tejido)

1. **D** para las pieles de dermatología
2. **E** para las biopsia endoscópicas de estómago
3. **T** para las muestras de traumatología
4. **MO** para médula ósea
5. **H** para las biopsias de hígado
6. **O** para las biopsias de oftalmología
7. **AU** para las autopsias
8. **M** para la biopsias de músculo
9. **R** para los materiales renales
10. **I** para tejidos de investigación
11. **N** para identificar las muestras de nervios
12. etcétera

A algunas de estas muestras se les realizan, rutinariamente, técnicas histoquímicas y esta identificación tiene por objeto que los cortes se realicen todos a un mismo tiempo, para evitar el desgaste excesivo del material.

- Letra correspondiente según la cantidad de frascos (por ej.: biopsia de próstata x 4, los cassettes o papelitos se numerarán 213.456 A, B, C y D.)

Y también figura en la lista:

- Cantidad de fragmentos que se incluyen
- Resaltado con color ó letra mayúscula si hubiere algún caso que se requiere con urgencia
- Resaltado al lado del número de estudio si la muestra es muy pequeña
- Si el estudio tiene solicitadas técnicas inmunohistoquímicas, para que al hacer los cortes, se realicen los preparados necesarios en portaobjetos con adhesivo
- Y cualquier otro dato que necesite comunicarse, referente a los materiales que van a incluirse ese día.

Este listado está disponible en el cuarto donde se efectúa la inclusión y funciona como doble control:

1. por un lado se tilda en ellos controlando que coincidan los números, letras, cantidad de fragmentos y de cápsulas.
2. por otro lado se consignan todas las diferencias encontradas, por ejemplo:

- suelen figurar en la lista biopsias que no han sido procesadas
- a veces no coincide la cantidad fragmentos
- otras veces encontramos que en un estudio con varias muestras falta alguna cápsula identificada con alguna de las letras

Estas diferencias se solucionan consultando al médico que hizo la macroscopía y así podremos saber si se está decalcificando, si quedó a la espera por falta de lugar en la procesadora o si fue incluida en el listado por error, ya que le faltaba fijación.

También disponemos de las fichas de ingreso donde está descrito el examen macroscópico, en las que podemos consultar que médico realizó la macroscopía y si queda material de reserva.

CONSIDERACIONES GENERALES

La muestra se coloca en la posición adecuada al tipo de corte que se desea realizar, teniendo en cuenta que la cara inferior del bloque será la superficie de corte.

Los fragmentos de tejido deben ser incluidos perfectamente planos para asegurar que vamos a obtener un corte completo.

Se debe tener mucho cuidado de prevenir artefactos causados por el manejo brusco de las muestras.

Suele ocurrir que una muestra obtenida mediante el uso de un electro cauterio, presente una intensa basofilia que es característica en los materiales que estuvieron expuestos a temperaturas excesivas (injurias térmicas).

Otro problema que puede presentar un tejido, si el tratamiento ha sido agresivo durante el procesamiento y el aire no ha desaparecido completamente en la inclusión, en materiales como pulmón o bazo, es el artefacto de agujeros, que no desaparece, aún, con el desgaste total del material, descartando así un defecto de orientación y de corte.

Cuando un tejido requiera ser orientado de una manera especial deberemos utilizar un sistema de “marcado” para la identificación del mismo, es decir, pueden marcarse con tinta china las caras o márgenes de un fragmento de tejido, o realizar una incisión que indique la orientación apropiada.

También puede ser colocado en el cassette un rótulo de papel o pueden dejarse instrucciones escritas sobre una cara del mismo.

Asimismo la pieza deberá orientarse del tal modo que la parte más blanda del tejido se corte primero y la más dura o firme al final del proceso.

Esto previene que el tejido más duro comprima al tejido más blando y produce secciones más parejas y uniformes.

Es recomendable dejar aproximadamente 2 mm, como mínimo, de parafina alrededor del tejido, como margen para soporte de corte.

ESTRUCTURAS TUBULARES

Las estructuras tubulares como los conductos deferentes, venas, arterias o trompas de Falopio pueden ser incluidas de modo tal que la navaja corte a través de la luz o puede realizarse un corte perpendicular al eje largo del tubo, según se requiera.

SUPERFICIES EPITELIALES

Los tejidos y superficies epiteliales como piel, intestino, vesícula biliar, vejiga urinaria, cuello uterino, etcétera, deben posicionarse de modo que la superficie plana del corte sea a través de todas las capas del tejido.

Cuando la muestra esté compuesta por dos fragmentos, éstos serán incluidos uno al lado del otro, con la cara epitelial en la misma dirección.

MUESTRAS GRANDES Y COMPACTAS

Las muestras grandes de útero, próstata, tiroides, hueso, etcétera, serán incluidas con un leve ángulo con respecto a la navaja y orientadas para el corte de forma perpendicular a la misma.

La navaja inicia el corte con menos resistencia, reduciendo el riesgo de desgarramiento del tejido al ser sacado del taco.

La vibración del filo de la navaja en el corte estará notablemente disminuida.

En el caso de una muestra de cuello uterino que incluya canal endocervical, el taco debe orientarse de tal modo que la navaja inicie el corte por la zona del canal.

MUESTRAS PEQUEÑAS

Puede ser difícil identificar un fragmento de tejido de color claro, una vez realizado el taco ya que, fría la parafina, adquieren la misma tonalidad.

Para subsanar este inconveniente, en el caso de biopsias endoscópicas del tracto respiratorio o digestivo, punciones biopsias prostáticas, pleurales o mamarias, pequeñas biopsias de cuello uterino, muestras oftalmológicas y otras, debemos tomar la precaución de teñirlas con 1 ó 2 gotas de eosina acuosa al 1% durante el estudio macroscópico para colorear el tejido y hacerlo visible.

La eosina es lavada de los cortes de tejido durante la fase de hidratación y no interfiere en las coloraciones subsiguientes.

De todos modos, al momento de la inclusión, debemos tener disponible una lupa, sobre todo para asegurar la buena orientación de la muestra.

MUESTRAS MÚLTIPLES

Múltiples muestras de tejidos blandos y ganglios son incluidos uno al lado del otro, con un pequeño espacio entre ellos.

Los fragmentos de tejido obtenidos por punción con aguja tipo trucut pueden orientarse con su eje largo paralelo o perpendicular al filo de la navaja, pero todos deben estar orientados en el mismo sentido.

La confección ordenada de los preparados facilita mucho la lectura e interpretación, al contrario que con la inclusión azarosa de los fragmentos.

ESTRUCTURAS QUÍSTICAS

Los pequeños quistes hemiseccionados tienen un aspecto de cúpula y deben ser incluidos con la cara de corte para abajo, para obtener una sección completa de todas las capas de la pared quística.

SUPERFICIES TEÑIDAS (TINTA CHINA) Y MÁRGENES

Los tejidos que tienen sus márgenes identificados con tinta china deben incluirse ubicados de modo que la tinta sea visible en el corte.

Se pueden incluir múltiples fragmentos con el revestimiento de tinta para el mismo lado en el taco, para hacer el preparado más organizado y facilitar el estudio.

Si una superficie ha sido marcada con tinta china, la superficie teñida será incluida hacia arriba, opuesta a la superficie que cortará la cuchilla.

CONCLUSIÓN

Esta guía es solamente una reseña que contiene los puntos más distintivos de un tema tan extenso.

La gran diversidad de tipos de tejido, formas y dimensiones demandan constante atención y decisión del técnico experimentado.

BIBLIOGRAFÍA

- Laboratory Methods in Histotechnology, Armed Forces Institute of Pathology, Edited by: Edna B. Prophet, Bob Mills, Jacquelyn B. Arrington and Leslie H. Sobin, M.D. Published by the American Registry of Pathology Washington, D.C.
- Laboratorio de Anatomía Patológica, Raimundo García del Moral Publicado por: Interamericana de España - Mc Graw - Hill

Referencias

- H.t. Patricia Alejandra Aragón / Hospital de Clínicas "José de San Martín" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patoaragon@yahoo.com.ar

FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS (TÉCNICAS ANILÍNICAS, IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS E HISTOQUÍMICA) PARTE I

Prof. Dr. Hernán Javier Aldana Marcos

INTRODUCCIÓN

La observación de estructuras biológicas en el microscopio presenta dos inconvenientes: se trata de estructuras muy pequeñas y transparentes. Es por ello que debemos realizar diversos procedimientos técnicos para poder observar detalles morfológicos. Las técnicas varían según cual sea el objetivo de nuestra observación.

Podemos observar:

1. Células aisladas (preparaciones citológicas):

- Citología exfoliativa (Ej. Papanicolaou)
- Líquidos (Ej. recolección de fluidos de la cavidad peritoneal, ascitis)
- Biopsias aspirativas

2. Cortes de tejidos y células:

Microscopía óptica (MO):

- Tejidos incluidos en parafina
- Tejidos incluidos en plástico o resina
- Tejidos congelados

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

- Tejidos incluidos en resinas
- Tejidos congelados

3. Superficies celulares:

Microscopía electrónica de barrido

Crio fractura

Antes de conocer las técnicas histológicas es útil preguntarse: ¿Qué biomoléculas podemos detectar dentro de una célula o en la matriz extracelular?:

Hidratos de carbono presentes en el glucógeno, en las secreciones mucosas, asociados a lípidos (glicolípidos), asociados a proteínas (glicoproteínas o proteoglicanos), en los glicosaminoglicanos, en los ácidos nucleicos, etc.

Proteínas presentes en las enzimas, en las membranas celulares (canales, receptores, proteínas estructurales), en las secreciones serosas y mucosas, en el citoesqueleto (actina, miosina, tubulina), en hormonas, en neurotransmisores, en las fibras del conectivo (colágenas, elásticas), etc.

Lípidos presentes en las membranas plasmáticas, en las inclusiones celulares, en secreciones apócrinas, asociados a hidratos de carbono (glicolípidos), asociados a proteínas (lipoproteínas).

Ácidos nucleicos como el ADN y el ARN (mensajero, ribosomal, de transferencia).

Iones provenientes de átomos como calcio, fósforo, hierro.

Todos estos compuestos y las miles de variantes de cada uno pueden detectarse en los cortes histológicos. Para cada necesidad existe una técnica específica. Veremos a continuación algunas de ellas.

- Detección de hidratos de carbono.
- Detección de ácidos nucleicos.
- Detección de proteínas.
- Detección de lípidos.
- Detección de iones.

CLASIFICACION DE LOS COLORANTES

SEGÚN SU ORIGEN

- **NATURALES:** como la hematoxilina, el carmín y la orceína.
- **SINTÉTICOS O ARTIFICIALES:** como el azul de metileno, la safranina, azul de anilina, el naranja G, etcétera.

SEGÚN SUS PROPIEDADES QUÍMICAS

La mayoría de los colorantes empleados en histología actúan como ácidos o bases y tienden a formar uniones salinas con radicales ionizables presentes en los tejidos.

Colorantes ácidos: como por ejemplo la eosina, colorante cargado en forma negativa, se une a componentes celulares cargados positivamente. Estos componentes cargados positivamente se denominan acidófilos, porque tienen afinidad por los colorantes ácidos. Por ejemplo, estos colorantes se unen a grupos **aminos** de las proteínas. Estas proteínas pueden pertenecer al citoesqueleto de la célula o hallarse en la matriz extracelular. Debido al elevado contenido de proteínas del citoplasma la eosina es un excelente colorante citoplasmático. La eosina se une también a las membranas plasmáticas, sin embargo, se desconoce la naturaleza química de esta unión. Las células que presentan un gran desarrollo de membranas (muchas mitocondrias, mucho retículo endoplasmático liso, etc.) son sumamente acidófilas, o sea, se tiñen intensamente con la eosina.

Colorantes básicos: como por ejemplo el azul de metileno, colorante cargado positivamente, se une a componentes celulares cargados negativamente. Estos componentes cargados negativamente se denominan basófilos, porque tienen afinidad por los colorantes básicos. Por ejemplo, estos colorantes se unen al núcleo y ciertas regiones del citoplasma.

Como caso particular, la hematoxilina no tiene carga, para teñir un tejido se la une a un mordiente que junto a la hematoxilina forman una laca. La laca es básica y por lo tanto se une a cargas negativas de la célula o matriz extracelular.

Colorantes neutros: son colorantes en los que la porción ácida y la básica colorean. Tiñen las partes básicas de una célula de un color y las partes ácidas de otro. Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro. Ej. el eosinato de azul de metileno.

Colorantes indiferentes: tiñen aquellas estructuras o sustancias que los disuelven más fácilmente que el líquido en que están preparados. Un ejemplo es el colorante sudan, un colorante de lípidos.

HIDRATOS DE CARBONO O CARBOHIDRATOS

Los carbohidratos complejos como los polisacáridos y oligosacáridos pueden detectarse mediante las llamadas técnicas histoquímicas. Algunos son **inmunogénicos** debido a su gran tamaño o por su unión covalente a otros componentes formando glicoconjugados (proteoglicanos, glicoproteínas, glicolípidos).

TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA LA DETECCIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO

Técnica de PAS: la reacción de PAS (Acido Peryódico - reactivo de Schiff) es una de las más utilizadas para detectar polisacáridos presentes en el glucógeno, en las secreciones mucosas, en las membranas basales, etc. Los cortes se tratan primero con el ácido peryódico que reacciona con los azúcares formando aldehídos. Luego se coloca el reactivo de Schiff que se une a los aldehídos formando un pigmento magenta insoluble.

Técnica de Azul Alcian: El azul alcian tiñe de azul hidratos de carbono asociados a grupos sulfato o carboxilos. Se utiliza para detectar glicosaminoglicanos, glicoproteínas sulfatados o carboxilados. Estos compuestos son muy comunes en algunas secreciones glandulares y en la matriz extracelular.

La **FIGURA 1** de la página 31 contiene tres imágenes del epitelio cilíndrico del intestino delgado obtenidas con MO a 1000x. La flecha negra señala la región ocupada con los gránulos de secreción ubicada en el polo apical de una célula glandular caliciforme.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos como el ADN y el ARN, pueden ser localizados mediante numerosos métodos. El ADN se localiza en el núcleo y su cantidad varía poco entre las células. El ARN se localiza en el núcleo y en el citoplasma, su cantidad varía ampliamente dependiendo el estado funcional de la célula.

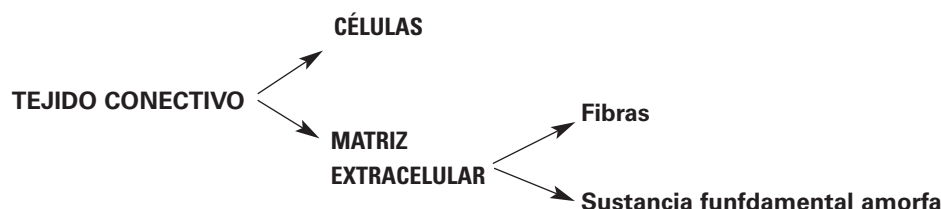
Reacción de Feulgen: utiliza ácido clorhídrico que hidroliza parcialmente el ADN formando aldehídos. Estos reaccionan con el reactivo de Schiff formando un precipitado magenta insoluble.

Colorantes fluorescentes: colorantes como el yoduro de propidio, la bisbencimida, se unen al ADN y dan una fluorescencia proporcional a la cantidad de ADN presente. El naranja de acridina fluoresce amarillo verdoso cuando se une al ADN y rojo anaranjado cuando se une al ARN.

Colorantes básicos: los colorantes básicos como la hematoxilina, el azul de toluidina, el violeta de cresilo se unen a los grupos fosfatos presentes en el ADN y ARN. (Ver **FIGURA 2** - página 31)

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TEJIDOS CONECTIVOS

El tejido conectivo se caracteriza morfológicamente por presentar diversos tipos de **células** separadas por una **abundante matriz extracelular** (intercelular), sintetizada por ellas. Esta matriz está representada por una parte con estructura microscópica definida, las **fibras del conectivo**, y por la **sustancia fundamental amorfa**, llamada así porque no presenta una estructura visible al microscopio óptico; no obstante su estructura molecular ya es conocida. Una pequeña cantidad de líquido, el plasma intersticial, baña las células, las fibras y la sustancia extracelular amorfa.



SUSTANCIA FUNDAMENTAL AMORFA

La sustancia fundamental amorfa está muy hidratada y consiste principalmente en **proteoglicanos** y glicoproteínas estructurales. Es incolora, transparente y ópticamente homogénea. Rellena los espacios entre las células y las fibras del conectivo y, al ser viscosa, constituye una barrera para la penetración de partículas extrañas al interior del tejido. Los fijadores histológicos la conservan muy mal y por lo tanto no puede observarse al MO, incluso es difícil de conservar con los fijadores de MET.

La sustancia fundamental amorfa está formada principalmente por complejos de **glicosaminoglicanos** (azúcares complejos) unidos con proteínas formando **proteoglicanos**. Estos a su vez se relacionan con glicoproteínas. Estas contienen una parte proteica que se asocia a hidratos de carbono. Si las glicoproteínas y los proteoglicanos son proteínas asociadas con hidratos de carbono, ¿en qué difieren?

En los proteoglicanos hay un predominio de la parte proteica y los hidratos de carbono no son ramificados. En la **FIGURA 3** (página 31), se observa que la sustancia fundamental amorfa, si se fija en forma rutinaria, aparece como espacios claros tanto al MO y como con el MET.

El tejido conectivo o conjuntivo posee tres componentes fundamentales

- células
- fibras
- sustancia intercelular o fundamental amorfa (matriz extracelular)

CÉLULAS DEL TEJIDO CONECTIVO

Son las células residentes e inmigrantes del tejido conectivo. (Ver **FIGURA 4** página 31)

COMPONENTES CELULARES

CÉLULAS FIJAS

- fibroblastos-fibroцитos
- células reticulares
- adipocitos
- pericitos

CÉLULAS INMIGRANTES

- macrófagos
- mastocitos
- plasmocitos
- otras células derivadas de la sangre

FIBRAS DEL TEJIDO CONECTIVO

Componentes fibrosos	Fibras colágenas Fibras reticulares Fibras elásticas
----------------------	--

FIBRAS COLÁGENAS

Son las proteínas más abundantes del cuerpo. Existen muchos tipos (más de quince), algunos de ellos forman fibras. El tipo de colágeno más común se denomina colágeno tipo I. (Ver **FIGURA 5** página 31)

FIBRAS COLÁGENAS TIPO I AL MO

Las fibras colágenas tipo I forman haces de fibras de 0,5 a 20 µm de diámetro. Son acidófilas por lo tanto se colorean de rosado con la eosina y de azul en el tricrómico de Masson con el azul de anilina, ambos colorantes son ácidos.

¿En qué consisten estas fibras?

Cada fibra esta formada por miles de fibrillas colágenas. (Ver **FIGURA 6** página 31)

¿Qué son las fibrillas?

Cada fibrilla de colágeno esta formada por una superposición de moléculas de colágeno llamadas tropocolágeno. Cada molécula de tropocolágeno mide 280 a 300 nm de longitud y 1,5 nm de diámetro y está formada por tres cadenas peptídicas arrolladas en hélice, denominadas cadenas alfa. Los aminoácidos más comunes de las cadenas alfa son la glicina, la prolina y la hidroxiprolina. Además durante su formación en el fibroblasto se le agregan algunos hidratos de carbono. Por lo tanto, la molécula de colágeno es una glicoproteína.

Al ME las fibras colágenas presentan estriaciones transversales oscuras y claras, dando al colágeno su típica estriación transversa de 67 nm de periodicidad.

A medida que se agrega el tropocolágeno para formar las fibrillas, cada molécula cabalga una sobre otra dejando un espacio entre el grupo amino y el carboxilo terminal. Estos huecos que dejan las moléculas entre sí, son ocupados por los colorantes de ME, dando una banda oscura. Las bandas claras ocurren en lugares donde no precipita el colorante.

Hay diversos tipos de cadenas alfa, cada una de ellas codificada por un gen, lo que da origen a diversas clases de colágeno (recorde-mos que hasta ahora se describieron más de 15 tipos de colágeno).

FIBRAS ELÁSTICAS

Las fibras elásticas (diámetro 0,1 a 10 μm) son más delgadas que las colágenas, además carecen de estriaciones. Se tiñen mal con la H-E o con el tricrómico de Masson, para detectarlas se utilizan técnicas específicas como el empleo de la orceína nítrica. Se ramifican y se unen unas a otras formando una red de mallas muy irregulares. (Ver **FIGURA 7** página 31)

Estas fibras son sintetizadas por células diversas: fibroblastos, condrocitos y fibras musculares lisas, etcétera.

El componente principal de las fibras elásticas es una proteína amorfa llamada elastina, rodeada de microfilamentos de una glicoproteína llamada fibrilina.

La elastina posee una estructura enrollada aleatoriamente en estado relajado que se puede estirar, pero que vuelve a adoptar la disposición enrollada aleatoria cuando se relaja. Las diferentes moléculas de elastina se unen por enlaces covalentes, estirándose o relajándose en conjunto; además se pueden organizar formando fibras o láminas. (Ver **FIGURA 8** página 32)

Función: como su nombre lo indica confieren elasticidad a los tejidos y permiten que se recuperen después del estiramiento.

CELULAS RETICULARES

Estas células son similares a los fibroblastos en cuanto a su elevada síntesis de colágeno. Sin embargo, sintetizan colágeno del tipo III, denominado fibras reticulares. Se las localiza en los órganos linfopoyéticos donde forman el entramado reticular que sostiene y organiza a dichos órganos (médula ósea, ganglio linfático, timo y bazo).

Aunque para algunos autores las células reticulares son fibroblastos, poseen características que las diferencian. Por ejemplo, algunas presentan una elevada fagocitosis de material antigénico y de detritos celulares. Otras, denominadas células presentadoras de antígenos, exponen antígenos en la superficie celular y se los presentan a otras células inmunocompetentes.

FIBRAS RETICULARES

Las fibras reticulares están constituidas fundamentalmente por colágeno de tipo III, se diferencian de las de tipo I en sus cadenas alfa. Son más delgadas 0,1 a 1,5 μm , más glicosiladas (poseen más hidratos de carbono). No se colorean en los cortes de H-E. Se tiñen al MO con técnicas argénticas (técnicas que utilizan la precipitación de sales de plata sobre estructuras tisulares específicas) en donde aparecen en color negro, mientras que las colágenas se tiñen de marrón. A diferencia de las colágenas, las reticulares forman delicadas redes en vez de haces. (Ver **FIGURA 9** página 32)

¿Las fibras reticulares son PAS positivas?

Sí, debido a su alto contenido de glúcidos, lo que determina también su elevada asociación a sales de plata.

Las fibras reticulares son sintetizadas por los fibroblastos, por las células reticulares, por células musculares, etc. Forman el armazón de los órganos hemocitopoyéticos (bazo, timo, ganglio linfático, médula ósea). Además forman redes que rodean a las fibras musculares, a las células hepáticas, a las renales y a las de las glándulas endocrinas. Tienen una fundamental importancia en la formación de la lámina reticular de la membrana basal.

DISPOSICIÓN DEL TEJIDO CONECTIVO EN FIBRA MUSCULAR

EPIMISIO: tejido conectivo que rodea a todo un músculo.

PERIMISIO: son ramificaciones del EPIMISIO que penetran dentro del músculo y rodean a fascículos musculares.

ENDOMISIO: son ramificaciones del PERIMISIO que rodean a cada fibra muscular. Esta capa incluye también a la membrana basal.

ESQUEMA DE LAS ENVOLTURAS DE UN MUSCULO

El endomisio contiene fibras colágenas que llegan desde el perimisio pero además dentro de esta capa encontramos la membrana basal de la fibra muscular. Esta membrana contiene todos los componentes de una típica membrana basal. (Ver **FIGURAS 10 y 11** página 32)

Además forman redes que rodean a las fibras musculares, a las células hepáticas, a las renales y a las de las glándulas endocrinas.

FUNCIONES

Las funciones del tejido conectivo, se deben fundamentalmente a sus propiedades mecánicas, entre ellas:

- SOSTEN Y RELLENO ESTRUCTURAL
- COMPARTIMENTALIZACION.
- PROTECCION FISICA E INMUNOLOGICA
- MEDIO DE INTERCAMBIO DE DETRITOS METABOLICOS, NUTRIENTES Y OXIGENO
- ALMACENAMIENTO DE GRASA, AGUA, SODIO Y OTROS ELECTROLITOS
- REPARACION

TIPOS DE TEJIDOS CONECTIVOS

- Tejido conectivo laxo y denso (tejidos conectivos propiamente dichos)
- Tejido conectivo reticular
- Tejido conectivo elástico
- Tejido conectivo mucoso

Existen también tejidos conectivos con propiedades especiales o tejidos conectivos especializados:

- Tejido adiposo
- Tejido cartilaginoso
- Tejido óseo

El tejido sanguíneo (sangre) es considerado para muchos autores como un tejido conectivo especializado.

ORIGEN EMBRIOLOGICO

La mayor parte del tejido conectivo se origina del mesodermo, capa germinal media del tejido embrionario. A partir de esta capa se desarrolla el mesénquima, compuesto por células mesenquimáticas embrionarias.

TECNICAS UTILIZADAS PARA DETECTAR LIPIDOS ¹

Los lípidos son un grupo heterogéneo de sustancias que presentan la característica común de ser solubles en solventes orgánicos (Sheenan y Hrapchak, 1980). Sin embargo, algunos lípidos como el colesterol libre son cristalinos y algunos fosfolípidos son solubles en agua (Bancroft y Stevens, 1990).

La mejor técnica para determinar la presencia de lípidos totales es mediante cortes de tejido fresco con crióstato sin previa fijación. Sin embargo, se realiza una fijación para mantener las características citoarquitectónicas de los tejidos (Bancroft y Stevens, 1990). Existen un gran número de lípidos insolubles que permanecen en los tejidos incluidos en parafina debido a su íntima relación con proteínas o hidratos de carbono. Por lo tanto algunas técnicas pueden ser útiles en cortes de parafina.

Según Sheenan y Hrapchak (1980) los mejores fijadores de lípidos son el formol neutro y el formol calcio de Baker. El fijador Bouin puede utilizarse pero presenta inconvenientes como el de impedir una correcta congelación de la muestra haciendo difícil la producción de cortes en el crióstato. Nosotros utilizamos los tres fijadores y no tuvimos problemas con ninguno de ellos en la obtención de cortes. (Ver **FIGURA 12** página 32)

SECCIONES CONTROL

Los lípidos pueden ser totalmente removidos si se tratan las secciones con una mezcla de cloroformo-metanol con la adición de ácido clorhídrico para liberar lípidos unidos. La adición de agua facilita a su vez la extracción de fosfolípidos (Bancroft y Stevens, 1990). Secciones en las que se han extraído los lípidos deben incluirse en paralelo con las secciones normales. De esta forma aseguramos que la reacción en consideración pueda atribuirse a la presencia de lípidos (Bancroft y Stevens, 1990).

1. Extracto de Tesis Doctoral. Aldana Marcos, H. J. (1996). *Experimental study of two peculiar structures of the armadillo Chaetophractus villosus: the Onuf's nucleus and the Harderian gland*. Doctoral Thesis. University of Buenos Aires. Buenos Aires. T2853.

TECNICA DE SUDAN

El colorante negro sudan B ha sido muy utilizado para la detección de lípidos en cortes de congelación. La fórmula más utilizada es negro sudan B a saturación en el solvente etanol al 70%. Sin embargo Pearse (1985) menciona que el sudan es más soluble en propilenglicol que en etanol. La utilización de esta mezcla no produce la tendencia del solvente a la extracción de finas partículas lipídicas, además la intensidad de la tinción es mayor que con las mezclas de etanol. No obstante, un gran número de estructuras que contienen fosfolípidos son también intensamente coloreadas, incluyendo las mitocondrias y pequeñas partículas presumiblemente lisosomas. Según Bancroft y Stevens (1990) el negro sudan revela fosfolípidos y grasas neutras.

TECNICA DEL SULFATO DE AZUL DE NILO-METODO DE CAIN

Según Cain (citado por Pearse, 1985) su método es capaz de distinguir entre lípidos neutros (ésteres e hidrocarburos) y lípidos ácidos (lecitinas). Este colorante está compuesto por dos componentes: una oxazona roja que se disuelve en lípidos neutros y una oxazina azul que es básica y reacciona con fosfolípidos y ácidos grasos libres. Sin embargo, numerosos autores han demostrado que los ácidos grasos libres pueden teñirse con los dos componentes (Pearse, 1985; Bancroft y Stevens, 1990). La técnica original de Cain presenta los siguientes resultados: lípidos hidrofóbicos insaturados de rosa, ácidos grasos libres de rosa a azul, fosfolípidos azul.

Es una técnica útil como indicadora preliminar del tipo de lípidos presentes en las secciones de tejido. La modificación de Dunnigan (Bancroft y Stevens, 1990) introduce la acetona para eliminar los ácidos grasos libres y de esta manera el resultado azul se deberá sólo a la presencia de fosfolípidos.

Detección de lípidos en cortes de parafina:

En general los lípidos son arrastrados por los solventes durante la inclusión en parafina. Sin embargo, no debe descartarse el hecho de que se puedan teñir lípidos insolubles como algunos glicolípidos, fosfolípidos y lípidos insaturados (Spicer, 1992). Los lípidos insaturados son extraídos -según Sheehan y Hrapchak (1980)- si se tratan las secciones con acetona caliente. La bromación previa a la técnica de PAS puede utilizarse para bloquear los grupos etilénicos PAS reactivos de los lípidos insaturados (Cohn, 1955). La reacción de Schiff con ácido per fórmico para la detección de lípidos insaturados (Sheehan y Hrapchak, 1980) es muy útil si a la vez se realiza un control negativo con brominación.

Para detectar la presencia de lípidos insolubles en cortes de parafina son útiles las técnicas de Negro-Sudan B para cortes de parafina (Pearse, 1985), Klüver-Barrera (1953) para detectar fosfolípidos y glicolípidos -como gangliósidos y cerebrósidos- (Pearse, 1985) y la reacción modificada de Bruckner (Pearse, 1985) para detectar glicolípidos.

MÉTODOS

• FORMOL CALCIO

40% formol 10 ml

10% CaCl₂ (anhidro) 10 ml

Agua destilada 80ml

Se aconseja agregar un poco de yeso para mantener el pH neutro.

• GELATINA DE KAISER

1. Gelatina 10 g

2. Agua destilada 60 ml

3. Glicerina 70 ml

4. Fenol 0,25 g

5. Disolver la gelatina en el agua caliente y luego agregar los otros ingredientes.

La gelatina endurece a temperatura ambiente, calentar levemente antes de usar para montar. Guardar a temperatura ambiente.

Uso esta gelatina para montar los cortes hechos con la técnica de sudán rojo clásica. No pierde la calidad, tengo preparados de hace cinco años que los uso en mi materia.

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS

• MEZCLA DE CLOROFORMO-METANOL CON LA ADICIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO

Cloroformo 66 ml

Metanol 33 ml

Agua destilada 4 ml

HCl concentrado 1 ml

Usar a temperatura ambiente durante 1 hora.

• LÍPIDOS EN CORTES DE CRIÓSTATO

A- SUDAN BLACK EN PROPILENGLICOL

Método

1. Fijación en formol, formol calcio o en Bouin.
2. Cortes de crióstato 10 μ m.
3. 0,7 g de sudan en 100 ml de propilenglicol. Ir agregando da poco mientras se revuelve.
Calentar a 100° (no más) por algunos minutos (revolver constantemente). Filtrar. Almacenar en estufa a 60°.
Dura para siempre (excepto que se acabe)
4. Deshidratar los cortes 15' en propilenglicol.
5. 10' con la mezcla sudan propilenglicol.
6. Diferenciar en 85% de propilenglicol (mezcaldo con Agua)
7. Lavar varias veces con agua destilada.
8. Montar con gelatina de Kaiser.

Resultados

Lípidos en negro

B- SULFATO DE AZUL DE NILO PARA LÍPIDOS NEUTROS Y ÁCIDOS

El sulfato de azul de nilo debe ser muy bueno. Preparar una solución de sulfato de azul de nilo al 1%. Tomar unas gotas y echarlas en xilol, a los 20 segundos debe tornarse rojo por la oxasona. Si no ocurre hay que hervir la solución con 5% de ácido sulfúrico durante 1 a 2 horas en un condensador de reflujo.

Método

1. Fijación formol calcio, lavar con agua común.
2. Crióstato 6-8 μ m.
3. Teñir con la solución de azul de nilo a 60°C durante 5 minutos.
4. Lavar en agua destilada a 60°.
5. Lavar 30 segundos en una solución de ácido acético al 1% para remover el colorante de las estructuras no lipídicas.
6. Lavar en agua destilada.
7. Montar en gelatina de Kaiser.

Resultados

Lípidos neutros (triglicéridos, esteres de colesterol, esteroides) en rosa.

Lípidos ácidos (ácidos grasos, fosfolípidos) azul.

Núcleo azul citoplasma azul pálido.

A- LA REACCIÓN DE SCHIFF CON ÁCIDO PERFÓRMICO PARA LA DETECCIÓN DE LÍPIDOS INSATURADOS

1. Hidratar.
2. Noventa minutos en ácido perfórmico (Acido fórmico 98% 40 ml; H₂O₂ 30% 2ml; H₂SO₄ 0,5 ml).
3. Reactivo de Schiff (El mejor es el de Tomasi²) 30'.
4. Lavar en agua caliente 10'.
5. Cubrir con agua y mirar.

Si da positivo colocar nuevos portas en acetona caliente 30' y probar la técnica. Si ahora da negativo confirmar la presencia de lípidos. También debe hacerse la brominación para bloquear los grupos etilénicos PAS reactivos de los lípidos insaturados.

Brominación

1. Xilol
2. Varios cambios en tetracloruro de carbono.
3. Una hora en una mezcla de 39 ml de tetracloruro de carbono y 1 ml de Bromo.
4. Dos cambios en tetracloruro de carbono.
5. Alcohol 70.
6. Agua.
7. Técnica de Pas con ácido perfórmico. Si da negativo confirman la presencia de lípidos insaturados.

B- TÉCNICAS DE NEGRO-SUDAN B PARA CORTES DE PARAFINA (PEARSE, 1985)

Varios fijadores. Cortes de parafina

1. Desparafinar, llevar a alcohol 70%.
2. Treinta minutos en una solución de sudan black en alcohol 70% a temperatura ambiente.
Si no se uso el formol calcio se aconseja dejar 16 horas a 60°C.
3. Lavar rápido en alcohol 70.
4. Lavar en agua destilada.
5. Coloración de núcleos con rojo neutro al 1%.
6. Lavar en agua y montar con gelatina de Kaiser.

Lípidos resistentes en negro, azul o marrón. Recordar que quedan muy pocos lípidos con la parafina.

C- KLÜVER-BARRERA (1953) PARA DETECTAR FOSFOLÍPIDOS Y GLICOLÍPIDOS –COMO GANGLIÓSIDOS Y CEREBRÓSIDOS– (PEARSE, 1985)

Esta técnica también sirve para cortes con crióstato.

Conviene fijar con formol calcio.

1. Llevar a alcohol 100
2. Teñir en 0,1% de luxol fast blue MBS en alcohol 96% durante 6-18 h a 60°C.
3. lavar en alcohol 70
4. Diferenciar en carbonato de litio al 0,05% durante 30'-2 hs. (90' para secciones de crióstato).
5. Lavar en agua destilada
6. Coloración de núcleos con rojo neutro.
7. Lavar en agua deshidratar
8. Aclarar y montar.

Resultados

Lípidos fundamentalmente fosfolípidos en azul, eritrocitos en azul. (Ver **FIGURA 13** página 32)

D- REACCIÓN MODIFICADA DE BRUCKNER PARA DETECTAR GLICOLÍPIDOS

1. Deshidratar los cortes de parafina, dejar secar.
2. Aplicar a las secciones secas 2 a 3 gotas de una mezcla de (1 ml de 2% de orceína acuosa (orcinol acuoso 3,5 dihidroxitolueno) y 10 ml de H₂SO₄ 2N).
3. Colocar en incubadora o plancha caliente a 90° ó 100°.
4. Ver sin montar.

Resultados

Cerebrósidos y gangliósidos rojo a rojo azulado.

DETECCIÓN DE IONES

La mayoría de los iones son difíciles de detectar, debido a su pequeño tamaño y a su gran poder de difusión (se extraen durante la fijación). Sin embargo, algunos iones (ej. el hierro, los fosfatos de calcio) son inmovilizados debido a su asociación con proteínas del tejido. Existen algunas técnicas para detectarlos en los tejidos. No entraremos en detalle sobre estas técnicas, salvo aclarar que son muy útiles para detectar algunas patologías relacionadas con el metabolismo de la hemoglobina o con depósitos de hierro en los tejidos (hemosiderosis). También son útiles para estudiar la calcificación del hueso. (Ver **FIGURA 14** página 32)

BIBLIOGRAFÍA

- BANCROFT J.D. Y STEVENS A., 1992. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. New York.
- COHN S.A., 1954. Histochemical observations on the Harderian Gland of the albino mouse. J. Histochem. Cytochem., 3: 342-353.
- KLÜVER H. Y BARRERA E., 1953. A method for the combined staining of cells and fibres of the nervous system. J. Neuropath. Exp. Neurol., 12: 400-403.
- PEARCE EVERSON A.G., 1985. Histochemistry theoretical and applied. Vol. 2. Churchill Livingstone. New York.
- SHEEHAN D. y HRAPCHAK B.B. 1980. Theory and practice of Histotechnology. Mosby Company. London.
- SPICER S.S. Y SCHULTE B.A., 1992. Diversity of cell glycoconjugates shown histochemically: a perspective. J. Histochem. Cytochem. 40(1): 1-38.

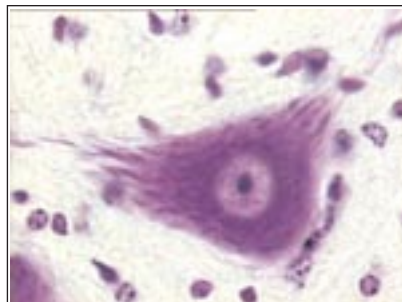
Referencias

- Prof. Dr. Hernán Javier Aldana Marcos / Facultad de Medicina / Universidad de Morón / Buenos Aires / Argentina / haldana@unimoron.edu.ar

FIGURA 1.



FIGURA 2.



Preparado de Sistema nervioso central. En el centro una neurona teñida con violeta de cresilo. En el núcleo se observa el nucléolo y algo de la cromatina teñidos con el cresilo. El citoplasma presenta una elevada cantidad de grumos teñidos de color violeta (grupos de Nissl) que representan un gran desarrollo del retículo endoplasmático rugoso. A los costados de la neurona numerosos núcleos de células gliales se tiñen también con el cresilo.

FIGURA 3.

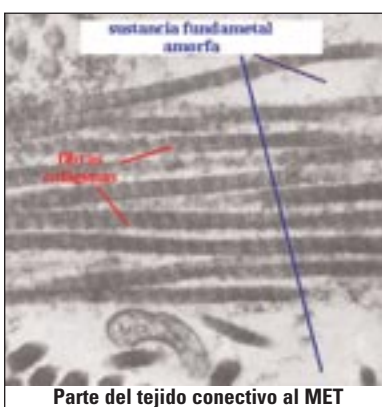
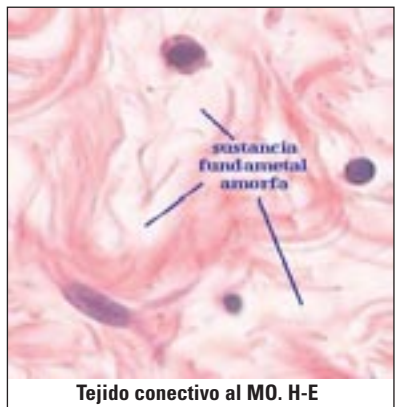


FIGURA 5.

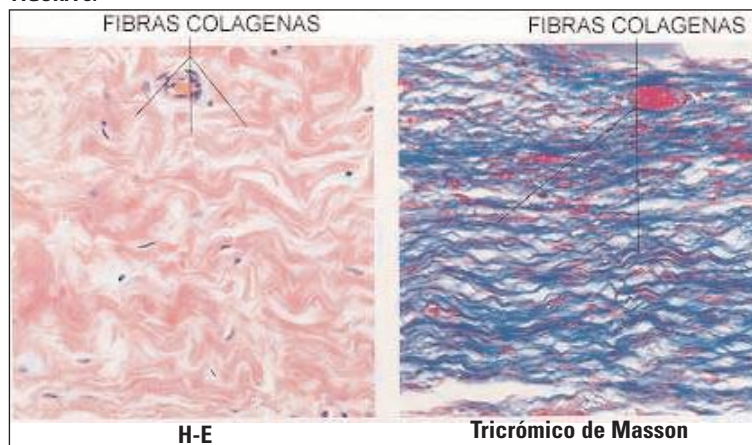


FIGURA 6.

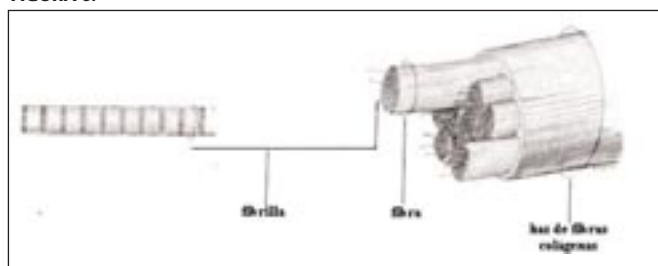
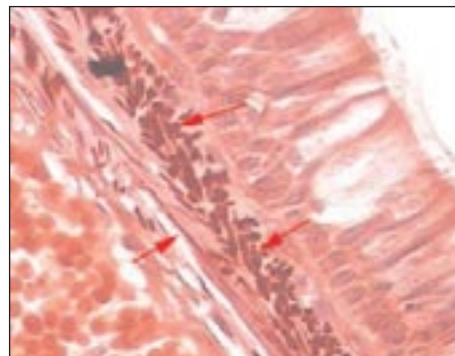


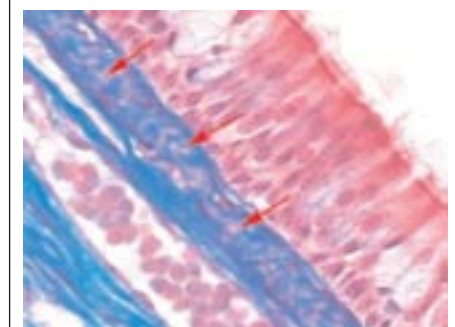
FIGURA 4.



FIGURA 7.



Fibras elásticas teñidas con orceína (flechas).

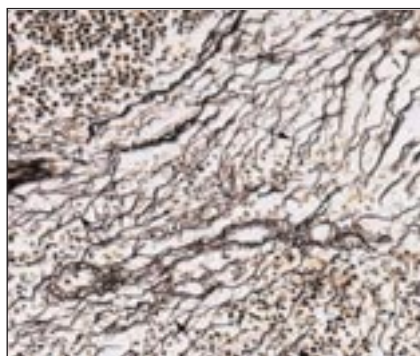


El mismo preparado teñido con tricrómico de Masson, observe que la región ocupada por las fibras elásticas no se colorea (flechas).

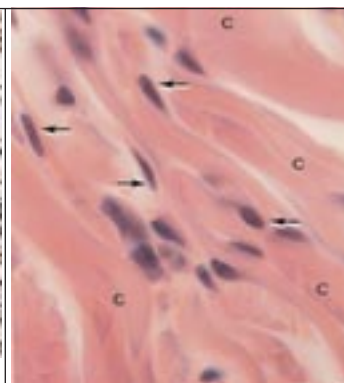
FIGURA 8.



FIGURA 9.



Formación de redes reticulares
Fibras reticulares al MO detectadas
con técnicas argentínicas. x 200



Formación de haces
Fibras colágenas tipo I (c)
H-E x 1000

FIGURA 10.

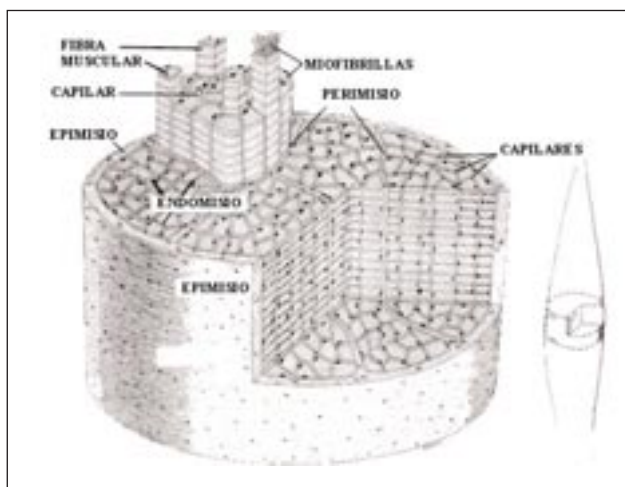
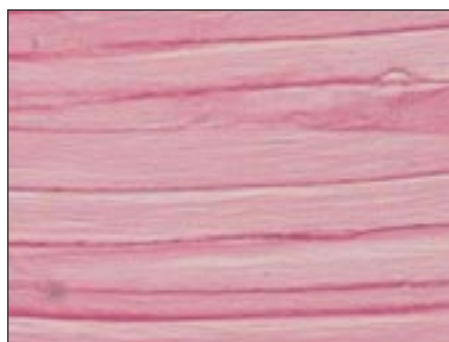
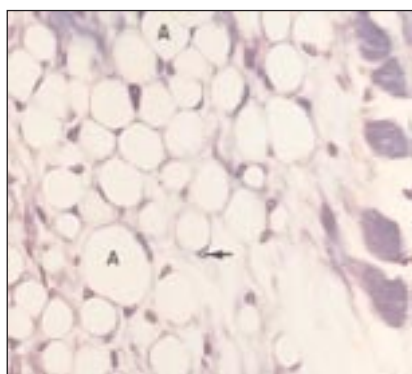


FIGURA 11.

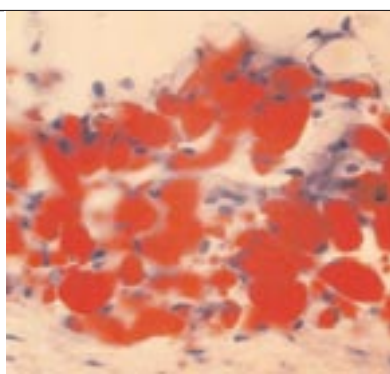


Fibras musculares estriadas en un corte longitudinal teñido con la técnica de PAS. Observe cómo se aprecia claramente la membrana basal. x 400.

FIGURA 12.



Lípidos en cortes parafinados

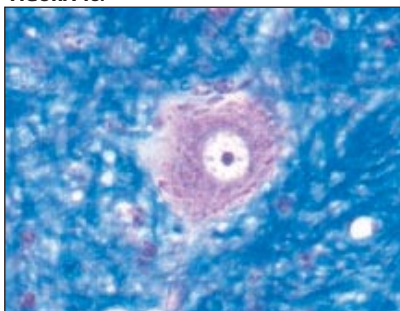


Lípidos en cortes criostato (Oil red O)



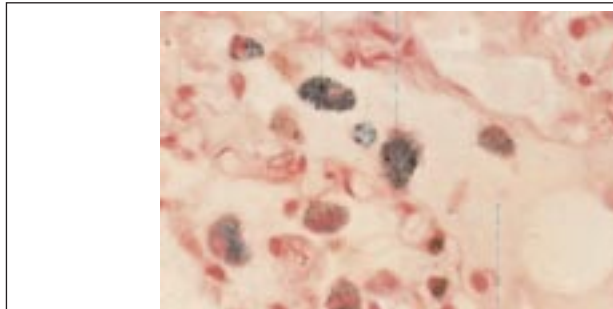
Fibras musculares estriadas en corte longitudinal. Técnica argentílica (x400). Las fibras reticulares (negras) rodean a cada fibra y forman la lámina reticular de la membrana

FIGURA 13.



Klüver-Barrera
(Luxol Fast Blue – Violeta de Cresilo)

FIGURA 14.



Alvéolos de pulmón humano mostrando la presencia de siderófagos o células de la insuficiencia cardíaca, que aparecen en la congestión pulmonar crónica por la incorporación de hemosiderina. Reacción de azul de Turnbull para detectar hierro. H-E. 600x

PARTE II

Ht. Cristina Chaves

INTRODUCCIÓN

Como ya hemos visto en el resumen del Dr. Aldana Marcos, podemos detectar en un preparado histológico a través de distintas coloraciones anilínicas o de impregnaciones argénticas, las siguientes estructuras:

- **Ácidos nucleicos:** como el ADN y el ARN: Ejemplos: Hematoxilina, Rojo neutro, Anilinas metacromáticas (Azul de toluidina, Azul de metileno, etcétera).
- **Hidratos de carbono:** Como la fucsina básica (Reacción de PAS, Reacción de Ziehl Nielssen para micobacterias) Alcian Blue, Mucicarmín, etcétera.
- **Proteínas:** Técnicas histoquímicas para demostración de enzimas, proteínas del tejido conectivo a través de tricromicos, inmunoglobulinas, proteínas antigénicas por demostración de técnicas inmunohistoquímicas, etcétera.
- **Lípidos:** A través de anilinas liposolubles del tipo de Sudan III, Sudan IV, Sudan Black, Rojo escarlata, Aceite rojo O, Luxol Fast Blue, etcétera.
- **Iones:** Técnica de Von Kossa Para demostración de calcio, Técnica de Perls para hierro, etcétera.

FUNDAMENTOS DE TINCIÓN

El fundamento de cualquier método de tinción radica en la propiedad que poseen los tejidos para incorporar y fijar de modo variable diversas sustancias coloreadas denominadas colorantes. Un colorante puede definirse como una sustancia que puesta en contacto con un soporte adecuado, se une a él en forma perdurable transmitiéndole un color.

CLASIFICACIÓN

Una manera didáctica de clasificar los mecanismos de tinción sobre los tejidos y/o las células es la siguiente:

- **Tinción con anilinas**
- **Impregnación con sales metálicas**
- **Reacciones histoquímicas**

La coloración con anilinas generalmente se compone de una tinción primaria y una tinción de contraste o secundaria.

ORIGEN DE LAS ANILINAS

- **VEGETAL**
- **ANIMAL**
- **SINTÉTICO**

PRINCIPIO DE TINCIÓN DE ANILINAS

El soporte químico fundamental de las anilinas colorantes son anillos aromáticos derivados del benceno. El hecho de que los dobles enlaces entre los átomos de carbono de estos anillos no sean fijos y que por lo tanto puedan ser reordenados, es la causa de la diversidad de derivados del benceno y en consecuencia de los colorantes de anilina.

El benceno, al igual que todos los hidrocarburos aromáticos, es originariamente una sustancia incolora aunque susceptible de absorber radiación dentro del espectro de luz ultravioleta... Si se produce la fijación de los dobles enlaces dentro del anillo por ocurrir alguna reacción química sobre éste, el derivado bencénico que se obtiene puede absorber radiación luminosa dentro del espectro visible y mostrar un color

Estos anillos bencénicos que tienen una estructura molecular característica constan de:

- **Grupo cromóforo:** Está dado por los radicales químicos responsables de la modificación molecular que da un color determinado. Los principales grupos cromóforos son los radicales etileno ($>C=C<$), carbonilo ($>C=O$), tiazólico ($>C=S$), imino ($>C=N$), azoico ($-N=N-$), nitroso ($-N=O$), nitro ($-NO_2$) y en general cualquier anillo derivado de las quinonas.
- **Grupo cromógeno:** Formado por el grupo cromóforo más el anillo aromático.
- **Grupo autocromo o potenciador del color:** Está dado por grupos atómicos que le confieren al cromógeno la propiedad de disociarse electrolíticamente o de formar sales con los tejidos. Por lo común están dotados de carga eléctrica, poseen carácter ácido o básico, siendo los responsables de que el colorante tenga mayor o menor afinidad por determinada estructura tisular. Los grupos auxocromos de mayor importancia son los radicales hidroxilo ($-OH$), carboxilo ($-COOH$), amino ($-NH_2$), sulfhidrilo ($-SH$) y determinados iones metálicos derivados del Hierro, Cromo, Aluminio, Molibdeno, etcétera.

ANILINAS MODIFICADAS

- **Metilación:** como el Azul de metileno, cristal violeta, violeta de metilo.
- **Sulfonización:** como la Fuscina ácida
- **Reducción:** Leucoanilinas (leucofuscina de Schiff)

ANILINAS FLUORESCENTES

- Naranja de acridina
- Rodamina
- Rojo Congo
- Fluoresceínas (ejemplo: isotiocianato de fluoresceína)

MECANISMOS DE TINCIÓN

1. **Unión electrostática:** por cargas opuestas. Por ejemplo, anilinas básicas tiñen sustancias ácidas (hematoxilina tiñe ácidos nucleicos y proteínas asociadas).
2. **Unión puente de hidrógeno:** por ejemplo, rojo congo, fucsina resorcina de Waigert.
3. **Reacción física:** Anilinas liposolubles (sudan III, sudan IV, rojo escarlata, sudan black, aceite rojo cero, luxol fast blue, etcétera).
4. **Fuerzas de Van der Waals**

UTILIZACIÓN DE MORDIENTES

Los mordientes facilitan cualquier mecanismo de tinción permitiendo la unión entre la anilina y las distintas estructuras a colorearse y pueden estar dentro de la solución colorante o en pasos previos a la coloración.

CLASIFICACIÓN DE LOS COLORANTES SEGÚN SUS GRUPOS AUXOCROMOS Y APETENCIA TISULAR

COLORANTES BÁSICOS

Están formados por la asociación de un cromógeno de baja densidad y carácter débilmente ácido, con grupos auxócromos catiónicos fuertemente básicos. Por esto se utilizan para colorear estructuras ácidas, por ejemplo los ácidos nucleicos (lacas de hematoxilina, fucsina básica, gallocianina, etc)

COLORANTES ÁCIDOS

Son producto de la unión de un cromógeno de baja intensidad débilmente básico co grupos auxócromos ácidos que le confieren el carácter ácido al colorante. Tiñen estructuras básicas contenidas en los citoplasmas celulares (eosina, floxina, fucsina ácida, etcétera).

COLORANTES NEUTROS

Se producen por la unión salina entre colorantes ácidos y básicos para formar un precipitado, insoluble en agua y estable en solución alcohólica. Siendo su carga global neutra puede colorear conjunta o separadamente diversas estructuras que adquieren una tonalidad policroma (colorante de Giemsa).

METACROMACIA

Aquella anilina que es capaz de teñir estructuras de un color distinto a su grupo cromógeno, no inherente a la anilina misma. Ejemplo: el azul de toluidina es capaz de teñir metacromáticamente en rojo púrpura los gránulos de los mastocitos o el cartílago y ortocromáticamente el citoplasma y/o los núcleos.

POLICROMACIA

Es cuando los tejidos y/o células son teñidos de variados colores, por la acción de más de una fracción cromógena de una anilina. Ej.: Azur II de la solución de Giemsa.

IMPREGNACIÓN METÁLICA

Consiste en la impregnación de los tejidos y/o células de sales metálicas del tipo de nitrato de plata, carbonato de plata, cloruro de oro, etc. En este punto debemos diferenciar dos tipos de reacciones de impregnación:

Argirofilia: Es la afinidad de ciertas sustancias por las sales de plata, las cuales subsecuentemente reducen a negra la plata metálica, con el uso de un agente reductor externo como el formol o el ácido pirogálico. Ej.: Técnica de Gomori para detección de fibras reticulares, técnicas argénticas para detección de fibras nerviosas, astrogliia, oligodendrogliia, etcétera. En este tipo

de reacciones se producen fenómenos de tipo físico y fisicoquímico. Determinadas estructuras histológicas electronegativas “atraen” por un mecanismo **electrostático, a los iones cargados positivamente (Ag⁺) que existen en la solución impregnadora.**

El tejido no interviene activamente en el mecanismo de liberación de la plata metálica a partir de su sal soluble.

Argentofilia: Propiedad de algunas sustancias intracelulares de reducir por sí mismas a plata metálica negra la solución impregnadora, sin la ayuda de reductores externos. Ej.: Von Kossa para calcio, Fontana Masson para melanina. ***Es un tipo de impregnación argéntica por mecanismos histoquímicos ya que el tejido interviene activamente en el depósito de plata metálica A TRAVÉS DE UNA REACCIÓN DE REDUCCIÓN***

ALGUNOS CONCEPTOS IMPORTANTES

- **Coloraciones progresivas:** Son las que utilizan dos o más anilinas. En algunos casos otras sustancias (mordientes, sensibilizadores, reductores, oxidantes, etc) en forma secuencial, para obtener un resultado que identifique distintas estructuras tisulares. Ejemplo: Tricrómicos
- **Coloraciones regresivas:** Los cortes se someten a una sobrecoloración de todas las estructuras de una muestra, para luego llevar a cabo una diferenciación (generalmente ácida o alcohol ácida) para identificar específicamente sólo un componente. Por ejemplo demostración BAAR con Ziehl Neelsen.
- **Coloraciones de conjunto:** Existen múltiples técnicas de tinción que colorean en conjunto los tejidos o las células. La coloración rutinaria por excelencia mundialmente conocida es la de Hematoxilina-Eosina. En un primer paso se tiñen los núcleos con la hematoxilina y en un segundo paso los citoplasmas con la eosina.

REACCIÓN DE PAS (ÁCIDO PERIÓDICO – SCHIFF)

INTRODUCCIÓN

La técnica de PAS (Periodic Acid Schiff) es y ha sido utilizada durante mucho tiempo por numerosos investigadores como método de investigación de macromoléculas con hidratos de carbono, pero como veremos la reacción PAS positiva puede deberse a la presencia de otras moléculas muy diferentes a los hidratos de carbono. Es una reacción histoquímica que utiliza una anilina para dar un color in-situ, previa oxidación de grupos hidroxilos libres. El resultado positivo puede indicar la presencia de algunos polisacáridos o de glicoconjugados (hidratos de carbono unidos prostéticamente a otras moléculas que no son carbohidratos), incluyendo glicoproteínas, proteoglicanos y glicolípidos (Spicer, 1992).

BREVE REPASO DE LA COMPOSICIÓN DE LOS HIDRATOS DE CARBONO Y MOLÉCULAS ASOCIADAS

Los hidratos de carbono o **glúcidos**, son polialcoholes oxidados (polihidroxialdehídos y polihidroxicetonas), que están compuestos por carbono, oxígeno e hidrógeno, éstos dos últimos en posición 1-2.

Los **polisacáridos son glúcidos** de alto peso molecular, macromoléculas formadas por la condensación de varias moléculas de monosacáridos (más de 10). Entre ellos se destacan los **polisacáridos simples** como el glucógeno y los **polisacáridos complejos (mucopolisacáridos, mucoproteínas y mucolípidos)**.

REACCIÓN HISTOQUÍMICA

Es la reacción histoquímica más comúnmente utilizada:

- a. Es de amplia aplicación en el diagnóstico histopatológico rutinario
- b. Como hemos visto puede colorear numerosos componentes bioquímicos (hidratos de carbono o sustancias relacionadas con ellos).
- c. Es una reacción poco específica, sin embargo puede convertirse en muy selectiva mediante los correspondientes controles positivos y negativos, uso de enzimas glucolíticas, combinación con otras técnicas relacionadas con hidratos de carbono, etc.

Esta técnica fue descubierta de forma independiente y prácticamente simultánea por Hotchkiss, Mc Manus y Lillie (1948).

FUNDAMENTO DE LA REACCIÓN DE PAS

Consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico para incrementar el número de grupos carbonilo (aldehídos o cetonas) presentes en ellos, de manera que puedan ser demostrados posteriormente por el reactivo de Schiff.

Los hidratos de carbono contienen grupos carbonilos relativamente aislados, en una proporción aproximada de uno por molécula de monosacárido. Precisamente por ello es necesario oxidarlos con la finalidad de incrementar dichos grupos. El agente oxidante es el ácido periódico, aunque en alguna variante puede utilizarse ácido crómico.

REACTIVO DE SCHIFF

Se obtiene a partir de la fuscina básica (fuscina básica diamante, oro, en cristales), la cual es tratada en su preparación con ácido sulfuroso, a través de un secuencial agregado de ácido clorhídrico y de meta o bisulfito de potasio. Este tratamiento hace desaparecer un doble enlace existente en el centro de la molécula de la anilina transformándose en **leucofuscina: ácido sulfofucsínico o reactivo de Schiff –sustancia incolora–**

Cuando el reactivo de Schiff reacciona con dos grupos aldehídos contiguos con los correspondientes radicales hidroxilos (OH), aparece de nuevo el doble enlace (grupo cromóforo de la fuscina básica) detectando los carbohidratos o biomoléculas asociadas a ellos **y proporciona un color rojo fucsia o magenta característico. (Fuscina reoxidada).**

La cantidad de color desarrollada por la reacción depende de la cantidad de grupos carbonilos reactivos presentes en el tejido o la célula en cuestión, dando resultados positivos cualquier sustancia que complete los siguientes requisitos:

- **Contener el grupo 1-2 glicol.**
- **No difundirse en el curso de la fijación tisular.**
- **Dar un producto de oxidación no difusible.**
- **Estar presente en suficiente concentración para producir un color observable.**

COMPUESTOS PAS (+)

1. **Polisacáridos simples:** Glucógeno, celulosa, etcétera.
2. **Mucopolisacáridos neutros:** Presentes por ejemplo en glándulas del duodeno, epitelio gástrico y cápsulas bacterianas.
3. **Mucoproteínas:** Mucinas del tubo digestivo, árbol respiratorio o bronquial, megacariocitos, cuerpos de Russell de los plasmocitos, hormonas hipofisarias y de la glándula tiroidea, etc.
4. **Glicoproteínas:** Inmunoglobulinas, glicoproteínas de la membrana basal y fibras de reticulina.
5. **Glucolípidos:** Como gangliósidos y cerebrósidos. Esfingolípidos. Esfingomielina.
6. **Pigmentos:** Como pigmento cerioide y ciertas lipofuscinas.

COMPUESTOS PAS (–)

Mucopolisacáridos ácidos: Estos compuestos son también hidratos de carbono que contienen grupos sulfatados o carboxílicos bloqueando los enlaces 1 y 2 glicol, por lo tanto no pueden ser oxidados por el ácido periódico. Estos compuestos son Azul Alcian positivos.

TÉCNICAS DE METENAMINA PLATA. Técnica de Jones, Método de Gomori modificado

Se basan en una impregnación argéntica. Se emplean para visualizar membranas basales, compuestas por glicoproteínas PAS (+). Son técnicas rutinarias en el estudio de patologías renales.

El fundamento técnico se basa en la oxidación por ácido crómico o por ácido periódico de los radicales carbonilo. Como ya hemos visto en la reacción de PAS, éstos ácidos oxidan exclusivamente los enlaces 1-2 glicol y similares.

Posteriormente ocurre una reducción de las sales de plata por éstos radicales, de forma que la plata metálica obtenida precipita sobre las estructuras en depósitos negros.

La sal de plata consiste en un complejo metenamina argéntica, estable sólo a pH alcalino (8.2 a 9.2) Fuera de éstos valores, el complejo se torna inestable. Para lograr el pH adecuado se agrega a la solución impregnadora, borato de sodio.

El procedimiento técnico debe realizarse con un control continuo del pH, de manera que la precipitación de la plata metálica no ocurra anticipadamente.

Existen diversas formas de aplicar éstas técnicas. Las más utilizadas requieren el uso de calor. Cualquier variante en el procedimiento técnico implica siempre de control del pH adecuado para que la reacción suceda en forma lo más específica posible.

También es importante el control microscópico para cortar la impregnación en el momento justo en que aparecen todas las estructuras que se están investigando y antes de una precipitación inespecífica de la plata.

El uso del horno microondas, acelera notablemente los tiempos de impregnación, al producir una agitación molecular mayor que la estufa de 60°C. Los hornos microondas domésticos no son iguales y con el uso pierden potencia. Por lo tanto proponemos se ajuste la utilización de los mismos, adecuando un protocolo en potencia y minutos según la experiencia de cada laboratorio.

Luego de la impregnación con plata metenamina, puede tratarse el tejido con cloruro de oro al 2 x 1000, logrando una viro-fijación de color negro y así resaltar las estructuras impregnadas.

Los contrastes de éstas técnicas para la impregnación argéntica, pueden ser variados según el requerimiento del histólogo o histopatólogo. <puede realizarse un contraste nuclear con hematoxilina o rojo neutro o contrastes citoplasmáticos, entre ellos el más usado es con verde luz al 2 x 1000.

Como dijimos éstas técnicas son de amplia aplicación en patologías renales (glomerulonefritis), junto a la reacción de PAS y el tricrómico de Masson.

Los resultados permiten visualizar en negro, las membranas basales y asas capilares del glomérulo, el mesangio, las fibras de reticulina, las fibras elásticas y cápsulas de hongos.

DEMOSTRACIÓN DE MUCOPOLISACÁRIDOS ÁCIDOS

Los mucopolisacáridos ácidos (MPSA) son polisacáridos que no contienen grupos alcohólicos en posición 1-2 glicol, sino grupos ácidos carboxílicos o sulfatados. Esta composición los diferencia de los mucopolisacáridos neutros (MPSN) co grupos hidroxilo en posición 1-2 glicol y que por lo tanto son PAS (+).

TÉCNICA DEL AZUL ALCIAN PARA MPSA

El azul alcian es un compuesto químico derivado del grupo de las ftalocianinas, moléculas que tienen un átomo central de cobre en torno al cual se disponen rodeándolo, cuatro anillos aromáticos nitrogenados.

Esta anilina básica, se liga a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando lugar a la formación de un compuesto salino entre ambos (**compuesto salino anilina básica – grupos ácidos de mucopolisacáridos**), principalmente cuando el nivel del pH es suficientemente ácido.

En torno a un pH 2.4 a 2.6, el azul alcian no sólo colorea los mucopolisacáridos ácidos sulfatados sino también, los grupos carboxílicos de ácidos urónicos.

Si se emplea el azul alcian a un pH en torno a 1 los grupos sulfatados siguen siendo fácilmente ionizables, mientras que los mucopolisacáridos ácidos no sulfatados pierden esta capacidad, de tal forma que sólo se colorean los primeros.

*Si se sigue disminuyendo el valor del pH a 0.5, se incrementa la selectividad de la coloración, **tiñéndose fuertemente sólo los mucopolisacáridos ácidos sulfatados.***

DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Las técnicas histológicas para su demostración ponen de manifiesto su presencia en el tejido y demuestran algunas de sus características básicas. Mediante estas técnicas es posible precisar:

- **Cocos:** Cuerpos esféricos
- **Bacilos:** Cuerpos alargados
- **Espiroquetas:** Cuerpos enrollados en espiral- (Técnica de Warthin- Starry, Técnica de Levaditi –ambos métodos por impregnación argéntica.
- **Microorganismos GRAM (+):** Azules - Azul - Negruzcos
- **Microorganismos GRAM (-):** Rojos
- **Bacilos ácido alcohol resistentes (B.A.A.R.)**
- **Bacilos Giemsa (+):** Helicobacter pylori
- **Hongos:** Técnica de Grocott con metenamina plata. Reacción dePAS

De todas las técnicas de demostración para microorganismos, veremos aquí algunas de ellas.

MÉTODOS PARA BACTERIAS ÁCIDO-ALCOHOL RESISTENTES

Los microorganismos englobados bajo la denominación de micobacterias ("mycobacterium tuberculosis", "mycobacterium leprae", etc) no se demuestran bien con la técnica de Gram, porque poseen una gruesa capa protectora. Cuando se fuerza la entrada en su interior de colorantes derivados de la fucsina básica utilizando una fucsina básica fenicada y calor, las micobacterias muestran una aptitud mayor de lo común por ellos resistiendo la diferenciación alcohol-ácida, mientras que el resto de los tejidos a excepción de los eritrocitos se decoloran por completo.

La técnica tradicional de Ziehl Neelsen está constituida por dos soluciones fenicadas:

- **Solución de Fucsina de Ziehl:** compuesta por fucsina básica, ácido fénico alcohol y agua.
- **Solución de Azul de Ziehl:** compuesto por azul de metileno, ácido fénico alcohol y agua.

En el procedimiento técnico se calienta la solución de fucsina fenicada colocada sobre el preparado. El calor y el ácido fénico logran penetrar la gruesa cápsula de la micobacteria, permitiendo la entrada del colorante.

Es un tipo de tinción regresiva: se sobrecolorean todas las estructuras para proceder luego a una diferenciación. Esta se lleva a cabo mediante una solución alcohol ácida (alcohol 70% a 96% + HCl 1%) hasta la decoloración casi completa del tejido.

Los bacilos o bacterias ácido – alcohol resistentes, como su nombre lo indica soportan la diferenciación, captando el típico color magenta de la fucsina.

Como coloración de contraste se puede utilizar el Azul de Ziehl o directamente azul de metileno (colorante metacromático).

MÉTODOS PARA DEMOSTRACIÓN DE HONGOS:

Los hongos son microorganismos vegetales que se clasifican de acuerdo a su morfología en:

- Filamentosos (hifas)
- Con esporas
- Filamentosos con esporas

En general son PAS y GRAM positivos en el caso de formar hifas, mientras que se comportan PAS positivos - GRAM negativos, en caso de encontrarse en forma de esporas

Un método bastante utilizado para su demostración es **la técnica de plata metenamina de Grocott** que junto con el PAS, demuestra los hidratos de carbono presentes en la cápsula.

FUNDAMENTOS TÉCNICOS DE LOS TRICRÓMICOS

Los tricrómicos se basan en la utilización de diversas anilinas y se aplican fundamentalmente a la demostración de fibras de tejido conjuntivo y muscular y de núcleos celulares.

Entre los diversos factores que influyen en la coloración específica diferencial de sus componentes, uno de importancia lo constituye el distinto grado de permeabilidad que ofrecen las estructuras tisulares al paso de los distintos colorantes, dependiendo del grado de dispersión de la solución empleada.

El proceso de fijación tisular forma una reticulación proteica general, de modo que las proteínas citoplasmáticas se agrupan constituyendo una fina malla reticular de poro fino, mientras que las fibras del tejido conjuntivo, lo hacen constituyendo una red más laxa. A su vez las partículas de anilinas pueden encontrarse en disolución verdadera (más finamente dispersos por ejemplo los colorantes para teñir citoplasmas) o coloidal (partículas más gruesas, por ejemplo para teñir fibras).

De la interacción entre la red de poros tisulares y el tamaño de las partículas anilínicas, se genera un gradiente de penetración distinto para cada uno de los colorantes.

Los colorantes nucleares que se utilizan generalmente, son distintos tipos de lacas de hematoxilina que colorean estructuras ácidas. Los colorantes citoplasmáticos son del grupo de solución finamente dispersa (Orange G, ácido pícrico, ponceau de xilidina, escarlata de Biebrich, etc), mientras que los colorantes del conjuntivo son derivados del anillo trifenilmetano en solución coloidal y partículas gruesas (fucsina ácida, azul de anilina, verde luz SCF).

Otro factor de importancia es el valor del pH de los distintos colorantes: la mayor apetencia por las fibras colágenas es en medio fuertemente ácido (el pH óptimo está en torno a 1.5). A pH de 2.5 a 3, su afinidad por los aniones decrece el 50%; la coloración del estroma fibrilar, se torna difusa e incompleta a éstos valores.

En cuanto a la coloración selectiva de estas anilinas desempeña un papel fundamental el efecto mordiente previo de los ácidos fosfotúngstico y fosfomolibdico. Estos ácidos bloquean selectivamente los residuos básicos existentes en el tejido a excepción de los fuertemente catiónicos del colágeno, donde luego se acoplarán los radicales aniónicos derivados del anillo trifenilmetano.

En cuanto a la coloración nuclear, debido al bajo pH en que se realiza la coloración selectiva de los elementos citoplasmáticos y fibrilares, es aconsejable utilizar soluciones de hematoxilina que no se decoloren durante el proceso de tinción global, por lo que habitualmente se emplean hematoxilinas férricas.

TRICRÓMICOS MÁS UTILIZADOS

- Tricrómico de Masson
- Tricrómico de Mallory
- Tricrómico de Van Gieson (picrofucsina de Van Gieson)
- Tricrómico de Gomori

COLORACIONES PARA FIBRAS ELÁSTICAS

Las fibras elásticas del tejido conjuntivo se encuentran fundamentalmente en órganos conferidos de distensibilidad como arterias, pulmón, etc.

Están compuestas por un núcleo central de naturaleza proteica: la elastina, rodeado por un componente microfibrilar periférico: la elastomucina de naturaleza similar a la de los mucopolisacáridos. La presencia de esta capa hace que las fibras elásticas sean acidófilas. No obstante tras oxidación su componente microfibrilar se torna intensamente basófilo por formación de grupos ácidos sulfatados sobre su superficie.

MÉTODO DE LA ORCEÍNA

La orceína es un colorante débilmente ácido de origen natural, que se fija selectivamente aunque sin especificidad absoluta sobre las fibras elásticas. La gran ventaja del método es su simplicidad, sin embargo existen diferencias apreciables entre los distintos lotes del colorante que puede originar resultados muy variables.

HEMATOXILINA DE VERHOEFF

Se fundamenta en realizar una coloración diferencial no muy selectiva de las fibras elásticas sobre todo de los elementos más gruesos como las láminas elásticas vasculares, con una laca de hematoxilina férrica a través de fenómenos electrofísicos de atracción entre la laca catiónica y la elastomucina. Debido a su escasa selectividad se tiñen otras variadas estructuras. Por ello la fase fundamental de la técnica es la diferenciación con cloruro férrico.

MÉTODO DE FUCSINA PARALDEHÍDO (GOMORI 1950)

La solución colorante consta de una solución alcohólica del 60-70% de fucsina básica al 0.5 – 1% a la que se le agrega 1 ml de HCl concentrado y 1 ml de paraldehído. La tonalidad de la mezcla en 24 hs debe tornarse a un violeta intenso. El colorante aldehído fucsina pierde gradualmente sus propiedades con el envejecimiento. La diferenciación selectiva de las fibras elásticas se logra por varios lavados en alcohol 60 – 70%.

MÉTODO DE FUCSINA – RESORCINA DE WAIGERT

Es una técnica regresiva. La solución colorante se prepara a través de un precipitado en alcohol 90 % de una solución acuosa previa de fucsina básica, resorcina y percloruro de hierro. Después de la sobrecoloración, la diferenciación selectiva de las fibras elásticas se logra por varios lavados rápidos de alcohol clorhídrico al 1%.

IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA DE LAS FIBRAS RETICULARES

En este punto vamos a definir primero los dos tipos de impregnación argéntica.

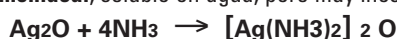
IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA EN DOS TIEMPOS

Utiliza procedimientos químicos para obtener plata metálica a partir de nitrato de plata en varias reacciones sucesivas.

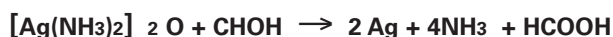
Primero se trata el nitrato de plata con bases fuertes como el hidróxido de sodio, potásico, amónico, etcétera, para obtener óxido de plata que precipita como granulaciones pardonegruzcas.



Al óxido de plata formado en la reacción anterior se le adiciona amoníaco obteniéndose un complejo iónico de plata y amonio: **el denominado óxido diamonio-argéntico o plata amoniacal**, soluble en agua, pero muy inestable.



El óxido diaminoargéntico o plata amoniacal se reduce al agregarle formol al 10%. El formol capta oxígeno hasta precipitar la plata **dando como producto plata metálica**, ácido fórmico y amoníaco



Esta plata metálica es la que se deposita sobre el tejido en forma molecular muy estable.

MÉTODO DE GOMORI PARA FIBRAS DE RETICULINA

- Es una técnica de impregnación argéntica en dos tiempos que utiliza como base fuerte el hidróxido de sodio o de potasio al 1 %.
- Antes de la impregnación se realiza una oxidación con permanganato de potasio, seguida de un blanqueamiento con metabisulfito de potasio o con ácido oxálico.
- El mordiente que se utiliza es alumbre férrico al 2%.
- Luego de la impregnación se utiliza como agente reductor el formol.
- La fijación de la plata metálica se logra con hiposulfito de sodio al 2%
- Las fibras reticulares aparecen en negro mientras que las colágenas se tornan pardo amarillentas

DEMOSTRACIÓN DE SUSTANCIA AMILOIDE

Ht. Carlos Nastasi / Ht. Cristina Chaves

INTRODUCCIÓN

Para que logremos comprender la importancia de su detección, nos explayaremos en algunas nociones básicas de histopatología, de química biológica y del comportamiento físico-químico de esta sustancia anómala.

La sustancia amiloide no está presente naturalmente en el organismo humano, siendo insoluble en agua, alcohol, éter y ácidos fuertes. Con H&E aparece como un contenido rosado amorfo, acelular y homogéneo, indistinguible de la hialina.

Amiloide es un nombre genérico para designar diversas sustancias que tienen en común estar constituidas por proteína fibrilar **beta plegada**. Este tipo de estructura no ocurre normalmente en las proteínas de los mamíferos. En nombre de amiloide, dado por Virchow, se debe a la similitud con el almidón en cuanto a la afinidad tintorial con el yodo.

El depósito de amiloide es extracelular y corresponde siempre a una condición patológica, no rara vez progresiva y letal. El daño local principal que produce la infiltración amiloidea es la atrofia. Estos depósitos pueden ser localizados (en un órgano), o generalizados (en muchos órganos).

Macroscópicamente en fresco, aparece como una sustancia blanquecina y firme que se deposita en el tejido conjuntivo y en el parénquima de los órganos.

Los órganos con amiloidosis presentan aumento de volumen a pesar de la atrofia parenquimatosa que produce la infiltración amiloidea; la consistencia está aumentada, es firme y elástica; la superficie de corte es vítrea. Si se corta un órgano macizo comprometido como el hígado, una lámina de un par de milímetros de espesor y se coloca sobre una hoja con un texto escrito, se puede leer éste a través del tejido.

Los depósitos más comunes de amiloidosis se encuentran en:

- Hígado
- Nódulos linfáticos
- Piel
- Riñón
- Páncreas
- Bazo

SE PUEDEN DISTINGUIR DOS TIPOS DE AMILOIDOSIS

- **Primaria:** Acumulación orgánica de amiloide como enfermedad primaria conocida
- **Secundaria:** Asociada a otras enfermedades, generalmente de índole inmunitaria o neoplásica.

LOCALIZADA

- Piel
- Tiroides
- Islotes de Langerhans
- Corazón
- Cerebro
- Tumores asociados a hormonas (ej.; insulinomas)

GENERALIZADA

- Primaria
- Asociada a discrasia inmunocítica
- Secundaria o reactiva
- Heredo familiares
- Senil

En microscopía óptica, distintas variedades de moléculas fibrilares pueden adoptar aspecto amiloide, por lo cual se considera actualmente que la amiloidosis no debe ser considerada como una entidad anatómicamente diferenciada, sino un conjunto de enfermedades que tienen en común el depósito de proteínas fibrilares de similar aspecto.

Las amiloidosis constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades puesto que las cadenas polipeptídicas del amiloide tienen diversa composición de amino-ácidos.

COMPOSICIÓN DE LA SUSTANCIA AMILOIDE

En microscopía óptica presenta un aspecto amorfo. Sin embargo las fibras amiloides poseen una compleja estructura.

Al microscopio electrónico puede apreciarse su complejidad. Su componente principal es la fibrilla amiloidea, que está formada por dos filamentos helicoidales y que tiene 7 a 10 nm de diámetro. Las fibrillas amiloides son visibles fácilmente al microscopio electrónico y aparecen dispuestas desordenadamente. Las largas cadenas proteicas no ramificadas de longitudes indefinidas y dispuestas en agregados físico-químicos, adoptan una configuración en **beta plegada**.

Desde el punto de vista químico, el 90% de las fibrillas amiloides está compuesto por proteínas fibrosas de naturaleza diferente. El 10% restante, por una glicoproteína denominada sustancia P, relacionada al parecer estrechamente con la proteína C reactiva matriz amiloidea químicamente heterogénea. El componente C se comporta como reactante de la fase aguda de numerosas enfermedades inflamatorias.

De acuerdo con la secuencia amino-acídica de la fibrilla amiloidea, se distinguen diversos tipos de amiloide. En cada tipo se ha encontrado en el suero sanguíneo de los enfermos, una proteína precursora, que tiene la misma secuencia amino-acídica que la del amiloide del caso depositado en los tejidos.

En la nomenclatura actual los tipos de amiloide se designan abreviadamente, de la siguiente manera:

S: proteína sérica precursora

A: amiloide

La letra que le sigue a una sigla determinada, denota el tipo. Los principales tipos son los siguientes:

A: proteína A, obtenida de la fase aguda

L: cadena liviana de inmunoglobulina

F: familiar

E: endocrina

S: senil

Así por ejemplo, **SAL** significa: **proteína sérica precursora del amiloide de cadena liviana de inmunoglobulina**.

En relación con las proteínas fibrilares, se han descripto varios tipos principales de cadenas:

Cadena AL (Amiloide ligera): Procede de la desnaturalización de las cadenas ligeras que componen las moléculas de inmunoglobulinas. Está producida por células plasmáticas secretoras de anticuerpos. Aparece en las discrasias de células plasmáticas como el mieloma múltiple. Puede detectarse actualmente con anticuerpos dirigidos en forma muy específica por métodos de inmunohistoquímica.

Cadena AA (Proteína SAA): Derivada de un precursor de mayor tamaño. Producida por el hígado. Aparece en la amiloidosis secundaria.

Proteína transportadora de tiroxina y retinol (Prealbúmina): Se deposita en el grupo de enfermedades neurológicas hereditarias conocidas como amiloidosis polieuropáticas y en el envejecimiento.

Cadenas degeneradas de beta-2-microglobulina: Proteína de membrana celular relacionada con el complejo de histocompatibilidad de Clase I. Se deposita en pacientes con insuficiencia renal, relacionada con hemodiálisis crónica.

Cadenas de proteínas A4: Se depositan en enfermedades degenerativas del sistema nervioso central.

Cadenas degeneradas de hormonas o sus precursores: Se depositan localmente en ciertos tumores endócrinos de páncreas, calcitonina en el carcinoma medular de tiroides, etcétera.

RECONOCIMIENTO DEL AMILOIDE

El amiloide se reconoce sólo mediante métodos morfológicos. En tejidos frescos, mediante la prueba del Lugol, debido a la afinidad de esta sustancia por el yodo de manera similar a lo que ocurre con el almidón (Virchow 1854). Su peculiar estructura cristalina vista al microscopio electrónico que recuerda a las fibras de celulosa, manifiesta el comportamiento tintorial del amiloide y la apetencia por las soluciones yodadas. Es probable que el mecanismo de coloración se relacione con la formación de complejos múltiples de yodo en el interior de la estructura beta plegada.

Las soluciones yodadas de Lugol o Gram constituyen óptimos métodos de tinción para el amiloide en órganos frescos (sin fijar químicamente). Si se sumerge por unos minutos un corte delgado de material fresco, el tejido con infiltración amiloidea, adopta una coloración pardo-rojiza susceptible de cambiar a azul-violáceo luego de un tratamiento con ácido sulfúrico al 3%, con una mejor apreciación de la zona comprometida.

La fijación formólica prolongada, produce una pérdida progresiva de las capacidades tintoriales del amiloide. Los fijadores no oxidantes que contengan bicloruro de mercurio o estén en mezclas fijadoras alcohólicas, son más convenientes.

En las preparaciones histológicas rutinarias, el amiloide se fragmenta en forma característica después de la sección del material incluido en parafina. Es PAS positivo y se colorea en tono verdoso con los tricrómicos para conjuntivo.

TÉCNICA DEL ROJO CONGO PARA SUSTANCIA AMILOIDEA (BENHOLD 1962)

El Rojo Congo es una anilina diazoica utilizada en la industria textil como colorante de algodón. Tiñe en forma variable el colágeno y las fibras elásticas además de la sustancia amiloide. De tal manera el Rojo Congo carece de especificidad si se observan los cortes con luz blanca, mientras que si se los observa bajo un haz de luz polarizada, **la sustancia amiloidea muestra una intensa y característica birrefringencia verde – manzana**. Este efecto bajo luz polarizada no ocurre con otros componentes tisulares, mientras que el amiloide presenta característicamente un **dicroísmo verde**.

Como el ojo humano no es capaz de distinguir entre luz polarizada y luz blanca, para percibir el fenómeno de birrefringencia, a debe interponerse un cristal analizador entre el polarizador y el ocular del microscopio. Cuando el eje de ambos prismas está cruzado, los elementos birrefringentes brillan sobre un fondo oscuro. Esta propiedad es característica de los complejos formados entre las fibrillas con plegamiento en lámina beta y los complejos de la anilina.

Dicroísmo es la propiedad de ciertos cristales birrefringentes de absorber en una determinada dirección, uno de los rayos polarizados, de manera que el cristal, en esa dirección, parece de otro color: si la luz incidente es blanca, en esa dirección aparece del color complementario al del rayo absorbido.

Como el amiloide posee una estructura en **lámina beta plegada**, los enlaces específicos entre la anilina y la sustancia esta relacionado probablemente **por la creación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de Rojo Congo atrapadas en la red fibrilar y los componentes amino–ácidos de la cadena AA o AL**.

El Rojo Congo se utiliza en solución de partículas moderadamente gruesas, por lo que la malla que forma la trama fibrilar del amiloide parece un factor fundamental para la efectividad de la tinción, las moléculas de anilina quedarían atrapadas en la malla.

De las diversas modificaciones introducidas a la técnica de Rojo Congo, proponemos el Método del Rojo Congo Alcalino de Puchtler (1962):

- Fijación: Formol tamponado al 10 % (la fijación prolongada como hemos visto puede afectar la capacidad tintorial del amiloide), alcohol absoluto o Carnoy.
- Solución de Rojo Congo al 0.5 % en una solución alcohólica de 80% y cloruro de sodio al 1% como solución madre (estable durante meses). Como solución de trabajo se utiliza la solución de almacenamiento (100partes), a la que se le agrega hidróxido de sodio al 1% (1 parte).
- El contraste nuclear puede realizarse antes o después de la tinción específica con el Rojo Congo, utilizando hematoxilinas alcohólicas como Harris.

TÉCNICA

a. Solución de Hematoxilina de Harris

b. Solución de Rojo Congo:

1. Solución Stock:

- Rojo Congo (C.I. 22120)..... 1 gr
 - Cloruro de sodio 1% en alcohol 80% 200 ml
- Agitar hasta la disolución. Estable durante meses.

2. Solución de trabajo:

- Solución stock 100 ml
- Hidróxido de sodio al 1 % 1 ml

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Hematoxilina de Harris 2 minutos
3. Virado rápido en agua corriente
4. Lavar en solución salina de Cloruro de sodio a saturación en alcohol 80 %
5. Colocar en solución de Rojo Congo alcalino durante 20 a 30 minutos
6. Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados

- **Núcleos** **Azules**
 - **Amiloide** **Naranja rojizo con luz blanca**
 - **Amiloide** **Verde manzana brillante con luz polarizada**
 - **Fibras elásticas o colágenas** **Naranja rojizo con luz blanca.**
- No poseen dicroísmo con luz polarizada.

Observaciones

- No deben utilizarse materiales fijados con agentes oxidantes ya sea simples o en mezclas fijadoras (Zenker, dicromato de potasio,

ácido crómico, tetróxido de osmio, etc), ya que introducen en las proteínas grupos hidroxilos que pueden colorearse al ser retenidos por los grupos aminos del Rojo Congo dando lugar a falsos positivos.

- El Rojo Congo en medio ácido o neutro tiñe también las fibras colágenas. Para evitar éste fenómeno es preferible utilizar técnicas de Rojo Congo alcalino.
- La utilización de soluciones que contengan cloruro de sodio a saturación, potencia la fijación del colorante al amiloide, produciendo una coloración progresiva de gran selectividad.

¿DÓNDE PODEMOS HALLAR DEPÓSITOS DE SUSTANCIA AMILOIDE?

La distribución de la infiltración amiloidea en las formas primaria y asociada a discrasia inmunocítica es similar:

- Vasos sanguíneos
- Miocardio,
- Musculatura del tracto gastrointestinal
- Lengua,
- Nervios
- Vasos renales.

En la forma secundaria se afectan:

- Hígado
- Bazo
- Riñones (glomérulos, vasos, intersticio)
- Glándula suprarrenal
- Mucosa y vasos submucosos del tracto gastrointestinal.

Las amiloidosis heredofamiliares, si bien son generalizadas, se presentan con el compromiso preponderante en un órgano:

- Riñón en enfermedades hereditarias autosómicas recesivas y dominantes
- Nervios
- Corazón

La amiloidosis senil es muy frecuente después de los 70 años. Se comprometen:

- Aorta
- Suprarrenales
- Vesículas seminales
- Articulaciones
- Lengua
- Islotes de Langerhans
- Hipófisis
- Encéfalo
- Corazón

REACCIÓN DEL PERMANGANATO POTÁSICO EN LA SUSTANCIA AMILOIDEA

Si antes de realizar la tinción de Rojo Congo el tejido es tratado con una solución de permanganato de potasio, un grupo de sustancias amiloideas no se tiñen con la anilina y dejan de presentar dicroísmo. Las formas AA son sensibles al permanganato de potasio.

Las sustancias amiloideas resistentes al permanganato potásico corresponden, entre otros, a los amiloides AL, AS, endocrinos y familiares con neuropatía. El examen mediante el microscopio electrónico permite reconocer con seguridad pequeñas cantidades de sustancia amiloidea al demostrar las fibrillas típicas.

La distinción histoquímica entre las amiloidosis secundarias y primarias, puede realizarse empleando el método de Wright et col (1977). Se fundamenta en la desnaturalización provocada por la acción del permanganato potásico sobre la cadena AA de amiloide que **pierde su plegamiento en lámina beta y por lo tanto su afinidad por el Rojo Congo**. Tal circunstancia no ocurre en el caso de la cadena AL o de los restantes tipos de sustancia amiloidea.

La fijación del tejido se realiza de la misma manera que para el Rojo Congo convencional con una excepción: **el efecto del permanganato se amortigua notablemente cuando el fijador contiene bicloruro de mercurio**.

SOLUCIONES

• SOLUCIÓN DE PERMANGANATO POTÁSICO

Solución acuosa de permanganato de potasio al 5 % 50 ml

Solución acuosa de ácido sulfúrico al 0.3% 50 ml

- **SOLUCIÓN ACUOSA DE ÁCIDO OXÁLICO AL 2 %**
- **SOLUCIÓN DE ROJO CONGO ALCALINO**

Técnica

1. Desparafinar e hidratar
2. Tratar con solución de permanganato durante 2 a 3 min
3. Aclarar hasta decoloración completa con ácido oxálico
4. Lavar en agua destilada
5. Realizar la técnica de Rojo Congo alcalino

Resultados

Amiloide tipo AA **No se colorea con el Rojo Congo**

Amiloide tipo AL **Rojizo con presencia de birrefringencia a luz polarizada.**

Observaciones

Debe realizarse simultáneamente a la prueba del permanganato, una preparación en paralelo como control con coloración normal de Rojo Congo.

BIBLIOGRAFÍA

- García Del Moral, R.: "Laboratorio de Anatomía Patológica". Interamericana McGraw-Hill - 1993
- Pearce Everson A.G., 1985. Histochemistry theoretical and applied. Vol.2. Churchill Livingstone. New York.
- Pearce Everson A.G., 1960 Histoquímica Teórica y Aplicada. Aguilar. Madrid.
- Martin D.(Jr.), Mayer, P., Rodwell, V., 1984: Bioquímica de Harper. Novena Edición. El Manual Moderno, S.A. de C.V. México D.F.
- Aldana Marcos, H.: "Técnicas utilizadas para detectar glicoconjugados y glicanos en secciones de parafina ". (5-11) - Histoinforme Volumen II, agosto 2001
- Culling C.F.A y Reid P.E., 1989. The histochemistry of colonic mucins. J. Histochem., 27(8):1177-1179
- Spicer S.S., Horn R., Leppi., 1964. Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides. The connective tissue. 251-303
- Spicer S.S Y Schulte B.A., 1992. diversity of cell glucoconjugates shown histochemically: a perspective. J. Histochem. Cytochem. 40(1):1-38
- Guidi, A., Villegas de Guidi, R; Utilización de la pararosanilina o la tionina como reemplazante de la fucsina básica para la detección de polisacáridos neutros simples y conjugados. Cuadernillo de curso anual de técnicas histológicas. Sociedad Argentina de Histotecnología - 2003
- Manual De Patología General. Capítulo 2. Patología Celular: Alteraciones de la matriz extracelular : Amiloide y amiloidosis –
- Nastase, C.: Sustancia amiloide – Cuadernillo Técnicas Especiales – Hospital Garrahan 2002 –
- Chaves, C., Nuñez, C.: Técnicas histológicas aplicadas a biopsias renales y cutáneas. Cuadernillo Módulo Técnicas Especiales. Sociedad Argentina De Histotecnología – 2003 -
- http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologiaGeneral/Patol_023.html
- <http://escuela.med.puc.cl/paginas/Cursos/tercero/patologia/fotosAmiloide.html>
- Satins File: <http://stainsfile.info/>

Referencias

- Ht. Cristina T. CHAVES / Escuela de Técnicos Preparadores de Histología "Prof. Dr. Domingo Mosto" / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina
cristinachaves@uolsinectis.com.ar / Alternativo: cristychaves@hotmail.com
- Ht. Carlos Nastasi / Hospital de Pediatría Juan P. Garrahan / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patologia@garrahan.gov.ar

2.

CITOLOGÍA

Ct. Sandra M. Noya Lamas

Ct. Lilian B. Pisilli

Ct. Ht. Patricia A. Aragón

CORTES



RM 2125



LUIS MARSAN

Deán Funes 427
Buenos Aires - Argentina
Tel: 4931-6439 / 4130
www.luismarsan.com.ar



RM 2255



RM 2245

Leica
MICROSYSTEMS

BIOSEGURIDAD Y MANEJO DE MATERIAL

Ct. Sandra M. Noya Lamas

El término BIOSEGURIDAD define la utilización de prácticas seguras durante el manejo de materiales potencialmente peligrosos. Es un conjunto de métodos o normas tendientes a prevenir o minimizar el riesgo de la actividad diaria mediante la protección de operadores, personal del entorno y medio ambiente.

Tenemos que tener en cuenta que si bien toda actividad lleva implícita la posibilidad de un accidente de trabajo, su conocimiento anticipado nos da la oportunidad de prevenirlo. El técnico de un Laboratorio de Anatomía Patológica, tanto citotécnico como histotécnico se encuentra dentro de la categoría de personal de alto riesgo, ya sea por manipulación del material orgánico como por la utilización de diversas sustancias químicas. Por lo tanto la bioseguridad en el Laboratorio, deberá enfocarse sobre la posibilidad de contaminación infectocontagiosa de material biológico por un lado y de la peligrosidad de sustancias tóxicas, nocivas, corrosivas o irritantes por el otro.

La manipulación de muestras biológicas de líquidos o material citológico, implica un riesgo potencial de infección del personal que lo maneja, problema cada vez más frecuente.

Esto se debe a que el material recibido en general no contiene fijadores (alcohol, formol, etc.), por lo que debemos tomar ciertos recaudos, para evitar cualquier tipo de accidente y prevenir el riesgo de contraer enfermedades infecto contagiosas. El peligro es consecuencia de una serie de factores independientes o interrelacionados, por lo tanto las prevenciones valen tanto para el técnico que procesa el material como para todo el personal que interviene en las diferentes etapas, desde que un líquido biológico es extraído del organismo de un paciente hasta que es retirado del laboratorio por el personal de limpieza.

Es importante tener en cuenta que debemos tratar y manipular las muestras orgánicas como si fuesen siempre de alto riesgo, ya que muchas veces se desconocen los antecedentes del paciente o si se realizaron estudios serológicos o bacteriológicos. Es fundamental tomar conciencia del cuidado personal y del medio donde trabajamos. Una de las posibilidades es por ejemplo tener cortaduras en las manos por tallado de vidrios, manipulación de envases u otro tipo de accidentes, por tanto es obligatoria la utilización de guantes en el procedimiento técnico.

Existen virus o priones resistentes a fijadores químicos, tratamientos con desinfectantes o, inclusive, descontaminación en autoclaves como sucede con la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, por lo que la manipulación de cualquier muestra remitida debe realizarse bajo estrictas condiciones de seguridad.

NORMAS BÁSICAS DE SEGURIDAD

Estas indicaciones deben tomarse como una referencia y completarse con las normas que cada laboratorio considere apropiadas:

- Mantener limpio, ordenado y señalizado el sector de trabajo.
- Trabajar en ambientes ventilados, si no es posible contar con sistemas de ventilación general y/o localizada (campanas).
- Usar ropa adecuada y cabello recogido. No usar desabrochado el guardapolvo ni las mangas del mismo, para evitar el arrastre o derrame de materiales a su paso.
- Contar con una mesada de uso exclusivo para el procesado de material biológico (fresco), correctamente identificada.
- Preparar en la mesada de trabajo, antes de iniciar el procedimiento de procesado, todos los elementos que se necesitarán para éste, a fin de no contaminar otras áreas del laboratorio.
- No comer, beber o fumar en lugares de trabajo.
- Respetar las indicaciones de almacenamiento y manejo de los productos químicos.
No almacenar en sitios vecinos reactivos que puedan reaccionar entre sí, agresivamente, ya sea por contacto directo o por sus vapores. Procure ubicarlos a distancia, en lugares opuestos del droguero.
- Las sustancias indicadas como peligrosas solo serán manipuladas por personal idóneo.
- Nunca tomar con las manos desnudas un Erlenmeyer con su contenido líquido.
El vidrio caliente no se diferencia del vidrio frío y, los accidentes por desconocimiento del proceso previo, pueden ser de extrema gravedad.
- Debe existir en el lugar de trabajo un botiquín de primeros auxilios

RIESGOS EN EL LABORATORIO

Entre los riesgos de trabajar en el laboratorio se encuentran:

Horas de trabajo,
desmotivación,
responsabilidades,
estrés,
comunicación inadecuada,
relaciones interpersonales

Falta de compromiso y responsabilidad con la tarea.
Trabajo descoordinado y despasejo.
Falta de capacitación, instrucción y asesoramiento de la aplicación
y riesgos del material que se utiliza.
Improvisación.
Falta de planificación en la tarea.

RIESGO PSICOLÓGICO

Este está en relación directa con los demás riesgos, ya que el estado anímico, el grado de estrés y la falta de capacitación del técnico y demás personal del laboratorio, impiden el desarrollo adecuado de las actividades, lo que conlleva al incremento de accidentes laborales y errores en el funcionamiento del laboratorio.

RIESGO BIOLÓGICO

Parásitos, bacterias,
virus, hongos, etcétera.

Infecciones

Teniendo en cuenta que una cantidad importante de materiales citológicos se reciben en fresco pudiendo provenir de pacientes infectados, y para minimizar o prevenir el riesgo biológico, se hace necesario tomar algunas precauciones y tener a nuestro alcance una serie de elementos antes de comenzar el procesamiento de las muestras:

- Leer detenidamente y evaluar todos los datos que figuren en el protocolo de remisión del material con el objeto de preparar la cantidad de extendidos que estimemos necesarios para eventuales técnicas complementarias.
- Preparar en la mesada de trabajo antes de iniciar el procedimiento de procesado, todos los elementos que se necesitarán para éste, a fin de no contaminar otras áreas del laboratorio.

Para ello debemos tener en cuenta:

- Realizar la descripción macroscópica del material. Ej.: origen orgánico del líquido, cantidad, aspecto, color.
- Rotular o grabar la cantidad de portaobjetos necesarios, de acuerdo a cada caso.
- Como mínimo dos pares de guantes de látex del tamaño que mejor se ajuste a la mano, para trabajar cómodo, ya que al manipular vidrios, puede producirse la rotura de los mismos.
- Cantidad necesaria de tubos de centrifuga cónicos.
- Cápsulas de Petri.
- Frascos con alcohol 96°.
- Pipetas Pasteur descartables o de vidrio.
- Clips para separar los portaobjetos.
- Baja lenguas de madera.
- Utilizar ropa apropiada y de uso exclusivo para el laboratorio como barbijo, camisolín y antiparras .
- Preparar una solución fresca de hipoclorito de sodio al 10% para desinfección.

Esta solución no sirve para el día siguiente y debe ser preparada en el momento.

Se utiliza tanto para desinfectar los frascos y tubos que se reciclan como para los que no se reciclan.

Es conveniente desinfectar los envases que se desechan que posteriormente serán colocados en bolsas rojas correspondientes al desecho de material patológico, a fin de prevenir cualquier accidente del personal de limpieza.

Asimismo este personal debería contar con los elementos necesarios para su protección, tales como guantes de recolección de residuos contaminantes, etc., para prevenir posibles contaminaciones dentro o fuera del Laboratorio. Los elementos de vidrio se colocan por lo menos 30 minutos en hipoclorito de sodio al 10%. El instrumental metálico se coloca en detergente quirúrgico y luego se lo enjuaga en la solución de hipoclorito. Los metales pueden ser oxidados o atacados por estas sustancias corrosivas, por lo que deben ser manejadas con precaución. Existen otros desinfectantes de tipo fenólico o aldehído, como el formaldehído o glutaraldehído, apropiados para material orgánico contaminado con micobacterias o virus.

RIESGO FÍSICO

Térmico (frío – calor)
mecánico (trauma),
eléctrico



Traumatismos

En cuanto a este tipo de riesgo, es conveniente tener en cuenta la distribución adecuada de los equipos y el almacenamiento de los materiales a utilizar (sobre todo los inflamables), a fin de evitar que los mismos obstruyan los lugares de circulación o las salidas del laboratorio.

Es recomendable, de no contar con ellos, solicitar la colocación de matafuegos y baldes de arena por eventuales incendios o derrame de sustancias químicas.

También es de importancia tener identificadas las llaves que cortan el suministro eléctrico de cada área y, ante una falla eléctrica, suspenderlo hasta que el problema se haya solucionado.

Periódicamente, debe verificarse el funcionamiento de los aparatos y las instalaciones eléctricas.

Observar el buen funcionamiento de los cierres de las centrífugas. En el caso de los modelos antiguos que permiten centrifugar con la tapa abierta, no introducir las manos para sacar los tubos antes de que se haya detenido totalmente.

RIESGO QUÍMICO

Inflamables, ácidos,
combustibles, etcétera



Intoxicaciones
Explosiones
Quemaduras
Incendio

Es importante saber que las drogas, colorantes, solventes, etc. deben exhibir etiquetas que provean la información de seguridad de los mismos, por lo que los técnicos deben habituarse a leer exhaustivamente las de uso diario para conocer:

- nombre del producto e información descriptiva
- fórmula y peso molecular
- estructura química
- pureza
- N° de catálogo
- recomendaciones para el manejo
- condiciones de almacenamiento sugeridas
- tamaño del envase y presentación
- N° de lote
- advertencia de peligro y pictograma correspondiente
- información de salud y seguridad
- propiedades físicas
- como así también, si en la empresa se encuentra disponible la hoja de datos de seguridad

En cuanto a las diversas sustancias químicas que se manipulan, pueden ejercer efectos adversos tanto sobre las personas como sobre la atmósfera dentro o fuera del Laboratorio. Sustancias tales como el benceno, son altamente tóxicas y cancerígenas, por esto mayormente ha sido reemplazado por otros intermediarios como el tolueno o xileno, tóxicos en menor medida. De cualquier modo éstas sustancias no deben inhalarse, debe evitarse el contacto con la piel y preferentemente deberán ser manejadas bajo campana, ya que son altamente volátiles. Hay que tener en cuenta que la exposición del técnico a éstas sustancias es diaria y que es acumulativa en el organismo, pudiendo manifestarse consecuencias a largo plazo. Otras sustancias destacables son los ácidos y álcalis, y diversos tipos de colorantes azoicos, nitrosaminas y amidas entre las que se encuentra, por su importancia como carcinógeno, la diaminobencidina y sus derivados. Por lo tanto es indispensable la adecuada prevención en el manejo de ácidos y álcalis, y en general de toda droga en polvo.

La distribución del Laboratorio es fundamental. La almacenación de estos productos debe hacerse en lugares frescos y oscuros, lejos de las salidas de emergencia o de las entradas y salidas generales, para evitar el bloqueo del fuego en caso de incendio. Debe contarse con extractores, extinguidores de fuego y baldes de arena en los lugares adecuados.

Las normas que deben aplicarse en la manipulación de estas sustancias son las siguientes:

- Normas de higiene personal, tales como no beber, comer o fumar en lugares prohibidos ni durante la manipulación de sustancias nocivas.
- Lavarse las manos las veces que sean necesarias.

- No pipetear directamente con la boca.
- Conocer antes de utilizar una sustancia química, sus propiedades, peligros y formas de evitarlos.
- Manipular las muestras, sustancias químicas, material radioactivo, etc., en lugar apropiado.
- Leer detenidamente la etiqueta del envase de las sustancias químicas, donde se encuentra además del nombre del producto, su pureza y las propiedades físicas y químicas, el grado y clasificación de peligrosidad en forma de pictogramas. De no encontrarse en la etiqueta, se puede solicitar información a la casa distribuidora o consultar manuales al respecto, donde se detallan además de la clasificación de peligrosidad, la forma de actuar en caso de inhalación, ingestión o derrame. (Manual Merck por ejemplo).
- Contar en un lugar visible y de rápido acceso con los teléfonos de Centros de Toxicología.

En muchos laboratorios, inclusive en el que yo trabajo, los técnicos preparamos las soluciones colorantes.

Es importante conocer el grado de peligrosidad de las drogas que vamos a manejar y tener la precaución de utilizar barbijo, guantes y antiparras para evitar el contacto de las mismas con la piel y las mucosas.

Esto parece una exageración pero hay sustancias muy volátiles que debemos fraccionar y a pesar de evitar las corrientes de aire, terminamos inhalando lo que pesamos.

Si ustedes tienen alguna experiencia al respecto habrán visto que, alguna vez al terminar de trabajar, sentimos picazón en la nariz y al sonarnos, en el pañuelo encontramos restos del colorante que estuvimos fraccionando.

Tanto en el momento de la preparación como en el uso de los colorantes se generan residuos peligrosos y el contenido de las bateas no debe ser descartado en ningún tipo de desagüe, sino que debe desecharse en bidones provistos por la empresa que se hará cargo de su destrucción.

El generador de un residuo peligroso es responsable del mismo hasta su destrucción ("de la cuna a la tumba").

Descartarlos en el drenaje de agua domiciliaria produciría, en un futuro, un impacto ambiental del que seríamos responsables y pasibles de sanción.

PREPARACIÓN DE COLORANTES

VENTAJAS DE PREPARAR LOS COLORANTES

En nuestra experiencia, teniendo presente los recaudos a tomar en la preparación de los colorantes, es ventajoso no tener que esperar la provisión de soluciones comerciales que, en los hospitales, no siempre son adquiridos en tiempo y forma.

Por otro lado, si por alguna causa imprevista, se agotara el stock de soluciones preparadas, siempre contamos con la posibilidad de recurrir al droguero, en el que encontraremos las drogas base, que tienen un tiempo de vencimiento más lejano que las soluciones ya preparadas.

RENDIMIENTO DE LOS COLORANTES "CASEROS"

En el laboratorio de Citología del Htal. Ramos Mejía preparamos 3-4 litros anuales de cada colorante de Papanicolaou.

Estas soluciones tienen un tiempo de uso aproximado de 4-5 meses, coloreando alrededor de 750 preparados por semana y son filtrados cada 15 días.

Los alcoholes que acompañan a esta coloración son reemplazados cada 15 días.

TÉCNICAS DE PREPARACIÓN

• HEMATOXILINA DE GILL

Agua destilada.....	730 ml
Etilenglicol.....	250 ml
Hematoxilina anhidra	2 gr
Iodato de sodio.....	0,2 gr
Sulfato de aluminio	17,6 gr
(Al 2 (SO4)3 18 H2O)	
Ácido Acético Glacial.....	20 ml

PREPARACIÓN

Se combinan los reactivos en el orden dado, mezclando luego de cada adición, es importante **NO alterar este orden**

Una vez combinados todos los ingredientes, agitar cada 10 minutos por el lapso de 1 hora, siempre a temperatura ambiente.

Para verificar que los resultados de la preparación sean los deseados, colocar una gota de hematoxilina sobre un trozo de papel de filtro y observar:

Alrededor de la gota debe formarse una aureola violácea con un centro bordó intenso.

Si en lugar de ello quedara teñido el papel de color bordó pálido, calentar la solución de hematoxilina hasta su punto de ebullición, agregar 0,25 gr. de óxido amarillo de mercurio y enfriar RÁPIDAMENTE en una pileta o balde con agua y hielo.

Si nuevamente los resultados no fueran satisfactorios, repetir el punto b. SOLAMENTE UNA vez más.

Luego colocar en frasco color caramelo limpio, enjuagado previamente con agua destilada.

Dejar reposar durante 2 días, antes de utilizar.

Durante la primera semana de uso, el tiempo de exposición debe ser de 2 minutos más de lo habitual.

La solución permanece estable aproximadamente 2 años.

RECOMENDACIONES

La presentación de la Hematoxilina anhidra puede ser en polvo o en cristales.

Tener en cuenta que si se utilizan cristales variaremos la cantidad a utilizar, siendo de 2,36 gr.

Respetar el peso EXACTO del Iodato de sodio.

Dado que la fórmula del sulfato de aluminio puede variar, es importante respetar la fórmula dada.

• ORANGE

Solución madre acuosa de orange

Agua destilada 100 ml

OG 6 10 gr

Mezclar los componentes y calentar a baja temperatura para disolver bien el colorante.

Colocar en frasco color caramelo limpio, enjuagado previamente con agua destilada.

Dejar reposar 1 semana antes de utilizar.

Esta solución permanece estable aproximadamente 2 años.

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Solución madre acuosa 20 ml

Alcohol etílico absoluto 980 ml

Ácido fosfotúngstico 0,15 gr

Mezclar los ingredientes en el orden dado

Colocar en frasco color caramelo limpio y enjuagado en alcohol absoluto

Se puede utilizar de inmediato

• ES 36

SOLUCIÓN MADRE ACUOSA DE VERDE CLARO SF AMARILLENTO (LIGHT GREEN SF YELLOWSH)

Agua destilada 100 ml

Verde claro SF amarillento 3 gr

Mezclar en un Erlenmeyer los componente de la solución, llevar a temperatura entre 70–80° y retirar, agitando si el colorante no se ha disuelto completamente.

Dejar enfriar en el Erlenmeyer y luego colocar en frasco limpio de color caramelo, enjuagado en agua destilada.

Dejar reposar 1 semana antes de utilizar.

SOLUCIÓN MADRE ACUOSA DE EOSINA AMARILLENTO (EOSIN Y)

Agua destilada 100 ml

Eosina amarillento 20 gr

Mezclar en un Erlenmeyer los componente de la solución, llevar a temperatura entre 70–80° y retirar, agitando si el colorante no se ha disuelto completamente.

Dejar enfriar en el Erlenmeyer y luego colocar en frasco limpio de color caramelo, enjuagado en agua destilada.

Dejar reposar 1 semana antes de utilizar.

SOLUCIÓN DE TRABAJO

Alcohol etílico 96°	700 ml
Alcohol metílico absoluto	250 ml
Ácido Acético Glacial	20 ml
Solución madre acuosa de verde	10 ml
Solución madre acuosa de eosina	20 ml
Ácido fosfotúngstico	2 gr

Mezclar los ingredientes en el orden dado.

Colocar en frasco color caramelo limpio y enjuagado en alcohol absoluto.

Se puede utilizar de inmediato.

Es importante recordar que TODOS los colorantes deben almacenarse en frascos de color caramelo, limpios y bien tapados, a temperatura ambiente y en la oscuridad.

Es fundamental que las drogas utilizadas en la preparación de las soluciones colorantes sean de buena calidad.

El tiempo de uso y el rendimiento de las mismas amortiza el gasto inicial

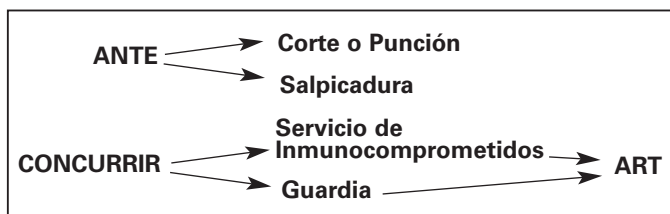
CONTROLES DE SALUD

De acuerdo a la ley 154/99, en su artículo 7, el personal realizará exámenes preocupacionales y médicos periódicos, como mínimo una vez al año, debiendo incluir placa de tórax, PPD, análisis de sangre y orina, y examen clínico.

Además deberá contar con vacunas doble adultos (tétano y difteria) y vacuna para la hepatitis B, según la ley 24151, ambas con esquemas completos.

Se deberá eximir de tareas que impliquen riesgo a todas aquellas personas que presenten lesiones en la piel expuesta, heridas pequeñas en manos y/o brazos y en caso de accidente laboral (lesiones cortantes, punzantes o por salpicaduras) se deberá proceder de la siguiente manera:

- Ante un corte o punción estimular el sangrado y proceder al lavado de la zona afectada con abundante agua y jabón antiséptico.
- En caso de salpicadura de mucosa nasal, bucal u ocular, se deberá lavar con abundante agua, no utilizando productos abrasivos.
- Rápidamente, dar parte al superior inmediato, a los efectos de que cada entidad empleadora haga cumplir los pasos que reglamentan el accidente laboral.



MANEJO DEL MATERIAL CITOLÓGICO

La calidad de un extendido citológico no solo depende del técnico sino también del médico o personal que ha obtenido el material y de la forma en que ha sido remitida la muestra al Laboratorio. Se pueden recibir muestras de diferentes partes del organismo y la adecuada obtención requiere de suficiente habilidad y experiencia. Es importante mantener frecuente contacto con los diferentes servicios o centros remitentes, ya sea para el asesoramiento de envío de líquidos orinas o esputos, o en caso de punciones, para una correcta extensión y fijado de los extendidos.

El material líquido debe ser remitido inmediatamente al Laboratorio, en fresco. Para su recolección no es necesario que los recipientes sean estériles, solo deben estar limpios y secos. Deben remitirse en su totalidad, en lo posible no ser fraccionados por el médico o por cualquier personal que no sea idóneo. La selección estará a cargo del técnico del Laboratorio que efectuará el procesado.

Es importante en líquidos de cavidades serosas o de contenido hemático, colocar durante el momento de la extracción o inmediatamente después un anticoagulante como heparina, para evitar la coagulación por contenido hemático o por alto contenido proteico. En ambos casos, el material fibrinoide o fibrinohemático que se forma en el proceso de coagulación, puede atrapar el material celular. La can-

tividad aproximada de heparina que se coloca será de dos unidades por centímetro cúbico de líquido.

Los líquidos de cavidades deberán ser procesados el mismo día de extracción, para evitar la degradación celular. De no ser posible la remisión o procesamiento inmediato, una manera de conservación es colocarles una solución fijadora de alcohol 50 % a partes iguales fijador-líquido. Sin embargo existen indudables ventajas en el procesamiento de muestras no fijadas:

- Permite un mayor agrupamiento del material celular en el momento del procesamiento.
- Una mayor adhesión del material al portaobjeto sin necesidad de colocación de adhesivos.
- Permite la utilización de microfiltrados de membranas de celulosa.

En citología es difícil contar con una reserva y varias veces nos encontramos con que el material remitido es escaso. De ahí la importancia crucial de aprovecharlo al máximo y prepararlo para los distintos estudios y coloraciones de una manera correcta y adecuada.

¿Qué es necesario saber?

- El tiempo que ha transcurrido de extracción de la muestra.
- Si fue remitida en su totalidad o parcialmente. Por ej.: Se drenaron 2 litros de líquido y se remitieron sólo 500 ml.
- El tiempo de drenaje. Por ej.: Si estuvo drenando toda la noche, si la recolección se obtuvo por bolsa colectora, etc.
- Si el líquido contiene algún tipo de conservante o fijador.
- La obtención de la mayor cantidad de datos clínicos del paciente, la impresión diagnóstica del médico tratante, sospechas clínicas y antecedentes del paciente.

Todos estos datos son necesarios para proceder a la preparación del material, para la cantidad aproximada de vidrios que necesitaremos y de las coloraciones que se realizarán eventualmente si fuera necesario.

INCONVENIENTES DEBIDOS A UNA INCORRECTA EXTENSIÓN DEL MATERIAL EXTENDIDOS GRUESOS

Este problema se suscita cuando una extensión no permite que pase la luz del microscopio, por lo tanto no podremos evaluar la celularidad, ya sea porque la superposición celular no permite una observación de los detalles morfológicos o porque la muestra es hemática. Para un diagnóstico certero, en citología es importante una correcta visualización del detalle nuclear y citoplasmático.

¿Por qué resulta grueso un extendido?

Es consecuencia de la colocación de mucha cantidad de material en el portaobjeto: al extenderlo dará por resultado la superposición de capas celulares en forma densa y gruesa. Si el líquido es hemorrágico, éste artefacto aumenta.

¿Qué sucede cuando llega al laboratorio un extendido realizado muy grueso?

Se procede a rasparlo con el lomo del un bisturí o con una pinza de punta curva y posteriormente el material obtenido se remite para su inclusión en parafina.

VENTAJAS DE UN EXTENDIDO FINO

La correcta visualización morfológica.

Su utilización para posteriores técnicas de inmunohistoquímica o técnicas especiales.

Las pocas posibilidades de contar con material para inclusión en parafina, por lo tanto al obtener extendidos finos con buena celularidad, podremos aprovecharlos para técnicas complementarias.

¿Cómo se procede cuando existen coágulos en un líquido?

Si el coágulo es pequeño, se intentará romperlo entre dos portas para capturar alguna célula atrapada en el material coagulado.

Si es muy grande o no podemos romperlo con una varilla de vidrio, se extraerá del líquido y se procesará como una biopsia. Frecuentemente en este tipo de coágulos fibrino-proteicos quedan atrapadas gran cantidad de células.

Si se reciben por ejemplo 2 litros de líquido totalmente coagulado, primeramente se intentará romperlo y efectuar extendidos y el resto del material se fijará en formol tamponado o en alcohol 96° y se procesará como una biopsia. Una vez obtenidos los cortes y coloreados con H&E, comenzará el trabajo conjunto entre cito e histotécnico, a fin de seleccionar de los bloques, las zonas de mayor celularidad, por medio de la observación microscópica de los cortes. Generalmente este procedimiento se realiza cuando son necesarias técnicas complementarias por tinción de anilinas o inmunomarcación, a fin de delimitar las zonas de mayor población celular, descartar las zonas de fibrina y economizar la utilización de reactivos.

FIJACIÓN EN CITOLOGÍA

Para la fijación de los extendidos citológicos, el alcohol etílico 96° es el más utilizado.

Originariamente, en los tiempos de Papanicolaou se utilizaba alcohol éter. Posteriormente se lo suplantó con resultados similares por el alcohol 96°, ya que el éter es muy volátil e inflamable.

La fijación consiste en sumergir el o los extendidos en un frasco con alcohol etílico 96° entre 15 a 30 minutos de acuerdo al tipo de material y al espesor del mismo. No hay un tiempo de permanencia definida en el fijador, pero si es prolongado, conviene colocarlo en un frasco con tapa hermética y en la heladera para una mejor conservación.

También puede utilizarse fijadores denominados citospray: son fijadores en aerosol con alto contenido de alcohol. Su uso es difundido con buenos resultados en extendidos ginecológicos, cepillados nasofaríngeos y bronquiales. Sin embargo el citospray no fija adecuadamente extendidos con alto contenido proteico, como líquidos serosos o de contenido quístico o hemorrágico ya que el spray puede producir un agrupamiento del material proteico y hemático, cubriendo o dificultando la visualización del material celular.

La aplicación del spray debe realizarse a unos 25 ó 30 cm de distancia del extendido y luego dejarlo secar.

Asimismo pueden utilizarse otros aerosoles como lacas para el pelo con alto contenido de alcohol y con escaso o preferentemente ningún contenido de lanolina o aceite.

Es importante antes de realizar la coloración, colocar los extendidos durante 5 minutos en alcohol 96° para quitar la película que deja el spray y permitir la penetración de los colorantes. También pueden efectuarse pasajes por agua corriente seguidos de destilada, pero el alcohol es más rápido y eficaz para la remoción.

Otro método utilizado es el secado de extendidos al aire sin fijación química:

- Para realizar coloraciones rápidas como el Diff-Quick o Tinción 15" en control de punciones.
- Para la técnica de rehidratación.

Para orinas y líquidos cefalorraquídeos, por ejemplo es el fijador de Saccomano: alcohol etílico al 50% y carbowax 1540 al 2%.

COLORACIÓN RUTINARIA PARA EXTENDIDOS CITOLÓGICOS

La coloración que se recomienda de rutina para los extendidos citológicos es la de Papanicolaou ya que ésta al ser policromática, permite distinguir mejor los distintos componentes celulares del material.

En nuestro Laboratorio utilizamos una hematoxilina de Gill al 2 % acuosa como colorante nuclear, que nos brinda un buen detalle cromático, algo muy importante en citología ya que los detalles nucleares son una pieza fundamental para el diagnóstico. Como colorantes citoplasmáticos se utiliza EA 36 y Orange G, anilina que permite la visualización de la queratina en el epitelio pavimentoso.

En nuestro Servicio utilizamos la coloración de Papanicolaou reducida:

Alcohol 96°	5 minutos
Agua corriente	10 pasajes
Hematoxilina de Gill	5 minutos
Agua corriente	10 minutos
Alcohol 96°	10 pasajes
Alcohol 96°	10 pasajes
Orange G	5 minutos
Alcohol 96°	10 pasajes
EA 36	10 minutos
Alcohol 96°	10 pasajes
Alcohol 96°	10 pasajes
Alcohol metílico	10 pasajes
Alcohol etílico 100°	10 pasajes
Xilol	3 minutos
Xilol	2 minutos
Montaje en bálsamo	

Algo a tener en cuenta es que el alcohol metílico decolora, por lo que no es conveniente dejar las gradillas mucho tiempo en este alcohol. Para ahorrar solventes pueden suprimirse los pasos 14 y 15 y retirar los vidrios directamente del alcohol 100°, colocar los preparados horizontalmente hasta que evapore completamente el alcohol y estén secos y luego montar con cualquier tipo de bálsamo. No deben dejarse secar los vidrios en las canastillas de coloración, porque produce artificios degradé y por tanto manchones de tinción en la observación microscópica. Lo ideal para que los colorantes duren más tiempo, es filtrarlos todos los días. En nuestra experiencia filtrar los

colorantes y cambiar los alcoholes y solventes una vez por semana, es suficiente para un caudal por día aproximado de 70 vidrios. Si se cuida correctamente la batería de coloración, las anilinas pueden durar por lo menos 4 meses con este caudal.

CONCLUSIÓN

El propósito de esta charla es incentivar al personal de una institución o laboratorio que esté afectado al manejo de los residuos patógenos y/o peligrosos a que se capacite en el manejo de los mismos para optimizar su gestión con el fin de proteger la salud de los pacientes, del personal y de la comunidad en general.

BIBLIOGRAFÍA

- OMS Manual de Bioseguridad 1997.
- CEDIME Manual de Bioseguridad 1999.
- BIOPUR: Manual de Laboratorio 2005.
- Guidi Alberto: Curso "La calidad de atención en salud – Reingeniería Humana en los laboratorios de Cito e Histotecnología" Buenos Aires, Abril 2004 a Junio 2005.
- Viguer García Moreno JM, García del Moral R: Laboratorio y atlas de citología - Editorial Interamericana · Mc Graw – Hill, 1995.
- Takahashi, M.: Citología del Cáncer. Editorial Panamericana. Tercera Edición.
- Viguer García Moreno, J.M, García del Moral, R.: Laboratorio y Atlas de Citología. Editorial Interamericana.McGraw-Hill 1995.
- García del Moral R.: Laboratorio de Anatomía Patológica. Editorial Interamericana.McGraw-Hill. Primera Edición 1993.
- Pisilli, Lilian: Curso Teórico-Práctico de generalidades en Citología.
- Histoinforme -Año XV- Volumen II – Julio 2004.

Referencias

- Ct. Sandra M. Noya Lamas / Hospital de Agudos "José María Ramos Mejía" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina

OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y MATERIAL NO GINECOLÓGICO

Ct. Lilian B. Pisilli

INTRODUCCIÓN

El estudio citológico tiene por objeto interpretar las lesiones presentes sobre células aisladas, descamadas libremente de las superficies epiteliales o extraídas de distintas regiones orgánicas, por medio de diversos procedimientos.

La principal ventaja que este tipo de estudios tiene sobre la biopsia, es la posibilidad de realizar un muestreo de las lesiones mucho más amplio y reiterado, de manera que permite hacer un seguimiento dinámico de la conducta biológica de cada lesión.

En los últimos quince años el desarrollo de la citopatología se ha beneficiado con la introducción de instrumentos de fibra óptica para el estudio de lesiones en el tracto respiratorio, digestivo, urinario y ginecológico, y así también la punción con aguja fina ha explorado poco a poco, diferentes órganos, accediendo a zonas más profundas a través de la guía ecográfica o de la tomografía computada.

De este modo, el laboratorio de citología se ha abierto, prácticamente, a todas las especialidades clínicas y quirúrgicas debiendo incorporar, progresivamente, distintos métodos de procesamiento o como complemento diagnóstico ya que, cada vez con más frecuencia, se necesita celeridad y certeza para el tratamiento de pacientes en estado crítico.

Esta variedad de muestras procedentes de distintos servicios, propios de una institución o externos, a veces alejados, son enviados de acuerdo a las posibilidades del lugar de obtención imposibilitando, en un alto porcentaje de los casos, el procesamiento habitual o la correcta interpretación.

HORA 0

La planificación de un estudio debe basarse en los interrogantes que necesitamos responder.

Es muy importante conocer de antemano las expectativas del equipo tratante a los fines de implementar los procedimientos que nos permitirán cumplirlas.

Es en la planificación del estudio, con la elección de la aguja o el fijador ideal para lo que necesitamos demostrar, con la indicación precisa de lo que esperamos confirmar o descartar, con la remisión de datos de laboratorio o estudios radiológicos que nos sitúen en el lugar exacto del proceso de tenemos que identificar, cuando comienza el cuidado de cualquier material citológico y, a partir de allí, cada uno de los procesos debe ser cuidado como el más importante.

Del mismo modo debe tenerse en cuenta que el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y la fijación es crítico y que el éxito en los resultados depende tanto de ello como del método de fijación a utilizar.

Si hablamos de materiales que deben recibirse en fresco es igualmente crítico el tiempo transcurrido entre la extracción de la muestra y su remisión al laboratorio.

A los fines de establecer las pautas que nos permitan prevenir errores previsibles de muestreo, conservación o traslado, la situación ideal de trabajo es la que conforman los equipos multidisciplinarios en donde cada uno interactúa con el resto haciendo lo que sabe de la mejor manera, en beneficio del paciente.

Así planteada la coordinación de los procedimientos, y para optimizar el proceso de obtención y preservación del material, es conveniente que, durante la recolección del mismo, sea personal del laboratorio de citología quien acondicione las muestras obtenidas en cantidad suficiente, contemplando la eventual necesidad de estudios accesorios que permitan la realización del diagnóstico.

Técnicos entrenados pueden formar parte de esos equipos y realizar la recolección de las muestras controlando la calidad del material obtenido antes de dar por terminado el procedimiento.

ALCANCES DEL ESTUDIO CITOLÓGICO

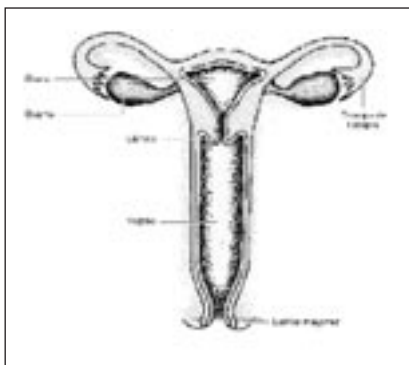
Citológicamente podemos detectar procesos:

BENIGNOS	MALIGNOS
inflamatorios	carcinomas primarios
reactivos	carcinomas metastásicos
infecciosos	linfomas
virales	sarcomas
etcétera	etcétera

en todos los órganos de la economía, siendo el tracto genital inferior el estudiado por excelencia, ya que este muestreo es utilizado, en forma rutinaria, para la detección precoz del cáncer de cuello uterino.

LA CITOLOGÍA GINECOLÓGICA – EL TRACTO GENITAL INFERIOR

El objetivo del estudio del tracto genital inferior, es el de detectar tempranamente lesiones en:



ECTOCÉRVIX

ENDOCÉRVIX

ENDOMETRIO

ELEMENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

- Espéculos de distintos tamaños
- Pipetas con pera de aspiración de goma (en niñas o pacientes que no han tenido relaciones sexuales)
- Portaobjetos nuevos
- Lápiz de diamante
- Alcohol 96°, fijador celular o spray
- Formulario para el llenado de la reseña clínica

TOMA DE LA MUESTRA

Hasta el año 1947, cuando Ayre diseña la espátula de madera que lleva su nombre, las tomas se realizaban en forma aspirativa, sin la observación del cuello.

En la actualidad contamos con una amplia gama de elementos que, usados solos o en conjunto, nos garantizan la obtención de una muestra representativa:

- baja lengua
- espátula de Ayre
- hisopo
- cepillo para toma endocervical
- cepillo para toma endometrial

La espátula de Ayre posee, en un extremo, una forma conveniente para la realización de la toma endocervical y mejora la calidad de la muestra obtenida por el baja lengua cuyas puntas son romas.

Mejor aún, puede utilizarse espátula para ectocervix y cepillo para toma endocervical, cuidando que no resulte desecada la muestra que se obtiene primero.

Con el fin de optimizar la calidad de las tomas pueden adquirirse en el mercado unos dispositivos dotados de un mango largo que facilita el acceso al canal y están constituidos por penachos plásticos suaves, más largos en el centro que en los extremos.

Estos penachos más largos deben ser introducidos en el canal endocervical, y los más cortos quedan a la altura del cuello. Al girar el instrumento, se obtienen, al mismo tiempo ambas muestras, las cuales se extienden y fijan a la vez.

De distintos fabricantes hay otros modelos con la misma estructura, sin penachos que se utilizan de igual modo.

Para realizar tomas endometriales contamos con cepillos de fácil acceso al endometrio.

Generalmente estas muestras son hemáticas ya que la mucosa de la cavidad sangra fácilmente.

Los materiales obtenidos, ya sea con espátulas, cepillos, hisopos, etc., son extendidos, tratando de realizar preparaciones delgadas para evitar la superposición celular.

Cada muestra debe estar perfectamente identificada y acompañada, preferentemente, por una reseña clínica que incluya:

- edad
- última menstruación
- número de partos y/o abortos
- motivo de la consulta

y si correspondiera:

- tiempo de evolución de la enfermedad actual
- antecedentes clínicos y quirúrgicos

- tratamientos instituidos (medicación, tto. hormonal, radio o quimioterapia, etc)
- es **IMPORTANTE** que los datos incluyan el método de fijación utilizado

FIJACIÓN

Podemos tener un técnico meticuloso y el mejor microscopista, pero si la muestra tiene serios defectos de fijación no podrá ser interpretada satisfactoriamente.

La fijación debe realizarse de inmediato, de lo contrario, secar al aire.

Los fijadores utilizados son:

- Alcohol 96°
- Fijador celular
- Spray (es de mejor calidad el que contenga un porcentaje de alcohol más elevado)

RECOMENDACIONES

- Si elegimos sumergir en alcohol elegiremos frascos con cierre hermético para evitar que el alcohol se vuelque pudiendo resultar desecado el material
- El fijador celular y el spray se utilizan indistintamente y se remueven con alcohol 96°. La única recomendación en la utilización de estos fijadores es que los preparados deben secarse bien antes de envolverlos en papel o colocarlos en un sobre ya que, a veces, es muy difícil despegar el papel que se ha adherido al material húmedo.
- Si por alguna razón no logramos fijar inmediatamente la preparación lo conveniente será secar al aire y luego rehidratar el preparado.
- **Nunca fijaremos un preparado que se ha desecado**

ROTULADO DE PREPARACIONES

Una vez ingresadas las muestras, es decir cuando la recepcionista les ha asignado los números de estudio que les corresponden, llegan al laboratorio para proseguir con el rotulado y la coloración.

- Apoyar el extendido sobre la mesada **con la muestra hacia arriba** y numerar en el extremo opuesto al material, controlando que el número que colocamos sea el mismo que figura en la ficha con los datos de la paciente.
- Si el material fuera escaso (es el ejemplo del extendido de una paciente añosa con extendido atrófico) o el fijador cubriera ambas caras del extendido, la luz de una lámpara halógena puede ayudarnos a localizarlo.
- Es muy importante cuidar la presión que ejercemos con el lápiz de diamante, ya que un vidrio más delgado puede romperse.
- Colocar los preparados en las cestillas de coloración con el área rotulada y el material hacia el mismo lado

Con más frecuencia de lo que creemos ingresan al laboratorio preparaciones que se han roto durante el traslado y a veces los trozos resultantes son tan pequeños que no tenemos posibilidad de recuperarlos.

Es muy importante informar del hecho a quien corresponda para que, a la brevedad, la paciente sea citada para la obtención de una nueva toma.

Otro hecho frecuente es el de recibir preparados en sobres de papel que han sido colocados con el fijador húmedo y, al secarse, el papel se ha adherido sobre la zona del material que tenemos que estudiar.

La mayoría de las veces, el alcohol que remueve el fijador, remueve también el papel. Debemos evitar, en lo posible, raspar la preparación para quitar el papel porque con él, quitaremos también una cantidad importante de material.

LA CITOLOGÍA NO GINECOLÓGICA

Dentro de esta categoría vamos a incluir a todos los órganos que pueden proveernos células para estudio, exceptuando el tracto genital inferior.

OBTENCIÓN, PRESERVADO Y REMISIÓN DE MUESTRAS

Desde el punto de vista técnico, el citodiagnóstico es simple, rápido, poco agresivo y de bajo costo, permitiendo identificar, en poco tiempo, la mayor parte de las lesiones, sobre todo las de origen tumoral o pre - neoplásico, lo que lo hace fundamental para estudiar grandes poblaciones de riesgo, pero no debemos olvidar que la calidad final del diagnóstico depende, en igual medida, de la obtención, el envío, el procesado y la interpretación de las muestras.

El laboratorio de citología puede ingresar muestras obtenidas:

- **por raspado**
- **por hisopado**
- **por cepillado**

- **por impronta**

- **por punción con aguja fina de lesiones sólidas**

que sean visibles o palpables, ubicadas en piel, mucosas, tubo digestivo, aparato respiratorio, órganos superficiales o profundos, etc. Su obtención puede ser simple, por observación o palpación, o compleja requiriendo para su localización guía de imágenes, visualización a través de instrumental de fibra óptica o realizarse como parte de un procedimiento quirúrgico.

Las condiciones óptimas de remisión son:

- preparaciones delgadas
- rápidamente fijadas o secadas al aire

Si las condiciones ideales no se cumplen, tenemos poco por hacer para recuperarlos satisfactoriamente.

Es de destacar que si el material procede de servicios externos, es fundamental que conozcamos en que condiciones es remitido ya que, macroscópicamente, no se observan diferencias entre una muestra seca al aire y otra fijada en alcohol, si no permanece sumergida. Al igual que sucede con los materiales ginecológicos, una vez asignados los números de estudio correspondientes, las muestras ingresan al laboratorio para ser cuidadosamente rotuladas, rehidratadas y fijadas si fuera necesario, coloreadas y montadas.

- **espontáneamente (orina)**

- **por drenaje**

- **por lavado de cavidades o instrumental**

- **por punción con aguja fina de lesiones mixtas o líquidas**

La particularidad de estos materiales, que los diferencia del resto, es que su celularidad se encuentra suspendida en medios líquidos. A excepción de la orina de micción espontánea, los demás son obtenidos en actos quirúrgicos o posteriores a ellos, estudios con visualización endoscópica, con o sin guía de imágenes cuyas condiciones óptimas de remisión son:

- frascos limpios y secos con capacidad para remitir toda la muestra obtenida
- no es necesario utilizar frasco estériles
- remitir rápidamente o mantener en la heladera por el menor tiempo posible
- sin el agregado de fijadores, conservadores ni anticoagulantes

A veces las distancias impiden que el material sea remitido al laboratorio y procesado en un tiempo aceptable o que el tiempo de traslado exceda el período contemplado para la permanencia de la muestra bajo refrigeración.

Cuando esto sucede, y para interrumpir los fenómenos de degeneración y autólisis que comienzan a producirse tras la muerte celular, debe evaluarse el beneficio de adicionar fijadores o conservantes:

- alcohol 96°
- alcohol 96° - éter al 50%
- formol neutro

ESTAS MUESTRAS TIENEN EN COMÚN...

- sabemos cuanto líquido recibimos pero ignoramos que cantidad y que tipos de células están suspendidas en él.
- pueden ser hipocelulares.
- por presencia de lesión o como resultado del sangrado por la maniobra del estudio suelen tener un tinte rosado o ser francamente hemáticos

Y TIENEN EN PARTICULAR...

- las células que se encuentran suspendidas en solución fisiológica tienen menos adhesividad que las que se reciben inmersas en líquidos orgánicos.
- después de unas horas, los componentes celulares de una muestra citológica suspendida en formol o alcohol se encuentran "coagulados" por efecto del fijador, por lo cual es dificultoso lograr la adhesión del material al preparado.

Aquí también destacamos que para la realización de un muestreo satisfactorio es fundamental que conozcamos en que condiciones fue remitida la muestra, antes de comenzar el procesamiento.

DATOS CLÍNICOS

Todas las muestras deben hallarse perfectamente identificadas y acompañadas, siempre, de la reseña clínica del paciente que incluya:

- edad y sexo
- tiempo de evolución de la enfermedad actual
- antecedentes clínicos y quirúrgicos (si los hubiere)
- radiológicos y de laboratorio
- tratamientos instituidos (medicación, radio o quimioterapia, etcétera)
- sospecha clínica

y todo dato de interés que pueda orientar el diagnóstico.

LÍQUIDOS ORGÁNICOS - MATERIALES EN FRESCO

Las células que vamos a estudiar están suspendidas en medios líquidos que contienen sustancias nocivas para ellas:

- Sangre
- Líquido intersticial o seroso
- Orina
- Material necrótico
- Enzimas liberadas por células inflamatorias o polimorfonucleares que producen artefactos de detritus o cambios degenerativos en las células mesoteliales, uroteliales o epiteliales cuando permanecen mucho tiempo en ellos.

Por esto, y para garantizar la preservación de la morfología celular, es importante que las muestras sean procesadas recién extraídas.

De no ser posible porque el paciente hace la recolección en su domicilio ó porque fue tomada fuera del horario de atención del laboratorio, la recomendación primordial es que deben mantenerse en la heladera hasta su traslado y permanecer en ella hasta su procesamiento.

ORINA DE MICCIÓN ESPONTÁNEA

En nuestro Hospital los pacientes retiran del laboratorio las indicaciones para realizar el estudio seriado de orina.

Indicaciones para el estudio citológico seriado de orina

1. desechar la 1º orina de la mañana
2. tomar aproximadamente 1 litro de líquido
3. retener
4. orinar en frasco limpio con capacidad para recoger toda la micción
5. mantener en la heladera hasta su traslado al laboratorio
6. repetir los 5 puntos anteriores durante 3 días

Así conseguimos que la vejiga, expandida por el líquido, descame células nuevas.

Las células que estuvieron retenidas en la vejiga toda la noche, a menudo muestran cambios que pueden conducir a error.

LÍQUIDOS SEROSOS

- | | | |
|-----------------------|--|---|
| • líquido pleural | | • de citrinos a hemorrágicos |
| • líquido ascítico | | • se reproducen en infecciones o procesos tumorales |
| • líquido pericárdico | | |

Al igual que con todos los materiales que recibimos en fresco debemos ser cuidadosos, ya que cambios reactivos asociados a procesos inflamatorios pueden hacernos errar el diagnóstico si el material está mal preservado.

También puede ser causal de error, encontrarnos frente a un derrame antiguo desconociendo este dato clínico importante, ya que las células mostrarán cambios degenerativos, producto del tiempo que llevan inmersas dentro del líquido.

Cuando sabemos que han evacuado un derrame antiguo pedimos que, si vuelve a reproducirse, remitan una nueva muestra para estudiar las células recién exfoliadas.

Es importante, antes del procesamiento, realizar la descripción macroscópica de la muestra: origen orgánico del líquido, cantidad, aspecto y color.

LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO

- el líquido remitido es casi siempre translúcido o ligeramente hemático
- la cantidad es escasa, casi nunca supera los 4 ml.
- la población celular en ausencia de lesión es muy escasa

Estas muestras son sumamente delicadas y dado la escasa cantidad y celularidad que ofrecen, su procesamiento debe ser muy cuidadoso. Deben procesarse apenas recogido el material y, en lo posible, por citocentrifugación directa. Evitar la centrifugación, ya que podrían perderse células al quedar adheridas a las paredes del tubo.

LÍQUIDOS MAMARIOS

- citrinos: en enfermedades quísticas, generalmente benignas
- achocolatados: pueden corresponder a papilomas
- hemorrágicos: pueden provenir de tumores localizados en los conductos

Los mejores resultados se obtienen de la centrifugación y posterior citocentrifugación del material.

MUESTRAS OBTENIDAS POR LAVADO DE ÓRGANOS, CAVIDADES O INSTRUMENTAL

Esta técnica consiste en la obtención de células desprendidas de la zona a investigar mediante la instilación y posterior aspirado de solución salina.

El líquido debe ser remitido rápidamente al laboratorio, con un informe donde se encuentren consignados los hallazgos, consideraciones, tratamientos y antecedentes del paciente.

También con solución salina pueden ser "lavados" cepillos, interiores de agujas, pinzas de biopsias, etc, para desprender material que pudiera permanecer adherido.

Este medio resulta altamente propicio para las células, ya que están aisladas de sustancias nocivas y protegidas de la desecación, pero pueden presentar variaciones en su aspecto producto de la maniobra de obtención.

MUESTRAS LÍQUIDAS - MATERIALES FIJADOS

Es bastante probable que recibamos para su procesamiento distintos líquidos o materiales de cepillado (con cepillo incluido) en frascos con formol o alcohol.

Del mismo modo, suelen ingresar al laboratorio muestras biópsicas disgregadas o demasiado pequeñas y coágulos de líquidos o punciones que se han roto en el formol.

Una vez extraído el fragmento visible (si lo hubiere) o raspado el cepillo, materiales que enviaremos a inclusión, procederemos con el formol que contiene el material disgregado igual que con los líquidos a los que se ha agregado algún fijador químico.

En nuestra experiencia, estos materiales tienen pocas posibilidades en cuanto a variedad de procesamiento, dado que los agentes químicos agregados hacen insolubles las proteínas celulares presentes.

Los elementos detallados a continuación van a facilitarnos la tarea:

ELEMENTOS DE TRABAJO	SOLUCIONES
• Vidrios nuevos y limpios en alcohol 96° • Tubos de centrifuga de vidrio y fondo cónico • Pinceles de cerda blanda y pipetas descartables • En escaso sedimento, uso de adhesivo (cualquiera que se utilice en ICQ) • Lámpara de luz halógena de 12v50w	• Solución salina normal • Cloruro de sodio 9 g • Agua destilada 1 lt Utilizar fría y conservar en la heladera • Fijador celular (Fluka 81210) • Polietilenglicol 50 g • Alcohol 96° 1 lt

• Los portaobjetos de uso en la preparación de muestras citológicas deben limpiarse a pesar de ser nuevos. Tenemos muchas probabilidades de perder el material durante la fijación y coloración si ha sido extendido sobre portaobjetos sucios, como consecuencia del manejo que reciben durante el esmerilado, pulido y envasado.

• Es ventajoso el uso de tubos de vidrio y fondo cónico, más allá de su fragilidad. Los tubos construidos en materiales plásticos pierden transparencia con el paso del tiempo, lo que impide visualizar sedimentos escasos. Otra dificultad que presentan es que sus paredes se agrietan no permitiendo un correcto lavado. El fondo cónico favorece la concentración de sedimento, en cambio en tubos de fondo redondo el sedimento se difunde a lo largo de las paredes dificultando su extracción.

• Los pinceles de cerda blanda son de suma utilidad en la realización de preparaciones de cualquier muestra citológica, reemplazando el modo convencional de realizar extendidos. La ventaja sobre otros métodos radica en que es ampliamente beneficioso en aquellas muestras constituidas por células más frágiles.

• A la hora de sumar cuidados, en materiales con escaso número de células o poca adhesividad, el uso de portaobjetos con adhesivo

es fundamental. Puede utilizarse cualquier adhesivo de uso habitual en inmunohistoquímica. Por supuesto entre los elegidos no se cuentan los preparados con albúmina de huevo. **Recordar que un adhesivo para vidrios NO puede prepararse ni almacenarse en envases de vidrio.**

- La solución salina normal es un excelente medio para conservar, siempre en la heladera y por el menor tiempo posible, una muestra que no puede ser procesada en el día.

- utilizar fría
- conservar en la heladera controlando que no crezcan hongos y no usar si se observa contaminada
- si utilizamos solución salina envasada, verificar que la concentración sea 0,9 % y ajustar si es necesario.
- con respecto al fijador celular, es muy buena elección cuando de muestras líquidas se trata, sobre todo si se utiliza en combinación con portaobjetos con adhesivo. Pueden adquirirse los fijadores celulares comerciales o ser preparados en el laboratorio.

- Es importante respetar siempre las indicaciones de un prospecto o los pasos a seguir en una técnica, evitando desperdiciar drogas, a veces costosas, o arriesgando las muestras.

PROCESAMIENTO

Las muestras de este grupo, aún en condiciones óptimas de recolección y preservación, son las que más complicaciones nos ocasionan por lo que su tratamiento requiere de atención, entrenamiento y observación constantes.

Dado que no existe una fórmula para obtener preparados perfectos, es de destacar que el personal afectado al manejo de las muestras para su procesamiento, tiene un rol muy importante en el laboratorio y una gran responsabilidad: los errores cometidos en la elección de los distintos métodos de preparación gravitan directamente en la calidad del diagnóstico.

Es decir que debemos evaluar con sentido común, cada caso en particular antes de iniciar el proceso de transformar estos materiales en preparados citológicos tratando de minimizar al máximo los inconvenientes propios de cada uno.

En mi experiencia, la obtención de un muestreo más satisfactorio es el que se logra por citocentrifugado.

No obstante, si esto no es posible, trataremos de utilizar algunos “secretos de cocina” que nos ayuden a conseguir preparaciones con celularidad adecuada.

OBTENCIÓN DE MATERIAL PARA INCLUSIÓN EN PARAFINA

Es muy probable que en el frasco o jeringa que recibimos con la muestra, identifiquemos formaciones blanquecinas de fibrina o coágulos rojizos de fibrina y sangre.

Es muy conveniente sacarlos con una pinza tratando de que no se rompan y colocarlos en formol, para procesar como material histológico.

Esta redعilla insoluble de fibrina encierra células que pueden aportarnos un patrón histológico o el material suficiente para realizar técnicas histoquímicas o inmunohistoquímicas que nos permitan tipificar una lesión.

MATERIALES EN FRESCO

Muestras directas usando centrífuga

Podemos realizar este muestreo centrifugando los materiales **durante 10' a una velocidad de entre 1000 y 1500 revoluciones por minuto.**

Si luego del centrifugado el sedimento no es el apropiado, desechar el sobrenadante, agregar a los tubos otra porción de la muestra y volver a centrifugar. Este procedimiento se repite tantas veces como sea necesario o como el material lo permita, es decir:

1. Colocar líquido en 2 ó 4 tubos
2. Centrifugar
3. Desechar el sobrenadante y, si el sedimento es escaso, agregar otra porción de líquido
4. Volver a centrifugar
5. Repetir los pasos anteriores tantas veces como sea necesario, hasta obtener un sedimento apropiado.

Si la muestra es hemática, para realizar los extendidos utilizaremos la capa superior del tapón resultante del centrifugado. La zona más celular es la más clara, es decir la que está más alejada del extremo cónico del tubo.

CONTROL DE MATERIAL INTRAPROCEDIMIENTO

La cantidad de preparados a realizar por estudio estará determinada por examen intra procedimiento del material.

- Colocamos una pequeña gota o una pincelada de sedimento sobre un portaobjeto limpio
- Secamos rápidamente
- Coloreamos con Tinción 15''®

En 15 segundos estamos en condiciones de saber cual es la concentración y el tipo celular de la muestra que vamos a estudiar y, de acuerdo a esas características, es el momento en que decidimos que tipo de muestreo realizar.

En este sentido es fundamental que las muestras citológicas sean preparadas por personas entrenadas en el uso del microscopio o que cuenten con ayuda para realizar el control de la cantidad y calidad del material, previo al procesamiento.

Este concepto tiene relación, sobre todo, con algunos tipos de muestras que necesitan tratamientos especiales.

El momento apropiado de decidir el número de preparados que serán necesarios para tales estudios, es el momento en que la muestra ingresa al laboratorio y está siendo procesada.

Si bien podremos contar luego con el material de reserva almacenado en la heladera, que de hecho muchas veces se utiliza, el momento óptimo es el más cercano al de la extracción, ya que las células, aún, no habrán sufrido alteraciones.

PREPARACIÓN DE EXTENDIDOS

Podemos realizar las preparaciones de las siguientes formas:

- 1 a. Tomar con un pincel de cerda blanda una porción de sedimento y practicar un círculo pequeño en el centro del portaobjeto
O
- 1 b. Colocar una gota de sedimento en el centro del portaobjeto y realizar con otro, un extendido corto y delgado
O
- 1 c. Colocar una gota de sedimento en el centro del portaobjeto y enfrentar con otro **presionando suavemente**.
Al separar los vidrios tendremos extendidos "mellizos".

2. Fijar de inmediato o secar al aire.

- **Los extendidos deben ser cortos y delgados.** Si realizamos extendidos largos, cuando terminamos de extender el material, la primera parte estará seca y si son gruesos tendremos muchas capas de células superpuestas que nos impedirá realizar un buen estudio de las mismas.
- Otra cosa importante para tener en cuenta, es la presión que ejercemos al apretar un vidrio contra el otro cuando hacemos los extendidos. No debemos olvidar que hay células más frágiles, que ante demasiada presión estallan, dando por resultado un extendido lleno de "hilachas" o "bigotes".
- **La fijación debe ser realizada de inmediato para evitar que las células se des sequen.** Si no hemos protegido los extendidos rápidamente de la desecación con algún tipo de fijador, dejaremos secar completamente al aire y reservaremos para procesar luego.

Nunca colocaremos en alcohol un extendido que se ha secado, aunque sea parcialmente.

UTILIZACIÓN DE LA CITOCENTRÍFUGA

Su uso es casi imprescindible para la obtención de preparaciones de mayor calidad en el procesamiento de materiales hipocelulares o aquellos cuyas células tienen menor adhesividad a los portaobjetos: orinas, líquidos cefalorraquídeos o de quistes mamarios, materiales obtenidos por lavado, sean estos fijados o no, etcétera.

Su función es concentrar la celularidad y adherirla al portaobjeto.

Los materiales así procesados son óptimos para ser utilizados en coloraciones histoquímicas y marcaciones inmunohistoquímicas.

La optimización de las muestras requiere, **siempre**, de centrifugado previo.

Es el único modo de asegurarnos la obtención del mejor sedimento por concentración del mismo.

Solamente exceptuamos esta regla en presencia de muestras de muy escaso volumen.

PROCEDIMIENTO

1. Centrifugar el líquido hasta obtener sedimento
2. Descartar el sobrenadante
3. Si el sedimento es muy abundante, verificar la concentración celular
4. Adicionar al tubo solución salina y mezclar suavemente. **La cantidad de solución salina depende del número de células que posea el sedimento. Debemos tener en cuenta que por cada portaobjeto se utilizan 0,5 ml. de solución salina con el material en suspensión.**
5. Citocentrifugar en 2 copitas, o las que sean necesarias para técnicas adicionales, durante **10'** a una velocidad de entre 800 y 1000 rpm.
6. Fijar o secar al aire, según los requerimientos de las técnicas a utilizar

SECRETOS DE COCINA

Si el laboratorio no cuenta con citocentrífuga será conveniente hacer una cantidad de preparados cortos y delgados sobre portaobjetos con adhesivo, preferentemente con pincel, fijando algunos en alcohol y dejando otros secar al aire, para rehidratar.

Este método puede utilizarse indistintamente en todo tipo de muestras, tanto en aquellas hemáticas como en aquellas en las que es difícil obtener sedimento, a pesar de haber realizado múltiples centrifugados, como sucede a menudo con orinas muy "transparentes".

PROCEDIMIENTO A UTILIZAR PARA MUESTRAS EN SOLUCIÓN SALINA

Tenemos varias formas de procesar materiales cuyas células se encuentran suspendidas en solución salina.

1. Centrifugar la muestra
2. Tirar el sobrenadante
3. Realizar preparaciones con pincel
4. Fijar de inmediato ó
- 5. preferentemente, para evitar la pérdida celular, dejar secar al aire y rehidratar**

O sino:

1. Centrifugar la muestra
2. Tirar el sobrenadante
3. Resuspender en solución salina nueva
4. Citocentrifugar
5. Fijar de inmediato
- 6. si macroscópicamente es hemático, en lugar de fijar, dejar secar al aire y rehidratar**

O sino

1. Centrifugar la muestra
2. Quitar solamente una porción del sobrenadante (que es solución salina)
3. Agitar suavemente
4. Citocentrifugar
5. Fijar de inmediato
- 6. si macroscópicamente es hemático, en lugar de fijar, dejar secar al aire y rehidratar**

PROCEDIMIENTO A UTILIZAR EN MATERIALES FIJADOS

El único modo que encontramos de óptimo aprovechamiento de este tipo de materiales es:

1. Centrifugar la muestra hasta obtener buen sedimento (depende de la cantidad de material)
2. Descartar el sobrenadante
3. Adicionar solución salina sobre el sedimento para quitar el fijador y centrifugar nuevamente
4. Repetir 3 veces los lavados detallados anteriormente
5. Adicionar al tubo solución salina y mezclar suavemente.

Debemos tener en cuenta que por cada portaobjeto se utilizan 0,5 ml. de solución salina con el material en suspensión.

6. Citocentrifugar en 2 copitas, o las que sean necesarias para técnicas adicionales, durante **10´ a una velocidad de entre 800 y 1000 rpm.**
7. Fijar o secar al aire, según los requerimientos de las técnicas a utilizar.

Ventajas

- Todos los elementos celulares que podamos observar estarán excelentemente fijados
- Aptos para histoquímica e inmunohistoquímica (si no son hemáticos)

Desventajas

- Ningún material fijado permite la rehidratación, por lo tanto si es hemático no se pueden lizar los hematíes ni tampoco realizar técnicas inmunohistoquímicas.

FIJACIÓN - FIJADORES

El fijador por excelencia para muestras citológicas es el alcohol 96°, pero a la hora de fijar una muestra líquida, y si desestimamos la opción de secar al aire y rehidratar, la mejor elección es un fijador celular a base de polietilenglicol en una solución de alcohol o alcohol-éter.

Estos fijadores pueden adquirirse en el comercio o bien pueden ser preparados en el laboratorio.

• **FIJADOR CELULAR (Fluka 81210)**

Polietilenglicol.....50 gr.

Alcohol 96°..... 1 lt.

- Colocar el Polietilenglicol en un Erlenmayer
- Llevar a estufa a 56° hasta derretir
- Agregar el alcohol (o mezcla de 500 ml. de alcohol 96° y 500 ml. de éter)
- Mezclar bien, preferentemente con agitador magnético

PROCEDIMIENTO

1. Sumergir rápidamente los preparados para evitar la desecación, en alcohol limpio (nuevo o filtrado), en una cápsula de Coplin, preferentemente vertical. Estas cápsulas son cubas de vidrio borosilicato, ranuradas, con tapa, que tienen capacidad para 8 preparados, manteniéndolos separados lo que evita que se peguen entre sí y pierdan material.
2. Si elegimos utilizar fijador celular, rociaremos la muestra recién preparada con una fina lluvia de fijador, a una distancia no menor de 15 -20 cm. y dejaremos secar completamente sobre una servilleta de papel o una bandeja, antes de colorear. Una vez seco el fijador sumergiremos el preparado en OTRO borrel con alcohol 96° (no el mismo utilizado para fijar), durante 20', aproximadamente, para removerlo totalmente y procederemos a colorear los preparados.

PROBLEMAS

Como dijimos con anterioridad las células suspendidas en soluciones de lavado pierden su capacidad de adherirse y, al momento de realizar la inmersión en alcohol para su fijación podemos observar que:

- Parte del material se desliza por el portaobjeto para caer en el fondo de la cuba
- Otro inconveniente importante lo constituyen los hematíes abundantes que interfieren en la observación y clasificación celular una vez teñidos con la técnica de Papanicolaou.
- Cuando el material es escaso resulta imposible lograr una correcta fijación, resultando desecadas la mayoría de las células

REHIDRATACIÓN DE MUESTRAS

Rutinariamente, dejamos secar al aire y coloreamos con Tinción 15", algunos extendidos de cada caso (cualquier tipo de muestra), además del que utilizamos para la verificación de la concentración celular. Esta coloración hematológica suele ser de mucha utilidad en algunas ocasiones, complementándose muy bien con la técnica de Papanicolaou, elegida por excelencia para la coloración de materiales citológicos.

Es así que la observación comparativa de preparaciones de un mismo estudio teñidas con ambas técnicas demostró que los extendidos fijados en alcohol y teñidos con técnica de Papanicolaou pierden la mitad de su celularidad durante los procesos de fijación y coloreado, en relación a los extendidos secados al aire y teñidos con Tinción 15",.

Creemos conveniente secar los preparados y luego rehidratarlos en un medio que permita a las células recuperar el líquido perdido, conservando la celularidad.

El medio más adecuado para esta re – hidratación es la solución salina normal, que provoca la lisis de los glóbulos rojos por ruptura de las cadenas de hemoglobina, no mostrando modificaciones en las células nucleadas, en donde se mantiene el equilibrio.

Esta alternativa no puede ser utilizada en muestras fijadas

PROCEDIMIENTO

- Secado rápido
- Rehidratación en solución salina normal

La bibliografía recomienda rehidratar durante 30" aproximadamente, pero en materiales muy hemáticos comprobamos que el tiempo puede extenderse sin causar alteraciones morfológicas en las células nucleadas y que, incluso, podemos realizar más de un cambio del líquido rehidratante si notamos que, por saturación, adquiere un tinte rosado y pierde su capacidad de remover los hematíes.

- Fijación en alcohol 96°
- Coloración

Importante

- Para evitar la contaminación entre materiales, desechar la solución salina una vez usada
- La rehidratación falla si los extendidos secados al aire han sido previamente fijados en alcohol u otro fijador
- No rehidratar todos los extendidos cuando haya que confirmar sangrado mínimo

Ventajas

- Mejor adhesión del material al portaobjeto
- Lisis de glóbulos rojos
- Fondo limpio
- Mayor celularidad
- Detalles nucleares y citológicos conservados o mejorados

CAUSAS DE POCA PRESERVACIÓN

En algunos casos, comparando extendidos del mismo material, encontramos una marcada variación en la preservación celular entre los fijados originalmente en alcohol 96° y aquellos secados y rehidratados.

Estas alteraciones serían causadas por la acción de enzimas proteolíticas eliminadas por polimorfonucleares, células necróticas y otras células inflamatorias, que ocasionarían la pérdida de los detalles celulares y que se agravarían cuando dejamos secar y rehidratamos los preparados.

PUNCIÓN CON AGUJA FINA

La punción con aguja fina tiene como propósito la obtención de material diagnóstico para el estudio citológico de órganos que no exfolian células espontáneamente.

Es el método menos cruento que provee con rapidez, bajo costo y, en general, sin complicaciones el diagnóstico de lesiones observadas clínica o radiológicamente.

Se pueden punzar:

- Lesiones benignas o malignas
- Por palpación o guiados por imágenes → **lesiones en órganos superficiales**
- Guiados por imágenes → procesos en órganos profundos
(mediante radioscopia, ecografía o tomografía computada)

Ventajas

- Poca molestia para el paciente
- Bajo porcentaje de complicaciones
- Preparación simple
- Resultados rápidos
- Sin internación

REQUISITOS INDISPENSABLES PARA EL ÉXITO

- Conocer la ubicación exacta de la lesión, el tamaño y su relación con los órganos y tejidos vecinos
- Contar con los datos de laboratorio, estudios radiológicos y antecedentes clínicos y quirúrgicos (si los hubiera)
- Realizar el procesamiento adecuado del material suficiente
- Debemos contar con un equipo capacitado y entrenado (para punzar y para procesar e interpretar el material)

INDICACIONES

Este método de diagnóstico está indicado para:

- Realizar diagnóstico de lesión tumoral o recoger material para cultivo en el caso de procesos infecciosos
- Demostrar enfermedad metastásica para estadificar una neoplasia conocida
- Identificación del tipo celular de una lesión para seleccionar el mejor tratamiento
- Hacer el diagnóstico o descartar linfoma
- Determinar la presencia de tumor viable o recurrente después del tratamiento

CAUSAS DE FALSOS NEGATIVOS

- Punzamos fuera de la lesión (ocurre en la punción "a ciegas")
- Punzamos una lesión con centro necrótico o quístico
- Punzamos una lesión muy fibrosa
- Punzamos sin control del material

METODOLOGÍA DE TRABAJO EN EL DIAGNÓSTICO

Asistimos a la punción para recoger y controlar la calidad del material obtenido.

Como parte del equipo de trabajo, instalamos un carrito de transporte con todo lo necesario para que los materiales sean evaluados en el momento mismo de la punción por un médico patólogo ó una citotécnica entrenada.

PROCESAMIENTO DEL MATERIAL

MATERIAL DE INCLUSIÓN

Luego de la primera punción el operador nos entrega la aguja con la muestra en su interior.

En primer término, retiramos del cono de la aguja (la porción plástica que la conecta a la jeringa) el coágulo hemático que se encuentra allí alojado y que la mayoría de las veces, engloba pequeños fragmentos de tejido que la aguja ha seccionado en su paso por la lesión.

Este coágulo es muy importante y debemos conservarlo colocándolo, con sumo cuidado para que no se rompa, en un frasquito con formol. Los cortes histológicos de este material teñidos con las técnicas de rutina muchas veces nos proporcionan la estructura que nos permite, junto al patrón citológico, tipificar una lesión.

Si en la primera punción no pudiéramos obtener un coagulito por no haber ingresado la muestra al cono de la aguja, preparamos todos los extendidos posibles con el material contenido en su interior y solicitamos una segunda punción que utilizamos exclusivamente para inclusión.

PREPARACIÓN DE EXTENDIDOS

- Desconectar la aguja. Tomar aire en una jeringa de 20 ml.
- Conectar la aguja.
- Expeler el aire de la jeringa que empujará el material contenido en el interior de la aguja en el centro de uno o varios portaobjetos.
- Realizar extendidos cortos y delgados para evitar que las células se des sequen y otros **gemelos**, (los que resultan de enfrentar 2 vidrios sin extender) para asegurarnos de tener dos preparados con el mismo tipo celular.
- Proceder a fijar rápidamente en alcohol una parte de ellos, dejando otra parte, secar al aire.
- Generalmente el material contenido en el interior de la aguja es suficiente para realizar varios extendidos.

Importante

NUNCA llenar la jeringa de aire con la aguja conectada, ya que la muestra puede ingresar al interior de la jeringa sin posibilidad de recuperarlo

PREPARACIÓN DEL MATERIAL PARA CITOCENTRIFUGAR

Cuando a la presión del aire no podamos obtener más material para realizar extendidos, cargamos en la jeringa solución salina normal, conectamos la aguja, hacemos pasar el suero por su interior para “lavarla” y colocamos esta nueva muestra en un frasquito limpio o tubo de centrifuga para una posterior citocentrifugación.

Al igual que con los extendidos, debemos fijar en alcohol una parte de los vidrios y otra parte secar al aire para rehidratar.

INTERPRETACIÓN INTRAPUNCIÓN

La interpretación intrapunción es realizada sobre extendidos coloreados con tinción 15” „, lo que evita la pérdida del material celular al estar los extendidos secados al aire.

Si a la observación consideramos que serán necesarias técnicas de inmunomarcación para realizar un correcto diagnóstico, solicitaremos una nueva punción que colocaremos en solución salina y procesaremos luego, en el laboratorio, por citocentrifugación.

Esta nueva muestra se solicita para enriquecer el material conseguido por el lavado de la aguja que recogimos anteriormente.

Concluido el procedimiento, las muestras son remitidas al laboratorio, en donde se les asigna el número correspondiente y continúan su procesamiento.

COLORACIONES DE RUTINA

TÉCNICA DE PAPANICOLAOU – BATERÍA DE COLORACIÓN

De la misma manera que un muestreo insuficiente y una fijación defectuosa pueden malograr un diagnóstico, un excelente material puede ser estropeado por un descuido en la coloración.

La técnica por excelencia utilizada para la interpretación de los materiales citológicos es la de Papanicolaou, cuyos tiempos de exposición serán ajustados al gusto de la persona que interprete la muestra.

La batería puede estar compuesta por cubas de plástico (las hay resistentes a los solventes), vidrio o acero inoxidable y en el mercado se consiguen de distintos tamaños y precios.

Cada laboratorio, de acuerdo al caudal de preparados que procesa y de las modificaciones que implemente en la técnica, elegirá el material, el tamaño y el número apropiados.

- Debemos tener una batería reservada para las muestras ginecológicas y otra para las muestras no ginecológicas.
- Debemos filtrar diariamente sus colorantes y alcoholes.
- Cuando es reemplazada, debemos hacerlo en su totalidad, llevando registro de las fechas en que se renueva.
- Es importante lavar bien las cubas en agua y jabón para remover los residuos de colorantes adheridos a las paredes de las cubas, enjuagar y dejar secar antes de volver a llenarlas.

Clásicamente estos son los colorantes y tiempos de exposición:

- Alcohol 96° para fijar, si el material fue procesado por nosotros (no hace falta que sea una cuba, puede ser una cápsula de Coplin vertical, con capacidad para 8 preparados)

- OTRO alcohol 96° para quitar el fijador, si la muestra se remitió fijada
Luego de removido el fijador procederemos a colorear los preparados.

- Alcohol 96° 10´
- Agua destilada pasaje
- Hematoxilina 1´
- Agua corriente virar
- Alcohol 96° 2´ (2 cambios)
- Orange G 6 3´
- Alcohol 96° 2´ (2 cambios)
- EA 36 3´
- Alcohol 96° 2´ (2 cambios)
- Alcohol absoluto 2´ (2 cambios)
- Xilol 2´ (2 cambios)
- Montar

Durante el montado de las preparaciones pondremos sumo cuidado en constatar, con la punta de la pinza, que el material que debemos cubrir se encuentra hacia arriba, en el lugar donde vamos a colocar el cubreobjeto. Recordaremos, además, que será conveniente utilizar cubreobjetos cuyo tamaño cubra la mayor parte de la muestra.

OTRAS COLORACIONES DE RUTINA

Las técnicas de **May Grunwald – Giemsa** (tiempo de exposición aproximado: 15 minutos), **Tinción 15''** (de fabricación nacional, colorea en 15 segundos) o **Diff Quick** (importada), son coloraciones hematológicas que se realizan, como vimos, sobre extendidos secos al aire y se complementan en forma ideal a la técnica de Papanicolaou en la práctica asistencial diaria.

Ventajas

- Evita la pérdida celular, sobre todo en las muestras líquidas
- Minimiza el efecto que la sangre produce en el extendido
- Permite la visualización del coloide en las punciones tiroideas
- Permite establecer el diagnóstico diferencial entre adenoma pleomorfo y carcinoma adenoquístico

Desventajas

- No permite la visualización del patrón cromatínico nuclear
- No permite la visualización de la queratinización en el carcinoma escamoso

USO DE TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS:

Como auxiliares para la realización del diagnóstico podemos hacer uso de una variada gama de técnicas complementarias, que van desde las más simples hasta muy complejas:

- Para la demostración de bacilos ácido – alcohol resistentes pueden utilizarse muestras secadas al aire
- Para la demostración de hongos o mucinas, vidrios fijados en alcohol o secados al aire y rehidratados
- Los cortes del material incluido en parafina, extendidos rehidratados y los preparados que resultan de la citocentrifugación son ideales para realizar técnicas de inmunohistoquímica ya que nos otorgan marcaciones limpias, al no tener el fondo hemático que, en los extendidos fijados originalmente en alcohol, es inevitable
- Para realizar citometría de flujo, recogemos el material en un fijador especial
- Preparaciones secadas al aire y fijadas según corresponda, para la coloración con técnica de Feulgen a utilizar en la cuantificación de ADN por analizador de imágenes
- Técnicas de plata para cuantificar proteínas nucleolares (AgNORs)
- **Específica para tracto genital inferior:** Hibridación in situ - Toma endocervical con cepillo (kit de cepillo + medio de transporte) para tipificación viral.

PROCESAMIENTO DE COÁGULOS EN HORNO DE MICROONDAS

MATERIALES NECESARIOS

- Horno de microondas con sensor de temperatura (nosotros usamos BGH Quick Chef, modelo 16.600)

- Frascos de poliuretano o vidrio que contengan, con espacio y líquido suficiente, las cápsulas con las muestras
- Film adhesivo – Todos los frascos deben estar tapados, excepto el de parafina
- Formol neutro tamponado
 - Formol 100 ml
 - Agua destilada 900 ml
 - Fosfato monobásico de sodio.... 4 gr
 - Fosfato dibásico de sodio..... 6.5 gr.
- Alcohol absoluto
- Xilol
- Parafina derretida en frasco de vidrio, mantenida en la estufa hasta el momento de usar

PROCEDIMIENTO

FIJACIÓN

Las muestras deben tener, por lo menos 1 hora de fijación. De no haberse completado este tiempo sumergir el material citológico (coágulo) en formol neutro a 55°C, nivel de cocción 3, durante 10 a 20 minutos.

Retiramos las muestras del frasco de formol y las introducimos en un frasco de alcohol 96° para quitar el formol (fuera del microondas)

DESHIDRATACIÓN

Retiramos las muestras del alcohol 96° y las colocamos en alcohol absoluto.

Llevamos al horno los frascos de agua, el alcohol absoluto con las muestras y el frasco de xilol (ponemos los 3 frascos juntos para que el xilol también tenga la temperatura del agua al momento de cambiar las biopsias de frasco)

Programamos el microondas con una temperatura de 30° C, nivel de cocción 3, y contamos aproximadamente 10 minutos a partir de que tengamos en el indicador la temperatura solicitada.

IMPORTANTE

El alcohol NUNCA tiene que hervir

Si esto sucede, agregar un poco más de alcohol al frasco

Si al cumplirse el tiempo, el alcohol se encuentra turbio, realizar un nuevo baño de 5 minutos más.

ACLARADO

Transferimos las muestras directamente del alcohol absoluto al xilol, escurriendo en papel absorbente.

Retiramos del microondas el frasco de alcohol absoluto y dejamos solamente el xilol con las muestras y el agua, teniendo siempre la precaución de que el sensor no toque las paredes del recipiente.

Programamos el horno con una temperatura de 55° C, nivel de cocción 3 y contamos 10 minutos a partir de la indicación de que hemos llegado a 55°.

INCLUSIÓN

Recordemos que debemos tener en la estufa la parafina derretida en un frasco de vidrio hasta el momento de ser usada.

Sacamos las muestras del xilol, las escurrimos en papel absorbente y las introducimos en el frasco de parafina derretida.

Cambiamos una parte del agua, ya que esta tiene ahora la temperatura programada para el xilol (más de 55° C).

Programamos el horno para 50° C, nivel de cocción 8 y contamos 20 minutos, aproximadamente, a partir de tener la temperatura deseada.

Al terminar el tiempo de inclusión, tendremos en la superficie una capa de parafina semisólida. Colocar el vaso en la estufa por 20 minutos antes de proceder a hacer los tacos.

IMPORTANTE

Es importante tener en cuenta que NO podremos utilizar en el microondas parafinas mejoradas con componentes plásticos, ya que el microondas no derrite estos componentes.

FALLAS EN LA CALIDAD FINAL

Atribuibles a la obtención y envío de la muestra

- Remitir al laboratorio solamente una parte de la muestra.
- Muestra mal preservada.
- Falta de indicación de las condiciones en que se envía la muestra (secado al aire, fijado en alcohol y luego secado).
- Líquidos con fijadores agregados.

Atribuibles a la muestra

- Abundante líquido con escasa celularidad
- Muestra escasa

Externas

- Drogas defectuosas
- Problemas con el agua destilada

Atribuibles al procesamiento

- Citocentrifugar sin centrifugar previamente
- En muestras hipocelulares o con escasa adhesividad:
 - no utilizar vidrios con adhesivo
 - extendidos fijados directamente en alcohol
 - escasa centrifugación
- NO realizar controles intra procesamiento
- NO realizar un muestreo variado
- Solución salina preparada con agua corriente
- NO controlar la concentración de la solución
- NO incluir material de coágulos
- NO rehidratar materiales hemáticos
- Rehidratar preparados fijados
- NO respetar las indicaciones de los instructivos
- NO preparar muestras de reserva

COMENTARIO

Debemos destacar que las posibilidades diagnósticas que ofrece el material citológico son numerosas y que no hay una forma establecida ni está descripta en ningún libro la técnica para obtener preparados perfectos.

La forma "ideal" de procesamiento es la que, como resultado final, nos proporciona una preparación de calidad óptima en cuanto a cantidad de material, preservación de la morfología celular y coloración que nos permita el estudio exhaustivo de todos los elementos que conforman el preparado, posibilitándonos arribar a un diagnóstico final sin errores.

BIBLIOGRAFÍA

- Koss L. : Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases (vol.2) 4th Edition
- Ng W, Choi F, Cheung L, Wu C: Rehydration of air –dried smears with normal saline: Application in fluid Cytology. Acta Cytol 1994; 38:56-64
- Chan J, Kung I; Rehidratation of air dried smear with normal saline Am. J. Clin. Pathol. 89:30, 1988
- Erozan Y., Bonfiglio T.: Fine needle Aspiration of Subcutaneous Organs and Masses – Ed. Lippincott – Raven 1997
- Koss L. et al: Biopsia por aspiración – Interpretación citológica y bases histológicas – Editorial Panamericana 1988.
- Leong AS: Immunostaining of cytologic specimens. Am J Clin Pathol 1996; 105:139-140
- Vígner García – Moreno JM, García del Moral R: Laboratorio y atlas de citología. Editorial Interamericana · Mc Graw – Hill, 1995
- Pisilli L, Bellotti M, Elsner B, López M y González Bracalenti V: "Posibilidades de procesamiento de muestras recibidas en el laboratorio de citopatología", presentado en el XVI Congreso Argentino de Citología, Buenos Aires, 11 de Noviembre de 2003

Referencias

- Ct. Lilian B. Pisilli / Departamento de Patología / Hospital de Clínicas "José de San Martín" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / lpisilli@yahoo.com.ar

APARATO RESPIRATORIO - CITOPREPARACIÓN

Ct. Ht. Patricia A. Aragón

Todos los materiales del aparato respiratorio también necesitan un trato especial. En este caso, las células no se desecan tan rápidamente porque están protegidas por el moco que las envuelve, pero este mismo moco puede dificultar el estudio del material si no lo tratamos adecuadamente.

MUESTRAS CITOLÓGICAS OBTENIDAS DEL APARATO RESPIRATORIO

- **Espontáneamente** — Esputo
- **Fibrobroncoscopia**
 - Lavado bronquial
 - Cepillado bronquial
 - Lavado bronquioloalveolar (BAL)

ESTUDIO DE ESPUTO SERIADO

Anteriormente a la implementación de la fibrobroncoscopia como método para diagnosticar las enfermedades del aparato respiratorio, el estudio de todo cambio en el mismo se realizaba por medio de esputos seriados (hemoptisis, control de pacientes fumadores para la detección precoz del cáncer de pulmón, nódulos pulmonares, etcétera)

La expectoración debe ser profunda “que salga de los bronquios”

La obtención del esputo puede ser producida espontáneamente o inducida y, lejos, es el método más útil de investigación. Pueden obtenerse muestras múltiples sin dañar al paciente y el rendimiento de diagnóstico es excelente en desórdenes benignos y malignos.

Los pacientes que deben realizar un estudio de esputo, deben observar las siguientes indicaciones:

INDICACIONES PARA REALIZAR EL ESTUDIO DE ESPUTO SERIADO

1. La noche anterior realizar higiene bucal que incluya cepillado dental para eliminar restos alimenticios.
2. En ayunas, toser tratando de provocar expectoración profunda.
3. Expectorar en frasco LIMPIO, no estéril.
4. Mantener en la heladera hasta su traslado al laboratorio.
5. Repetir los 4 puntos anteriores durante 3 días.
6. No debe pasar mucho tiempo antes de ser remitida al laboratorio, pero si no es posible, debe mantenerse en la heladera.

Nota: Si no se consigue expectoración, puede inducirse la misma con una infusión caliente o una nebulización.

MATERIALES NECESARIOS

Para procesar los esputos en fresco necesitamos:

- 1 cápsula de Petri
- 1 pinza
- 1 espátula de metal o de madera (bajalengua o espátula para la toma de Papanicolaou).

Colocamos el material en la cápsula. Con la pinza y la espátula separamos los grumos, los cuales pueden tener hilos de sangre y zonas de moco transparentes u opacas.

Se toma un trocito muy pequeño de cada parte, se los coloca en los portaobjetos y con la espátula se extiende en forma circular. Una vez realizados, sin dejarlos secar, se rocían con fijador celular o se colocan en alcohol 96°.

Generalmente, en los laboratorios de patología se reciben las 3 muestras juntas.

- Si son remitidas **en fresco**, solo la última estará bien preservada, ya que deben ser procesadas dentro de las primeras horas de obtenidas. Al preparar los extendidos notarán la diferencia entre las muestras, ya que en las dos primeras habrá comenzado el fenómeno de autólisis. Cuando vamos a seleccionar el material para realizar los extendidos, debemos tener en cuenta las características de cada muestra:
 - a. Si son salivales, la muestra no será representativa, al igual que en el caso de los materiales autolisados.
 - b. Con esputos espumosos o transparentes, hay que tener mucho cuidado: parecen saliva, pero pueden corresponder a carcinomas mucoscretantes.
 - c. También pueden ser hemáticos:
 - Si tiene coágulos negruzcos no son representativos

- En los mucohemáticos se realizan extendidos de 2 zonas para estudiar por separado la zona mucoide y la hemática.
- Cuando recibimos el material **en alcohol** veremos que éste ha formado verdaderos “pelotones” de moco y podemos proceder de 2 maneras:
 1. Rompemos los “pelotones” y realizamos frotis
 2. Incluimos en parafina
- Si las muestras se reciben **en formol**, observaremos, al igual que en el caso de los fijados en alcohol, que se han formado pelotones, que procesaremos como material histológico, envolviendo algunos o todos (según la cantidad) en papel de filtro por si se disgregan.

Al realizar los extendidos debemos tener en cuenta algunos detalles:

- Si realizamos los extendidos con material en fresco, rociarlos con fijador celular antes que se sequen.
- Cuando el material ha venido fijado en alcohol, realizar los extendidos, espera que se sequen y luego rociarlos con fijador celular.

RESULTADOS

- Depósitos de carbón (generalmente en fumadores) que se ven como puntitos negros
- Espirales de Curschman.
- Carcinomas

Otros hallazgos:

Asbestosis, enfermedad producida por inhalación de fibras de asbesto (amianto). Conocida como fibrosis pulmonar ó neumonitis intersticial idiopática por exposición al asbesto

- Actualmente se ha desarrollado una nueva forma de estudiar estas muestras: la “citología líquida”. Permite enviar al laboratorio recipientes ya preparados conteniendo la muestra expectorada (cuantas se necesiten, de ser posible en recipientes separados).

Las dos ventajas principales de este método son la mejora en los frotis obtenidos (más limpios y con la celularidad más concentrada) y la posibilidad de obtener numerosos preparados de cada muestra para su estudio con técnicas convencionales, histoquímicas (PAS, Zielh-Neelsen) e inmunocitoquímicas (ICQ).

El precedente de la citología líquida fue el “método de Saccomanno”. Este método consiste en recoger una o más muestras en un recipiente que debía contener 50 cc de solución compuesta por:

- 48 cc de alcohol etílico al 50% y 2 cc de Carbowax (polietilenglicol al 2%) al que se le añaden
- 3 mg. de rifampicina. En el laboratorio la muestra se diluye y se centrifuga, posteriormente se realizan extendidos con el sedimento obtenido. Logra un buen detalle nuclear pero fragmenta otras estructuras como los hongos.

Otro modo muy similar es el “método japonés” o método de envío único. En este caso las muestras se recogen sobre 50 cc compuestas por: 49,5 cc de alcohol etílico y 0,1 cc de timol. El procedimiento consiste en volcar la muestra sobre papel de filtro y realizar extendidos con el material no filtrado resultante. Se fijan en alcohol 95% y se colorean con técnica de Papanicolaou.

MATERIALES OBTENIDOS POR FIBROBRONCOSCOPIA

La fibrobroncoscopia es una técnica obligada si:

- el enfermo no expectora.
- el estudio citológico de esputo es negativo, para establecer o descartar el diagnóstico.
- si el diagnóstico ya ha sido hecho, para precisar el tipo histológico y para determinar su localización o extensión.
- la lesión es central y se visualiza en la radiografía de tórax (Rx) o en la tomografía computada (TAC).

LAVADO BRONQUIAL

Este método muy popular de investigación ha sido reemplazado, por su significativo alcance, por cepillados bronquiales. Todavía el método no debe abandonarse porque puede proporcionar información sobre el estado del todo el tracto respiratorio. La muestra es obtenida instilando solución salina normal en un bronquio seleccionado y reaspirando.

Se requiere la guía de radioscopia o broncoscopia.

Hay 2 formas de procesamiento para los lavados bronquiales:

- a. **Con mucolisis**
- b. **Sin mucolisis**

Para las 2 formas, los elementos necesarios son:

- Tubos de centrifuga de fondo cónico y peso aproximado
- Pipetas de Pasteur
- Portaobjetos
- Spray o alcohol 96°
- Solución de Saccomanno

a. Con mucolisis:

A los elementos antes mencionados, agregar:

- Batidora manual tipo "Minipimer"
- Vaso de precipitado de 250 ml de volumen, de polipropileno, preferentemente.

En el vaso de precipitado, duplicar el volumen del lavado bronquial con solución de Saccomanno, dejar reposar durante 30 minutos, luego batir durante 5 a 10 segundos, colocar en los tubos y centrifugar a 1000 rpm. durante 10 minutos. Quitar el sobrenadante con pipeta de Pasteur y realizar la cantidad de extendidos que estimemos necesarios de acuerdo al diagnóstico presuntivo.

b. Sin mucolisis

Centrifugar el lavado, quitar el sobrenadante y extender.

Esto presenta una dificultad importante: al no realizarse la mucolisis, el moco es un obstáculo para la realización de los extendidos.

Es importante destacar que, en el lavado bronquial, los extendidos deben realizarse frotándose uno con otro para romper el moco.

CEPILLADO BRONQUIAL

El estudio de fibrobroncoscopia permite la identificación y la localización precisa de anomalías visibles.

En tumores periféricos se realiza bajo control radiológico con el fin de dirigir con mayor precisión el cepillo al lugar de la lesión.

La toma de la muestra para citología consiste en la introducción de cepillos pequeños por el fibroscopio.

Recibimos el material de cepillado bronquial de dos formas:

1. Extendidos circulares de no más de 2 cm. de diámetro
2. Lavado del cepillo en un frasco con solución fisiológica
 - Los extendidos que se reciben, deben estar fijados en alcohol ó con fijador celular y se colorean con técnica de Papanicolaou.
 - El lavado del cepillo puede ser hemático, pero proporciona células que son altamente representativas, ya que la solución fisiológica en la que éstas se encuentran inmersas, evita que se dessequen (como puede suceder con los extendidos directos del cepillado) y retarda el proceso de degeneración.

Para obtener mayor concentración celular, luego de la centrifugación habitual, se sugiere la citocentrifugación. En caso de obtener extendidos hemáticos, se pueden dejar secar al aire uno ó más vidrios y someterlos a rehidratación.

LA CELULARIDAD NORMAL

La celularidad obtenida presenta, básicamente, la misma morfología sea cual sea la muestra estudiada. Las variaciones derivadas de los diferentes métodos de obtención de material se reflejan en una diferente proporción de los distintos tipos celulares y en la mejor conservación de la morfología en las muestras de cepillado y punción.

La citología normal muestra células descamadas de los epitelios de revestimiento (células escamosas, cilíndricas ciliadas y caliciformes y células cúbicas), macrófagos alveolares y escasas células sanguíneas (linfocitos y polimorfonucleares) en un fondo mucoso con partículas procedentes del aire respirado.

Las células escamosas proceden del revestimiento de las vías aéreas superiores, desde la boca a las cuerdas vocales. Son células poligonales que generalmente descaman aisladas, de citoplasma basófilo las de estratos intermedios y bajos, y acidófilas las más superficiales y maduras, con núcleos centrales, más pequeños, redondeados y de cromatina fina. La irritación del epitelio provoca células discarióticas, de citoplasma más denso y acidófilo y núcleos con engrosamiento cromático.

Las células cilíndricas ciliadas descaman en grupos o aisladas. Muestran un citoplasma basófilo, con un extremo afilado y otro plano con refuerzo en una línea (placa terminal) desde la que sale un penacho de cilios. El núcleo está situado centralmente, abombando los bordes celulares, presentando cromatina gruesa y un pequeño nucleolo. Ocasionalmente el penacho de cilios se observa suelto o con un pequeño fragmento de citoplasma apical.

Las células cilíndricas caliciformes deben su nombre al aspecto morfológico de un núcleo basal en semiluna que parece dar soporte a un citoplasma amplio y claro, abombado, con una o más vacuolas de moco. Su número es menor que el de las células ciliadas, pero aumentan llamativamente con la agresión. Pueden descamar aisladas, agrupadas junto a células ciliadas o en grupos exclusivamente de células caliciformes formando "paneles". El epitelio cilíndrico no se desprende de la pared bronquial en condiciones normales, por lo que no es frecuente encontrarlo en el esputo.

Los histiocitos corresponden tanto al epitelio de revestimiento como a los macrófagos alveolares y neumocitos I y II. El citoplasma es amplio y de tinción variable entre basófilo y acidófilo, mostrando con frecuencia partículas de carbón. El núcleo es redondeado o arriñonado, a veces múltiple de cromatina fina y con frecuencia con un pequeño nucleolo.

En circunstancias de irritación del árbol bronquial hay un aumento de producción de moco, que se refleja en un fondo más oscuro y basófilo y en forma de espirales que corresponden a moldes bronquiales mucosos que al desprenderse se contraen y retuercen (espirales de Curschman). No son específicos de ninguna entidad, pero se ven con mas frecuencia en pacientes asmáticos y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

LAVADO BRONQUIOLOALVEOLAR (BAL)

Se realiza enclavando el fibrobroncoscopio en un segmento bronquial y procediendo a la introducción y aspiración de pequeñas cantidades repetidas de suero fisiológico. El análisis citológico del sedimento, tras el centrifugado, traduce la situación de actividad de procesos intersticiales y tumorales.

Se lo introdujo, inicialmente, como un procedimiento terapéutico, para remover de los espacios alveolares las secreciones acumuladas que bloqueaban el intercambio gaseoso en proteinosis alveolar y en asma bronquial. Seguidamente la técnica se ha usado para diagnóstico en enfermedades pulmonares crónicas, principalmente la sarcoidosis y varias formas de fibrosis pulmonar. La más reciente aplicación de la técnica del BAL está en la identificación de organismos, como *Pneumocystis Carinii* y de agentes bacterianos, micóticos y virales que causan infecciones pulmonares en individuos con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), prematuros y pacientes en tratamiento con radio y quimioterapia.

El ***Pneumocystis Carinii*** es un parásito que se aloja en los alvéolos, en moldes formados por fibrina y material proteináceo y podemos encontrarlos de dos formas:

1. como formas esféricas u ovales, formas quísticas que miden de 4 a 5 micrones de diámetro
2. como trofozoitos o esporozoitos, que miden de 0,5 a 1 micrón de diámetro. Podemos identificar uno ó más trofozoitos dentro de cada quiste.

El esputo inducido, lavados bronquiales y el BAL, reemplazaron a la biopsia a cielo abierto, la que previamente era considerada único método redituable de diagnóstico en infección por *Pneumocystis Carinii*.

Identificar este parásito es dificultoso en material de esputo, pero podemos ver su estructura quística con coloración de Papanicolaou, con coloraciones de plata o Gram Weigert son realmente identificables la pared y los trofozoitos. Es claramente una ventaja poder utilizar procedimientos no invasivos si comparamos el BAL con la biopsia de pulmón a cielo abierto.

CITOMEGALOVIRUS:

Agente viral de la familia del herpes causante de neumonía ocasionalmente fatal. Los cuerpos de inclusión, a veces múltiples se encuentran localizados en el citoplasma y/o el núcleo de las células del epitelio alveolar y bronquiolar.

Estas células presentan, además, agrandamiento citoplasmático y nuclear con cromatina periférica y condensada. La sensibilidad del BAL en la detección de esta enfermedad viral es de 20/50%.

HISTOPLASMA

La histoplasmosis es una micosis que puede sugerir tuberculosis. Es causada por pequeños organismos que miden de 1 a 5 micrones y se localizan en el citoplasma de los macrófagos alveolares. Se identifican con técnicas de plata.

NEUMONÍA DE LA COMUNIDAD

Los microorganismos se encuentran alojados en el citoplasma de los polimorfonucleares

Se da con frecuencia en ancianos que permanecen internados por mucho tiempo

PROCEDIMIENTO

- Medir el volumen total del lavado remitido
- Centrifugar en su totalidad
- Volcar el sobrenadante de todos los tubos
- Agregar solución isotónica de cloruro de sodio al primer tubo con sedimento, agitar y unir al sedimento del segundo tubo
- Unir, así, el sedimento de todos los tubos en uno solo
- Resuspender y centrifugar nuevamente cuatro veces
- Citocentrifugar o preparar la cantidad de extendidos necesarios para realizar las técnicas y coloraciones solicitadas.

Importante:

- En lo posible, cuando el material lo permita, dejar reserva de extendidos fijados en alcohol, por si se necesitan realizar técnicas complementarias de histo o inmunocitoquímica.
- No olvidar que contamos con la posibilidad de rehidratar los extendidos cuando el material es hemático.
- Recordar que los tiempos de exposición a los colorantes para estos materiales son menores a los tiempos que utilizamos para extendidos ginecológicos

COLORACIÓN

Si bien la coloración por excelencia utilizada en la tinción de materiales citológicos es la técnica de Papanicolaou, en algunos laboratorios se utiliza la coloración de hematoxilina – eosina.

A lo largo del tiempo, nosotros hemos hecho algunas modificaciones a la técnica de Papanicolaou para mejorar los resultados en materiales muy hemáticos, por ejemplo en extendidos de punción aspiración y líquidos.

Tales modificaciones consisten en reducir el tiempo de exposición al OG 6 y al EA 36, o directamente se suprime el OG 6.

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

• FIJADOR CELULAR

- Solución de polietilenglicol o carbowax al 50%..... 40 cc
- Alcohol 95 – 96°..... 960 cc
- Solución de polietilenglicol (PM 1500) o carbowax (sol. al 2%) ambos se diluyen al 50% en agua destilada.

• SOLUCIÓN DE SCCOMANNO

- Solución de polietilenglicol o carbowax al 50%..... 40 cc
- Alcohol 95 – 96°..... 526 cc
- Agua destilada..... 434 cc

FORMAS ALTERNATIVAS DE PROCESAMIENTO DE LOS LÍQUIDOS

De no contar con centrífuga podemos utilizar un método alternativo en el procesamiento de líquidos que es la **DECANTACIÓN CON CÁMARAS**. Para su construcción necesitamos: La parte trasera de una jeringa, papel de filtro de 9 cm. de diámetro, bandas elásticas o clips para papel y portaobjetos.

Contamos con un segundo método alternativo que es de **FILTRACIÓN**.

Cyto-Tek MonoPrep está compuesto por un vaso con tapa a rosca, una jeringa que en un extremo tiene una cápsula, y en el interior de ésta, un paño absorbente y una membrana. A continuación de esta cápsula se dispone una tapa a rosca con un eje de 2 paletitas, como las de un batidor.

El kit viene provisto, además, de un frasco gotero con líquido fijador.

BIBLIOGRAFÍA

- Koss, volumen 2 – General Cytology – 19. The Resoiratory Tract in the Absence of Cancer Third Edicion Copyright 1979.
- Wikipedia en español – <http://www.brujula.net>
- Cuaderno de Citopatología 3. Aparato respiratorio: I Ernesto García Ureta – edicioes Díaz Santos S.A 2003
- MonoPrep 2 – Distribuidor: Tecnolab. S.A.

Referencias

- Ct. Ht. Patricia A. Aragón / Departamento de Patología / Hospital de Clínicas “José de San Martín”/ Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina /

3.

INMUNOHISTOQUÍMICA

Ht. Norma Pozzo

Ht. Cristina Chaves

Ht. Sandra Camarero

Ht. Mónica Elizabaraz

Dr. H.J. Aldana Marcos

COLORACIÓN



HI 1210



LUIS MARSAN

Deán Funes 427
Buenos Aires - Argentina
Tel: 4931-6439 / 4130
www.luismarsan.com.ar

Leica
MICROSYSTEMS

ST 4040



INTRODUCCIÓN A LAS TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Ht. Norma Pozzo / Ht. Sandra Camarero

Las técnicas de inmunohistoquímica, son técnicas que localizan un antígeno determinado, utilizando una enzima y una sustancia llamada cromógeno. El resultado es un precipitado insoluble y generalmente color marrón (el color dependerá de la enzima que se utilice)

Generalmente en los laboratorios de Patología, las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), se realizan para la determinación de fenotipos tumorales, demostrando la presencia real de un antígeno.

Para ello es fundamental tener un tejido en perfecto estado de fijación, y preservación de su morfología.

Hay una serie de factores que pueden ejercer influencia en el resultado:

- Fijación: defectos IRREVERSIBLES.
- El procesamiento de la muestra
- La naturaleza del antígeno
- Su concentración en la muestra
- Su distribución (nuclear, citoplasmática, membrana)

Tengamos siempre en cuenta que **la marcación debe aparecer solo en los tejidos que contengan el antígeno problema y estar limitado a este antígeno** y puede aparecer en los controles intrínsecos del tejido que vamos a marcar (variable de acuerdo al anticuerpo utilizado)

Debemos considerar también que la deshidratación y la inclusión en parafina, tienen efecto directo en la técnica.

Generalmente en los laboratorios pueden pedirnos este tipo de técnicas en diferentes muestras

- Cortes en parafina
 - Cortes por congelación
 - Extendidos : realizar en forma convencional y secar al aire
 - Preparaciones citológicas
 - Cultivos celulares
- no mayor a 5 micrones de espesor

En todos los casos es conveniente utilizar portaobjetos limpios y pre-tratados con adhesivo tisular (silane) o portaobjetos con carga positiva para asegurarnos la permanencia del material en el porta a través de los diferentes pasos que tiene la IHQ

En el caso de los extendidos y preparaciones citológicas, la rehidratación con cloruro de sodio 9/1000 ayuda a limpiar los glóbulos rojos y facilita la visualización de las células. Este paso siempre se realiza previo a la fijación.

FIJACIÓN

Nuevamente nos encontramos ante la necesidad de tener un material fijado en óptimas condiciones, **un defecto de fijación jamás puede corregirse.**

Existe el riesgo de tener un preparado con **falso negativo** por lo tanto no podrá llegarse al diagnóstico correcto.

Uno de los defectos más comunes en una mala fijación es encontrarnos con la pérdida de la marcación hacia el centro del corte histológico (intenso en la periferia y negativo o débilmente positivo en el centro).

Si afectamos las determinantes antigénicas por una mala fijación o por el procesamiento de la muestra, será casi imposible tener resultados confiables para determinar la positividad del antígeno a demostrar.

En la fijación química algunos antígenos pierden su reactividad inmunológica y, otros antígenos, la resisten.

Tanto la fijación como el procesamiento de muestras, producen lo que se denomina “enmascaramiento de antígenos” o sea, que los determinantes antigénicos o epitopes quedan ocultos o bloqueados.

Estos epitopes son partes de la molécula de un antígeno responsables en la unión antígeno-anticuerpo. El número de epitopes varía según el antígeno

El proceso de fijación produce el efecto de cross-linking, el cual altera la estructura de las proteínas y enmascara el antígeno.

Para tratar de revertir este efecto no deseado, debemos realizar procedimientos que nos permitan liberar estos epitopes y permitir dejar expuestos los sitios donde el anticuerpo podrá unirse al antígeno.

Podríamos dividir la técnica de inmunomarcación en las siguientes etapas:

1. **Pretratamiento del preparado** (pasos previos a la incubación con anticuerpo primario)
2. **Incubación con anticuerpo primario**
3. **Incubación con sistema de detección**
4. **Revelado**

1. PRETRATAMIENTO DEL PREPARADO

INHIBICIÓN/BLOQUEO DE SUSTANCIAS ENDÓGENAS

En las técnicas de IHQ utilizaremos como marcador una enzima que normalmente también se encuentra en el tejido a marcar. Previamente debemos inhibir estas actividad endógena para evitar que la misma reaccione con el sustrato empleado para localizar la enzima marcadora, dando lugar a falsos positivos.

Peroxidasa endógena: consiste en la inhibición de la peroxidasa remanente en el tejido utilizando un sustrato para la enzima, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). De no efectuarse este paso, el revelado del cromógeno se depositará no solo en los sitios de inmunoreactividad antígeno – anticuerpo, sino en la peroxidasa remanente en el tejido, dando marcación inespecífica de fondo (background)

Biotina: especialmente en hígado, riñón, mama. Existen reactivos comerciales diseñados específicamente para este fin.

Bloqueo de uniones inespecíficas: se realiza con suero normal que contiene inmunoglobulinas no dirigidas contra el antígeno. Este suero deberá ser de una especie distinta que la del antisero primario. El bloqueo de estas uniones inespecíficas evitará la coloración de fondo o background.

RESCATE ANTIGÉNICO CON CALOR O ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Son métodos que tienen como objeto hacer accesible al anticuerpo a los epitopes, que han quedado enmascarados por efectos de la técnica histológica. El método a emplearse varía de acuerdo a las especificaciones de cada anticuerpo.

La implementación de estos procedimientos permite:

- Ruptura de las uniones cruzadas.
- Restauración de la conformación del epítopo.
- Generación de la conformación del epítopo.

Enzimas proteolíticas: se logra cortar las cadenas polipeptídicas afectadas por los efectos del cross-linking de la fijación.

Cada enzima actúa a una temperatura, pH y tiempo determinados.

El tiempo de acción dependerá del tiempo de permanencia de las muestras en el fijador y de las indicaciones específicas del anticuerpo

Método con calor: produce la ruptura de las uniones cruzadas entre el fijador y las proteínas liberando epitopes enmascarados.

Para realizar este método, se puede utilizar como fuente de calor:

- Microondas
- Olla a presión
- Olla a presión en microondas
- Autoclave
- Baño térmico
- Vaporiera

Cada antígeno requiere de un buffer de rescate determinado, siendo el citrato buffer 0.01M pH 6 el más utilizado.

2. INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

En este paso, se produce la reacción antígeno-anticuerpo.

Los anticuerpos pertenecen al grupo de proteínas llamadas inmunoglobulinas con determinada especificidad, es decir, que será capaz de unirse solo a un antígeno. Cuanto mayor sea esa capacidad de unión (avidez), más específico será el anticuerpo.

Hay dos tipos de anticuerpos y de acuerdo al método de obtención se denominan:

Policlonales: Mezcla de AC contra diferentes epitopes de un antígeno.

Monoclonales: Son preparaciones puras. Reconocen un único epítopo.

Son más caros y más delicados (pH de la fijación, pH y salinidad de los buffers de lavado)

Los tiempos de incubación con el anticuerpo primario son variables de acuerdo al protocolo a utilizarse.

UTILIZACIÓN DE TESTIGOS

En el caso de la utilización de testigos positivo y negativo estos controles deben tener idéntico procesamiento al de los tejidos que vamos a marcar.

3. INCUBACIÓN CON SISTEMA DE DETECCIÓN

La reacción primaria Antígeno-Anticuerpo, es un proceso no visible; por lo tanto, para visualizarla, es necesario utilizar una “cadena” de antisueros o “sistemas de detección”.

En la actualidad existen una gran variedad de marcas comerciales con diferentes presentaciones (mayor o menor cantidad de determinaciones, listos para usar o concentrados, monovalentes, polivalentes, etc.)

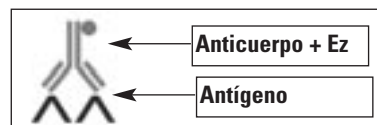
La sensibilidad de cada uno de ellos depende del complejo de detección que utilizan.

A continuación veremos los métodos de detección desde los utilizados inicialmente hasta las últimas tecnologías diseñadas.

METODO DIRECTO

Consiste en la incubación del anticuerpo primario unido a la molécula de enzima trazadora. Es uno de los primeros métodos que se utilizaron, la técnica es muy rápida, sin embargo no es lo suficientemente sensible para las exigencias actuales.

Ej.: Inmunofluorescencia (utilizada para riñón y piel) pero si es necesario un aumento en la especificidad o sensibilidad de la reacción, se utilizan métodos indirectos.



METODO INDIRECTO

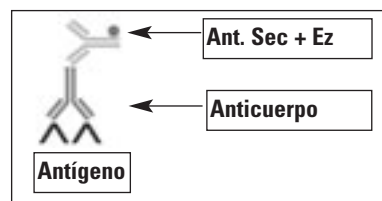
El anticuerpo secundario debe dirigirse contra las inmunoglobulinas del animal del anticuerpo primario. En este caso, la enzima está conjugada al segundo anticuerpo.

Si se desea aumentar la sensibilidad, podemos hacer otra incubación con anticuerpo secundario y luego revelar.

Este método es un poco más sensible respecto al directo

El procedimiento técnico consta de:

1. Incubación con anticuerpo primario
2. Incubación con anticuerpo secundario conjugado con la enzima
3. Revelado de la enzima



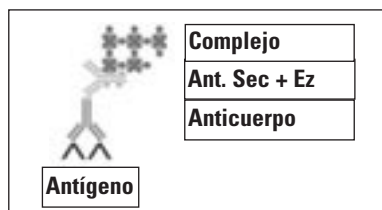
METODO ABC (AVIDINA-BIOTINA-COMPLEJO PEROXIDASA).

La avidina y la biotina, tienen gran afinidad y al unirse forman un “enlace irreversible”.

Se utilizará un Ac.secundario biotinilado donde se unirá el complejo dejando tres sitios de Enzima libres

Resumidamente, el procedimiento técnico consta de:

1. Incubación con anticuerpo primario o específico.
2. Incubación con anticuerpo secundario biotinilado (conjugado con biotina).
3. Incubación con el complejo ABC.
4. **Revelado** de la enzima.

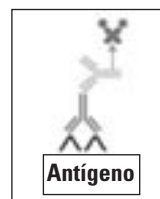


METODO STREPTAVIDINA -BIOTINA-PEROXIDASA

Modificación del ABC. Se utiliza “Streptavidina” (reemplazando a la avidina) la que tiene gran afinidad con la biotina y las enzimas.

La streptavidina, se unirá a la biotina del segundo anticuerpo, dejando expuestas las enzimas a través de las cuales visualizaremos la reacción primaria.

Los pasos para la realización de la técnica son los mismos que con el método ABC, sólo cambia el tipo de complejo.



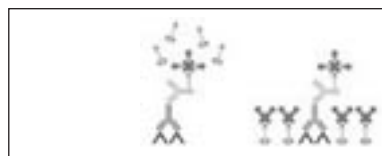
METODO CON AMPLIFICACIÓN CATALIZADA DE SEÑAL (CSA)

Este sistema de detección utiliza un reactivo de amplificación que contiene biotiniltiramida (sustrato fenólico), que es catalizado por la peroxidasa unida al complejo streptavidina-biotina para formar fenoles biotinilados insolubles.

Este sistema es muy sensible (entre 10 y 1000 veces), sin perder la especificidad. En algunos casos, permite realizar diluciones altísimas de los anticuerpos. Es posible detectar muy pequeñas cantidades de antígenos.

El procedimiento técnico tiene básicamente los siguientes pasos:

1. Incubación con anticuerpo primario.
2. Incubación con anticuerpo secundario biotinilado.
3. Incubación con complejo Streptavidina-Biotina.
4. Reactivo de amplificación (la biotiniltiramida “precipita” sobre el complejo anterior dando como resultado una gran cantidad de moléculas de biotina que se unirán al próximo complejo).
5. Incubación con complejo Streptavidina –Peroxidasa
6. **Revelado**



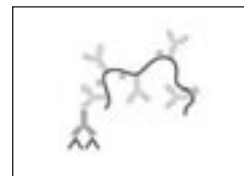
TECNOLOGÍA DE POLÍMERO

Permite incrementar la sensibilidad y reducir la cantidad de pasos en el procedimiento técnico.

El polímero está constituido por una molécula inerte de Dextran a modo de columna vertebral, con 70 moléculas de enzima (peroxidasa o fosfatasa alcalina), y totalmente libre de biotina.

El anticuerpo secundario está unido a la molécula de Dextran-enzima, por lo cual, en solo dos pasos, podemos revelar la reacción primaria antígeno-anticuerpo

Este sistema es altamente sensible y nos permite en algunos casos, trabajar con diluciones hasta 20 veces mayores que lo habitual, aunque siempre la dilución óptima de trabajo estará dada de acuerdo a los resultados de la titulación del anticuerpo que realice cada laboratorio.

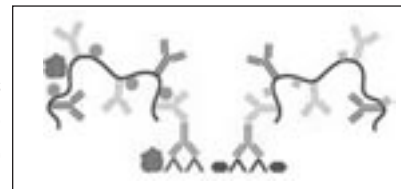


MÉTODO DE DOBLE INMUNOMARCACIÓN

Permite la detección de dos antígenos distintos en un mismo corte histológico

Puede realizarse por inmunofluorescencia → sin detalle morfológico

Son métodos inmunoenzimáticos que nos permitirán trabajar con tejidos fijados e incluidos en parafina, donde además de observar la histoarquitectura, podremos visualizar la relación topográfica entre dos antígenos o para evaluar porcentajes de poblaciones linfocitarias como pueden ser ejemplos los linfomas o los trasplantes.



En primera instancia se realiza el procedimiento de inmunohistoquímica de rutina. En el caso que se determine la necesidad de una doble marcación, debemos tener en cuenta ciertos parámetros:

- Elección de la combinación de Anticuerpos: de acuerdo a los sistemas de detección que utilizaremos y si requieren rescate antigénico por calor o digestión enzimática.
- Orden de los anticuerpos: en primer lugar se marcará con DAB el antígeno preponderante. En caso de que haya porcentajes similares de antígenos, será necesario probar una primera combinación y realizar una segunda prueba invirtiendo el orden de los anticuerpos para evaluar cual es la combinación óptima para su visualización.
- Sistemas de Detección: en el caso de tener que detectar bajas cantidades de antígenos deberemos utilizar un sistema altamente sensible. El mismo criterio debe utilizarse para la elección de las enzimas trazadoras para los diferentes sustratos y/o cromógenos.
- Podemos utilizar tanto los Kits comerciales diseñados para este procedimiento, como los reactivos que tengamos a nuestro alcance. La ventaja de trabajar con los kits radica en la estandarización del protocolo con tiempos cortos de incubación y en la concentración de los reactivos.

PROBLEMA	CAUSA PROBABLE	SOLUCIÓN
NO HAY MARCACIÓN	• Reactivos no usados en el orden correcto u omisión de alguno • Preparación incorrecta del cromógeno • Azida Sódica en el buffer	• Revisión de la forma de utilización de los reactivos • Preparar nuevo sustrato-cromógeno • Usar nuevo buffer libre de Azida Sodica
MARCACIÓN DÉBIL	• Dilución muy alta • Poco tiempo de incubación de los reactivos • Solución de cromógeno vieja • Tejidos sobrefijados	• Nueva titulación del anticuerpo. • Revisión de los tiempos de incubación. • Preparar nuevo cromógeno. • Revisar fijadores y tiempos de fijación
COLORACIÓN DE FONDO INESPECÍFICA	• Tejido sin bloqueo de sustancias endógenas • Anticuerpo primario muy concentrado • Lavados deficientes • Los cortes se secaron	• Bloquear sustancias endógenas: peroxidasa, biotina, fosfatasa • Nueva titulación del anticuerpo • Lavados abundantes • Evitar el secado

4. REVELADO. ENZIMAS

El revelado es el proceso mediante el cual se pone de manifiesto el lugar de la reacción antígeno – anticuerpo.

Los métodos inmunoenzimáticos utilizan reacciones enzima-sustrato para convertir cromógenos incoloros en productos coloreados.

Las enzimas son catalizadores proteicos y su eficiencia catalítica es extremadamente alta. Algunas enzimas son específicas solo para un sustrato, mientras otras pueden atacar muchos sustratos relacionados.

En una clasificación muy rápida de las enzimas, encontraríamos:

- Enzimas hidrolíticas (estearasas, proteasas)
- Fosforilasas
- Enzimas oxidoreductivas (dehidrogenasas, oxidasas, peroxidasas)
- Enzimas de transferencia, decarboxilasas y otras.

La actividad enzimática depende de diversas variables tales como las concentraciones de enzima y sustrato, pH, concentración de sales en el buffer, temperatura y luz.

Para seleccionar la enzima adecuada en una inmunohistoquímica debemos considerar algunos parámetros:

- a) La enzima debe ser altamente purificada.
- b) La conjugación con un anticuerpo o avidina, no deberá inhibir la actividad de la enzima aunque si pueda disminuirla.
- c) La enzima conjugada debe ser estable en solución.
- d) La actividad endógena de la enzima solo debe interferir minimamente con la coloración específica del antígeno.
- e) Los productos de la reacción enzimática deben ser fácilmente detectables y estables.

Las enzimas mas utilizadas en inmunohistoquímica son:

Peroxidasa de Rábano (HRP): aislada de la planta del rábano picante. Tiene hematina (grupo con contenido de hierro) como sitio activo. En solución es de color marrón. Puede ser inhibida por exceso de sustrato. El exceso de peróxido de hidrógeno y la ausencia de un donante de electrones, bloquea la actividad endógena de la peroxidasa.

Fosfatasa Alcalina Intestinal de Ternero: La fosfatasa alcalina no fue usada intensivamente en inmunohistoquímica hasta la publicación del método fosfatasa alcalina-anti-fosfatasa alcalina. La ventaja comparada con el método PAP es la "no" interferencia de la actividad de la peroxidasa endógena.

CROMÓGENOS

Son las sustancias que dan color a la reacción enzimática, de acuerdo a la enzima utilizada, seleccionaremos el cromógeno adecuado, por ej.:

Con Peroxidasa	DAB (3,3'-Diaminobenzidina)	Marrón
	AEC (3-Amino-9-Etilcarbazon)	Marrón-Rojizo
	Montaje permanente	
Con Fosfatasa Alcalina	Fast Red	Rojo brillante
	New Fuchsin	Rojo
	Medio de montaje acuoso	

Al momento de elegir el cromógeno debemos tener en cuenta el medio de montaje que vamos a utilizar (permanente o acuoso).

REACCIÓN DE OXIDO-REDUCCIÓN

MÉTODO DE REVELADO

Vamos a tomar como ejemplo la enzima peroxidasa para explicar como se produce la reacción de color.

Dijimos que cada enzima tiene parámetros básicos a considerar, en este caso son:

- sustrato específico= H₂O₂ (agua oxigenada)
- pH 7.4
- temperatura=ambiente
- tiempo de exposición (control microscópico).

El último anticuerpo con el que incubamos, posee la enzima a detectar. En una solución buffer, disolvemos 3-3' DAB(di amino benzidina) y agregamos agua oxigenada. La enzima peroxidasa actúa sobre el agua oxigenada (H₂O₂) que es su sustrato específico, transformándola en H₂O y liberando un H (Hidrógeno). Este H es captado por el DAB que se transforma de oxidado a reducido precipitando en el lugar donde está la enzima, dando un color marrón, haciendo visible de este modo el sitio donde se produjo la reacción primaria antígeno anticuerpo, demostrando de esta forma la presencia del antígeno.

BIBLIOGRAFÍA

- Technical Immunohistochemistry: Achieving Reliability and reproducibility of Immunostains. Rodney T.Miller, M.D, Director of Immunohistochemistry ProPath Lab,Inc(2001).
- Hand out Curso de Inmunohistoquímica Básica. Hospital Garrahan. Mayo 2002. HT: Cristina Chaves, Serv. de Patol. del Hosp. Ramos Mejía.
- www.dakousa.com (Dako Envision Doublestain System)
- www.zymed.com
- Simultaneous Double Immunoenzymatic labeling: A New Procedure for the Histopathologic Routine. Pascal Chaubert, MD; Marie-Martine Bertolet; Magali Correvo; Fred Bosman, MD. Institut Universitaire de Pathologie, Lausanne, Switzerland. Modern Pathology vol 10,N°6,P585.1997.
- Handbook Immunochemical Staining Method. 3rd Edition. Thomas Boenisch, M.S. www.dakousa.com
- Laboratorio de Anatomía Patológica. R. García del Moral

Referencias

HT Norma Pozzo / HT. Sandra Camarero / Servicio de Patología del Hospital "J. P. Garrahan" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patologia@garrahan.gov.ar

PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

DEFINICIONES Y CONCEPTOS, RECONVERSIÓN ANTIGÉNICA, PROTOCOLO BÁSICO DE INMUNOMARCACIÓN

Ht. Cristina Chaves

INTRODUCCIÓN

Las técnicas de inmunohistoquímica se basan en la aplicación de reacciones **antígeno-anticuerpo**, que pueden ser únicas o secuenciales. Son altamente sensibles y específicas y ponen en evidencia a través de **un marcador o trazador acoplado a un anticuerpo u otras sustancias**, gran variedad de componentes celulares o tisulares.

Estos componentes son generalmente **proteínas**. Pueden demostrarse también polipéptidos, grupos prostéticos como hidratos de carbono en glicoproteínas, o tipos de lípidos como gangliósidos o cerebrósidos.

Por lo tanto, con estas técnicas, es posible demostrar una gran variedad de proteínas, sean simples o conjugadas, las cuales, como veremos se comportan como antígenos frente a un anticuerpo determinado y específico, a través de un marcador que **hace visible la reacción antígeno-anticuerpo**.

Para entender los fundamentos de las técnicas de inmunohistoquímica, es preciso conocer:

- El antígeno
- El anticuerpo
- Los marcadores o trazadores
- Los sistemas de detección
- Las reacciones de óxido-reducción.

EL ANTÍGENO

Es toda aquella sustancia que, inoculada a un animal, es capaz de generar una respuesta inmunológica, con expresión humoral (síntesis de anticuerpos o inmunoglobulinas) y/o celular (células inmunológicamente competentes). **Los haptenos**, son sustancias capaces de reaccionar con un anticuerpo, **pero no de inducir su síntesis**.

Veremos entonces, que los antígenos que deseamos demostrar son generalmente proteínas. Estas proteínas, por métodos de obtención de **antisueros** (inmunoglobulinas en solución, obtenidas a través de la inmunización de animales de experimentación contra proteínas u otras sustancias humanas), pueden ser visualizadas como **antígenos celulares** y deben ser conservadas adecuadamente, sea por métodos de criofijación, o por métodos de fijación química, para que la técnica inmunohistoquímica resulte óptima.

Veremos también, que la reacción antígeno-anticuerpo es una **reacción primaria**, proceso no visible que puede ser demostrado a través de los llamados marcadores o trazadores.

El **marcado o trazado** que permite su visualización, puede realizarse a través de distintos marcadores:

- **FLUOROCROMOS:** Técnicas de inmunofluorescencia.
- **ENZIMAS:** Técnicas inmunoenzimáticas.
- **ISÓTOPOS RADIOACTIVOS:** Técnicas de radioinmunoensayo.
- **IONES METÁLICOS EN FORMA COLOIDAL:** 1. Técnicas de inmuno-oro.
2. Técnicas de oro coloidal-plata.

Las enzimas marcadoras más utilizadas son:

- **La enzima peroxidasa (peroxidasa de rábano):** esta enzima es la más utilizada, conjugada con otras sustancias, generalmente formando un complejo, da lugar a la marcación del amplio espectro de antígenos que pueden ser demostrados por las técnicas de inmunoperoxidasa.
- La enzima fosfatasa alcalina
- La enzima glucosa 1 oxidasa.

FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Fueron introducidas por Cons y colaboradores en 1941. La fluorescencia es una forma de luminiscencia o sea una emisión de luz que se produce a partir de una fuente de energía no térmica.

La fluorescencia primaria o autofluorescencia, es aquella que presentan determinadas sustancias en forma espontánea (ej: queratina, lámina elástica de las arterias, etc).

La fluorescencia secundaria, es la que se obtiene mediante coloración histoquímica con moléculas fluorescentes denominadas fluorocromos, o uniendo fluorocromos a anticuerpos dirigidos contra antígenos tisulares: éste es el principio básico de las técnicas de Inmunofluorescencia.

FLUOROCROMOS

Son sustancias químicas que tienen la propiedad de absorber fotones de alta energía procedentes de la radiación ultravioleta. Esto provoca una redistribución electrónica de las moléculas fluorescentes, que se pone de manifiesto por la emisión de una radiación luminosa de longitud de onda distinta, dentro del espectro visible.

Los fluorocromos más utilizados en estas técnicas son la fluoresceína, la rodamina y la ficoeritrina. La fluoresceína se usa en forma de isotiocianato de fluoresceína (FITC), absorbe luz azul y emite fluorescencia verde manzana. La rodamina se emplea en forma de isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), absorbe luz verde y emite fluorescencia rojo – anaranjada. La ficoeritrina (PCE), absorbe luz azul y produce fluorescencia roja.

Un fluorocromo se considera óptimo para estas técnicas si reúne las siguientes condiciones:

- Mínima interferencia en la reacción antígeno–anticuerpo.
- Máxima estabilidad para las condiciones de almacenamiento.
- Disponibilidad sencilla en su forma purificada.
- Máximo de emisión comprendido dentro del espectro de luz visible.
- La longitud de onda de la luz excitada por un lado y la de la luz emitida por el fluorocromo por el otro, deben ser lo suficientemente distantes como para que puedan diferenciarse fácilmente.
- El fluorocromo debe descomponerse lo menos posible con la exposición de la luz.

De los mencionados, el isotiocianato de fluoresceína es el que reúne las mayores ventajas.

Los fluorocromos pueden unirse en forma covalente a los anticuerpos sin alterar la capacidad de éstos últimos para unirse a sus correspondientes antígenos. Se pueden utilizar dos anticuerpos marcados con distintos fluorocromos para la identificación de dos antígenos distintos en técnicas de marcación doble.

El modo de unión a anticuerpos depende de cada fluorocromo. Los isotiocianatos de fluoresceína y de rodamina se ligan mediante enlace covalente con los grupos amino y carboxilo de las proteínas. Esta unión tiene lugar a pH alcalino. Para resultados óptimos debe existir entre 0.5 a 2 moléculas de fluorocromo por molécula de anticuerpo.

TIPOS DE TÉCNICAS DE INMUNOFLORESCENCIA

Las técnicas de Inmunofluorescencia se realizan casi siempre sobre tejido congelado. Dependiendo del tejido y órgano existen varios procedimientos de congelado que van desde el congelado lento al rápido, en temperaturas que oscilan entre -20°C a -180°C . (Para mayor información sobre técnicas de criofijación y criopreservación, ver resumen del tema de éste mismo curso).

De optar por tejidos fijados por fijadores químicos, se aplicarán técnicas adecuadas (de Sainte- Marie por ejemplo) y aún así pueden presentar numerosos inconvenientes debidos al aumento de fenómenos de autofluorescencia y el bloqueo de gran cantidad de determinantes antigénicos provocado por agentes fijadores.

En la **técnica de Inmunofluorescencia directa** se utiliza un anticuerpo específico dirigido a un antígeno que se desea detectar, conjugado a un fluorocromo.

En la **técnica de Inmunofluorescencia indirecta** se incuba en un primer paso con el anticuerpo específico no marcado y en un segundo paso, un anticuerpo marcado con el fluorocromo, que reacciona en forma específica con el anticuerpo primario. La técnica indirecta es más sensible y resulta muy útil para detectar en el suero del paciente determinados tipos de anticuerpos en enfermedades autoinmunes, tales como aquellos que son capaces de reaccionar con antígenos presentes en los propios tejidos. Además la técnica indirecta permite utilizar un único anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo para varios antisueros primarios, siempre que los primarios procedan del animal frente al cual van dirigidas las inmunoglobulinas conjugadas del secundario.

La utilidad diagnóstica en histopatología de estas técnicas se desarrolla en la evaluación de depósitos de inmunoglobulinas y otras proteínas básicamente en enfermedades renales, enfermedades ampollares de la piel, depósitos de inmunoglobulinas u otras proteínas en enfermedades autoinmunes, depósitos en enfermedades de nervio periférico y músculo, donde resultan más sensibles que las técnicas inmunoenzimáticas.

La observación microscópica requiere de microscopios de fluorescencia: de transmisión o de epiluminiscencia.

TÉCNICAS DE INMUNOPEROXIDASA

Se denominan así, a un conjunto de métodos de inmunomarcación que tienen en común la enzima peroxidasa. Ésta puede hallarse acoplada a un anticuerpo (a una o varias inmunoglobulinas), o a otras sustancias (generalmente proteicas) y su revelado a través de una reacción de óxido-reducción, permite la localización del antígeno contra el cual va dirigido un anticuerpo. Estos métodos se han aplicado a

la microscopía óptica fundamentalmente y también a la electrónica. Son técnicas sumamente sensibles, lo que permite localizar pequeñas cantidades de antígeno y pueden ser aplicadas a tejidos incluidos en parafina.

DESNATURALIZACION DE LAS PROTEÍNAS

EFFECTOS DEL PROCESADO HISTOLÓGICO SOBRE LOS ANTÍGENOS

En toda técnica de inmunomarcación, es de vital importancia, preservar el antígeno a demostrar, adecuadamente.

Los métodos de fijación y preservación del tejido o material en estudio, dependerán de la labilidad del antígeno. Actualmente existen variados métodos de lo que se denomina **“recuperación antigénica”**, además de contar con sistemas de detección altamente sensibles, capaces de demostrar antígenos celulares, que hayan sido sometidos a la fijación, procesado histológico e inclusión en parafina rutinarios. En comparación con el espectro de antígenos que hoy pueden demostrarse, son pocos los que requieren de métodos de criofijación.

Para comprender el comportamiento biológico de las proteínas, que representan los antígenos que se desea demostrar en las técnicas de inmunohistoquímica, es necesario conocer sus estructuras.

Las **proteínas**, son moléculas que poseen:

Una estructura primaria, dada por la cantidad, tipo y secuencia amino-acídica y a la ubicación de los enlaces disulfuro.

Una relación espacial, dada por las relaciones de los aminoácidos colocados junto a una estructura primaria, **que determinan la estructura secundaria**.

El **ordenamiento global y la interrelación de las diversas regiones y de los residuos aminoacídicos**, conforman **su estructura terciaria**.

La estructura cuaternaria, está constituida por dos o más cadenas polipeptídicas, unidas por fuerzas distintas a los enlaces covalentes. Por ejemplo, enlaces de hidrógeno, electrostáticos o salinos.

Por acción de diversos agentes, **las proteínas pueden alterarse y perder su estructura terciaria y aún la secundaria, quedando solamente la cadena polipeptídica**.

Este fenómeno se denomina **desnaturalización**; por esta causa, la proteína pierde también su actividad biológica. El fenómeno en algunos casos es reversible y en otros irreversible.

Algunos factores que desnaturalizan las proteínas son:

a. físicos: por ejemplo el calor por arriba de 37°, las radiaciones, los ultrasonidos, etcétera;

b. químicos: por la acción de ciertos reactivos como:

- ácidos fuertes, que las coagulan irreversiblemente, como el nítrico, el tricloroacético y el pícrico.
- pH extremos, menores de 3 o mayores que 10
- disolventes orgánicos, como los alcoholes, acetona, intermediarios
- sales de metales pesados, con las que las proteínas forman sales complejas.
- sales neutras, como el sulfato de amonio, de sodio, etc.

En la fijación, procesado e inclusión de todo material para observación microscópica, por los métodos histológicos habituales, se cumplen varios o todos los factores desnaturalizadores mencionados.

Las proteínas, son moléculas con una **conformación espacial determinada**, que puede perderse parcialmente bajo los efectos de una fijación química o física. Por lo tanto si queremos demostrar, por ejemplo, determinadas actividades enzimáticas por métodos histoquímico-enzimáticos, o proteínas que no resistan una fijación química ni factores físicos como el calor, el mejor procedimiento donde sus actividades y conformación permanecen intactas, es la criofijación. También se procede por éste método de congelado de las proteínas cuando se desea aplicar técnicas de Inmunofluorescencia.

FACTORES QUE PUEDEN INFLUENCIAR EN EL RESULTADO DE UNA INMUNOMARCACIÓN

- a. La fijación
- b. El procesamiento de la muestra
- c. La naturaleza del antígeno
- d. Su concentración en la muestra
- e. Su distribución (nuclear, citoplasmática, relacionado a membranas, sean citoplasmáticas o nucleares, o extracelular).

FIJADORES

El fijador, no sólo debe encontrarse en forma rápida y disponible, de fácil preparación, sino además preservar la integridad antigénica, limitando la extracción, difusión o remoción del antígeno procesado.

También debe brindar una buena preservación de los detalles morfológicos y permitir una adecuada penetración en el tejido de los reactivos, sin interferir en las subsecuentes reacciones antígeno-anticuerpo.

De la variedad de fijadores que utilizamos en la histología, indudablemente es el **formaldehído**, el que reúne todas las anteriores condiciones. Por lo tanto, al elegir un fijador debemos tener en cuenta, que si hemos de usar mezclas fijadoras, preferentemente, deben contener en su composición formol, además de un pH, que no provoque una desnaturalización irreversible, o que directamente **destruya un antígeno determinado**. Técnicas efectuadas por fijación a temperaturas que superen los 40°C o más, combinando fijación química y física por calor, pueden llevar a la destrucción antigénica, proceso que, por supuesto es **irreversible**.⁽¹⁾

EL PROCESADO DEL TEJIDO

En general, la deshidratación e inclusión en parafina, sigue los mismos parámetros en cuanto a tiempos y temperatura para la correcta preservación antigénica que los habituales en todo procedimiento de procesado histológico. Tiempos cortos combinados con cambios frecuentes de solventes e intermediarios, cambios de parafina y calor que no exceda los 60°C – 64 °C, son ideales para conservar la morfología y la antigenicidad.

Aunque sobradamente conocidos, estos conceptos son, sin lugar a dudas, los más importantes, cuando se desean buenos resultados de una inmunomarcación. En nuestra experiencia, la fijación, deshidratación e inclusión adecuadas, constituyen la base fundamental de una buena técnica inmunohistoquímica. Tengamos en cuenta que, si una marcación no sale, por defectos intrínsecos de la técnica, podremos repetirla, contando con un nuevo corte. Pero, si por alguna razón en el procesado histológico, afectamos irreversiblemente un antígeno, no podremos demostrarlo de ninguna manera.

DETERMINANTES ANTIGÉNICOS

EL ANTÍGENO CON RELACIÓN A LAS TÉCNICAS DE INMUNOHISTOQUÍMICA

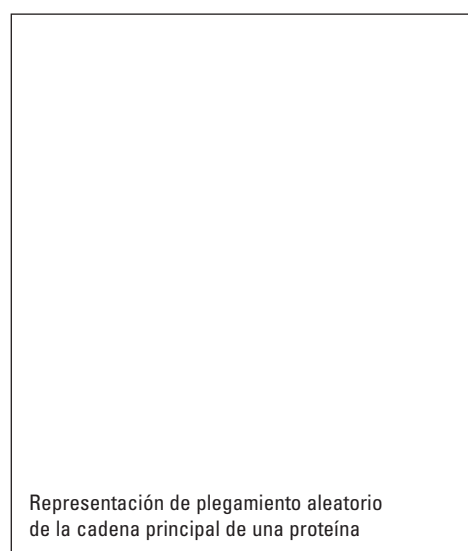
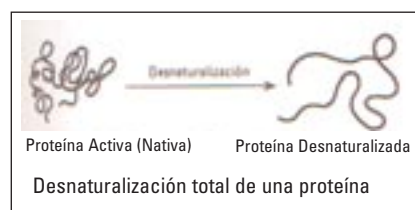
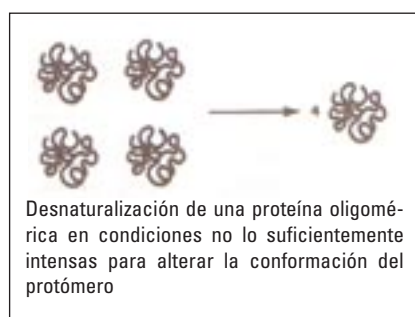
Definición de determinantes antigénicos o epitopes

Se denominan así, a partes de la molécula del antígeno, responsables de la unión antígeno-anticuerpo. La molécula del antígeno, no presenta una antigenicidad homogénea, sino que posee pequeñas partes involucradas en la especificidad de la reacción. El número de **determinantes antigénicos** o epitopes varía según el antígeno y está en relación con su estructura química y espacial. Ya hemos tratado los factores que pueden provocar el proceso de desnaturalización de las proteínas, producido por ejemplo por un fijador químico, y el procesado e inclusión de un tejido.

Las fuerzas comparativamente débiles responsables de mantener las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas, son interrumpidas con relativa facilidad, por una diversidad de manipulaciones, con la correspondiente pérdida de actividad biológica. En forma física, la desnaturalización puede observarse como una conformación aleatoria de una cadena polipeptídica sin que se afecte su estructura primaria. Es importante resaltar que, si bien en la fijación una proteína pierde su conformación espacial, de no existir destrucción parcial o total de la cadena, la estructura primaria se conserva, es decir el número, tipo y secuencia aminoacídica. También suele conservarse su estructura secundaria, salvo que el excesivo calor o los pH extremos, la desnaturalicen irreversiblemente.

Lo que con frecuencia puede ocurrir, es que la relación tridimensional del antígeno proteico, se vea alterado con grados variables según las proteínas que lo constituyen, adoptando un arrollamiento al azar. Entonces, estas partes específicas de la molécula responsables de la unión con el anticuerpo, pueden quedar **"ocultas"** a las zonas de unión o paratopes del anticuerpo.

Actualmente existen diversos métodos de lo que se denomina **reconversión antigénica**, que tienen por objeto, precisamente, hacer accesible al anticuerpo, esas partes específicas, **los epitopes**, que han quedado **"enmascarados"**, por los efectos de la fijación.



(1) NdR: con respecto a la fijación química de antígenos celulares véase el Módulo 1, "Fijación y mezclas Fijadoras" págs. 5-49.

RECONVERSIÓN ANTIGÉNICA

DISTINTOS TIPOS DE RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA – CONSIDERACIONES GENERALES

Como ya hemos visto, mientras que algunos determinantes antigénicos (epitopes), resisten en forma suficiente la fijación e inclusión, reaccionando fácilmente con los anticuerpos específicos, otros determinantes antigénicos, pueden perder su reactividad inmunológica después de la fijación, procesado e inclusión y presentar cierta dificultad para unirse a sus anticuerpos específicos. Con las técnicas de reconversión antigénica puede revertirse los efectos causados por el fijador, además de contar con sistemas de detección altamente sensibles, capaces de demostrar antígenos celulares que hayan sido sometidos a la fijación, procesado histológico e inclusión en parafina.

En el caso de la fijación en formol, no se altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la cuaternaria y terciaria. En muchos casos en donde el epítopo es conformacional (3D), altera la región antigénica o la enmascara. En los casos donde el epítopo es lineal (secuencia lineal de aminoácidos), puede enmascarar la región antigénica. Por tanto en ambos casos, se necesita algún tipo de reconversión antigénica.

Las técnicas de recuperación antigénica pueden dividirse en dos grupos: los que requieren altas temperaturas y los que no las requieren.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA SIN CALOR

Soluciones alcalinas

La exposición de tejidos embebidos en celoidina a soluciones fuertemente alcalinas (NaOH–metanol 1:5 por 30 min), produce un aumento de la inmunoreactividad. También se demostró que existe una relación inversa entre la concentración del alcali © y el tiempo (t). Por ejemplo: a mayor concentración de hidróxido de sodio menor el tiempo necesario para obtener el resultado deseado. Sin embargo las altas concentraciones de álcali tienen efectos nocivos destruyendo la morfología o despegando el tejido del portaobjeto.

Técnicas de desenmascarado por el uso de enzimas proteolíticas

El uso de enzimas proteolíticas, tiene por objeto **“cortar”**, por decirlo de alguna manera, la cadena polipeptídica enrollada aleatoriamente por los efectos del *cross-linking* de la fijación, en varios puntos, permitiendo así, la accesibilidad de los determinantes antigénicos a su anticuerpo específico. Este efecto de **“cross- linking o uniones cruzadas o enlaces en cruz”**, está provocado por el tipo de enlace metileno que establecen ciertos fijadores con las proteínas actuando por reticulación (el más común y frecuentemente usado el formaldehído).

Como paso previo a la inmunomarcación, se utilizan entonces una variedad de enzimas, entre ellas: Proteinasa K, Tripsina, Pepsina, Proteasas de varios tipos, etc., (ya sea en su forma comercial prediluída o en su extracción purificada, generalmente en polvo). Estas enzimas actúan sobre un sustrato determinado (en éste caso sobre un antígeno determinado), con temperatura, pH y tiempo de exposición determinados para cada una de ellas, por un lado, y además por los parámetros de fijación y procesamiento utilizado para el antígeno a demostrar. Es decir cada enzima actúa sobre parámetros propios, que debemos conocer, antes de utilizarla.

El efecto proteolítico de estas enzimas, ayuda al desenmascarado de epítopes, pero también pueden producir **“efectos de sobredigestión”**, con pérdida de la morfología. Por lo tanto es necesario la utilización de controles positivos, la optimización de la técnica, que, según varios autores depende del tiempo de fijación de la muestra, y probar distintos tiempos de exposición además de cierto y acotado margen de temperatura, ya que por lo general las enzimas pueden desnaturalizarse y perder su capacidad biológica, por arriba de los 40°C.

Técnicas de rescate antigénico por el uso del calor, presión, efectos de ondas electromagnéticas en horno de microondas, o sus combinaciones (HIER /RAC)

Los procedimientos más utilizados en la recuperación por calor son:

- Horno de microondas
- Olla a presión
- Baño de agua térmico
- Vaporiera
- Olla a presión en microondas
- Autoclave
- Combinación de métodos

En estos casos, los distintos métodos responsables de la recuperación antigénica, tienen el mismo efecto que la predigestión enzimática, con la ventaja de que no existen efectos de sobredigestión, aunque pueden producirse efectos de contracción del tejido. Reconstituyen la inmunoreactividad perdida por efectos de fijadores químicos, pH extremo, utilización de sales metálicas pesadas, reestablecimiento de puentes hidrofóbicos, etcétera.

La recuperación de epítopes inducidos por el calor (HIER) es una denominación de distintos procedimientos técnicos ampliamente difundido.

Existen controversias respecto al fundamento por el que se produce el rescate antigénico por estos métodos según distintos autores. Hasta hoy, la utilización de los mismos sigue en la práctica desarrollándose en forma que calificaríamos de empírica, con basamentos científicos distintos. Sin embargo son utilizados, previos a la técnica intrínseca de inmunomarcación, con buenos resultados porque éste tipo de recuperación es fácilmente estandarizable. Deben tenerse en cuenta los siguientes parámetros:

1. La relación entre la temperatura (T) y el tiempo (t) es inversa:

Esto quiere decir que a mayor temperatura, menor es el tiempo necesario para obtener buenos resultados. Temperaturas por debajo de 80°C no son significativamente beneficiosas, salvo en los casos en que se desea un reestablecimiento de puentes hidrofóbicos sobre extendidos citológicos fijados en alcohol 96°. Temperaturas entre 90°C a 120°C son óptimas.

Un trabajo reciente demostró una intensa inmunotinción con el siguiente protocolo: 100°C x 20min; 90°C x 30 min; 80°C x 50 min; 70°C x 10 horas.

2. El pH de la solución de recuperación es muy importante para algunos antígenos:

Algunos marcadores como el L26, PCNA, AE1 – AE3, EMA y NSE, no parecen ser afectados por el pH de la solución de recuperación. Otros antígenos como el MIB 1 y el Er, exhiben una disminución de la tinción a pH neutros y una fuerte tinción a pH muy ácidos o muy alcalinos. Otros como el HMB 45 muestran una débil reacción a bajo pH, pero intensa a pH alto. Buffers de bajo pH parecen ser mejores para ciertos antígenos nucleares, como la proteína retinoblastoma y receptores andrógenos. En éstos casos los buffers acetato (pH 1.0 – 2.0), ácido acético (pH 2.0) o el buffer glicina (pH 3.6) aparentemente son superiores al buffer citrato.

EDTA: Un trabajo reciente de Morgan y col, sugiere que los iones de Calcio unido a las proteínas inhiben la inmunoreactividad. Aparentemente los iones de calcio alterarían la conformación del epítopo. Este efecto puede ser revertido mediante el uso de EDTA, un quelante del calcio.

3. Se desconoce la función y la importancia de la composición de los buffers en la recuperación antigénica:

En algunos casos se demostró que la inmunotinción se mejora calentando los preparados en agua destilada, lo que sugiere que la composición química en éstas circunstancias no es importante. Cuando se reportó por primera vez el uso de calor en la recuperación antigénica, se recomendó el uso de soluciones buffers conteniendo sales de zinc (sulfato) o plomo (citrato). Sin embargo hoy es aceptado que el uso de éstas sales tóxicas no ofrece ninguna ventaja sobre las soluciones de buffers simples. Además numerosos laboratorios, han adoptado el uso de buffer citrato de sodio, aunque algunos autores refieran que ésta solución buffer es menos efectiva que los buffers acetato, Tris – HCl o glicina – HCl.

4. La elección de la fuente de calor no suele ser significativa:

La forma de obtención y mantenimiento de la temperatura requerida para el rescate antigénico suele depender de la conveniencia. El uso del microondas acelera el tiempo de calentamiento. Se necesitan 2 a 3 ciclos de calor y enfriamiento. Además existen numerosos trabajos que indican que el microondas produce artefactos de técnica. Con un microondas hogareño, es importante determinar y calibrar el tiempo necesario para alcanzar la temperatura necesaria. Es más efectiva la realización de varios ciclos de calentamiento que extender el calentamiento en un solo ciclo.

Si se utiliza una olla a presión, una excesiva incubación de los preparados a alta temperatura y presión, altera la morfología, particularmente en la piel, en donde el colágeno y la elastina aparecen fragmentados. Los mismos efectos suelen ocurrir en la utilización del autoclave. A pesar de lo expuesto referente a que la fuente no suele ser significativa en los resultados, en nuestra experiencia los mejores resultados morfológicos se obtienen optando por calentamiento en vaporiera o baño térmico, donde la exposición térmica no supera los 99°C, y la cámara de calor está continuamente humedecida por vapores acuosos. También se ha demostrado que para algunos antígenos como el CD23, CD30, CD15 o Bcl - 1, éstas forman resultan más convenientes en el incremento de la inmunoreactividad.

Algunos conceptos que explicarían los efectos sobre los epítopos de éstos métodos ampliamente desarrollados y renovados serían los siguientes:

- La diferencia existente entre los efectos del tratamiento con buffers en microondas y con la olla a presión, es que en el primero **la agitación molecular**, se produce por una radiación electromagnética, con alta frecuencia de oscilación y corta longitud de onda, mientras que en la segunda, la agitación molecular se produce por presión atmosférica. Se pueden combinar ambos efectos físicos (microondas-presión), para obtener con mejores resultados el **desenmascarado**, de algunos epítopos de difícil demostración.
- Un efecto secundario de ambos métodos, es el calor (**Taylor**), que ayuda también a la agitación molecular produciendo un proceso similar al descrito por el desenmascarado por enzimas proteolíticas (ruptura de los ligamientos cruzados o cross-linking del fijador, restauración de la conformación del epítopo, remoción de iones de calcio por distintos buffers para recuperación de epítopos). Las temperaturas en estos casos pueden llegar hasta los 120°C. Estos efectos valen también para la utilización del autoclave.
- En cuanto a la recuperación de epítopos por baño térmico (baño termostático) y la vaporiera, en estos casos, la recuperación se produce netamente por efectos de calor y vapor. La temperatura en éstos casos oscila entre 95°C a 100°C como máximo.

Métodos de recuperación antigénica en citología

En extendidos citológicos, el fijador habitual suele ser el alcohol 96°. Dado que los alcoholes fijan por deshidratación coagulando las proteínas, sin la formación de compuestos aditivos, estos son fijadores ideales para la inmunohistoquímica. Su aplicación en muestras de tejido rutinarias no se emplea, debido a su poca penetración. Los alcoholes permiten una buena penetración del anticuerpo y no bloquean los determinantes inmunoreactivos. Sin embargo producen frecuentemente cambios conformacionales. Los alcoholes precipitan a los carbohidratos y son aplicados a cortes congelados o extendidos.

La digestión proteolítica después de la fijación con alcohol es inútil y puede resultar en la destrucción del extendido o corte de tejido.

Se han usado con éxito métodos de recuperación por calor en algunos especímenes citológicos. Se ha demostrado que a través de

ciertas modificaciones, pueden utilizarse procedimientos exitosos para la recuperación de receptores de estrógeno y progesterona, Ki 67, LCA, Her2Neu y citoqueratinas, entre otros. En contraste con el material fijado en formol e incluido en parafina, el éxito de éste método no está tan relacionado al modo de fijación. Se ha propuesto que podrían reestablecerse los puentes hidrofóbicos y que la inmunoreactividad sería facilitada por un aumento en la permeabilidad de las membranas de la célula, proporcionando así acceso a antígenos celulares y nucleares previamente enmascarados. La modificación incluye la incorporación de una pequeña cantidad de detergente en la solución de recuperación y reducir la temperatura a 37°C o 40°C o reducir los tiempos de exposición a temperaturas de entre 80°C a 90°C, para mantener la morfología celular.

También se ha propuesto que la inmunoreactividad de ciertos antígenos de membrana, se potencia por medio de la exposición a solventes de lípidos como el cloroformo, ya que ciertas proteínas por ejemplo el CD57 están parcialmente enterradas en la doble capa lipídica de la membrana celular, por lo que una exposición al cloroformo contribuye al desenmascaramiento antigénico.

Buffers de recuperación antigénica por calor

Los buffers más utilizados para este tipo de procedimientos son:

1. El buffer de citrato de sodio 0.01 M pH 6, es el más usado como solución de recuperación antigénica.
2. Recientemente se han incorporado otro tipo de soluciones de rescate: Soluciones Tris-EDTA pH 9, con resultados satisfactorios por ejemplo para receptor de andrógeno, TdT, Bcl-6, tirosinasa, etc. Soluciones comerciales a pH 4 (bajo), teóricamente para algunos antígenos nucleares o soluciones comerciales a pH 10 (alto), para algunos antígenos citoplasmáticos o de membrana, por ejemplo tiroglobulina o CD30.

HORNO DE MICROONDAS

La utilización del horno de microondas es un método muy eficiente de calentamiento de soluciones acuosas.

La estandarización del procedimiento es muy importante, por ejemplo: volumen constante de la solución de recuperación antigénica, tiempo de procesamiento constante, número constante de preparados. Variaciones en estas condiciones pueden influir en los resultados obtenidos. Los elementos importantes son:

- Watt del horno de microondas
- Presencia de bandeja giratoria. El horno de microonda con bandeja giratoria otorga un calentamiento más uniforme, brindando resultados más apropiados.
- Solución de recuperación antigénica
- Número de preparados
- Tiempo de exposición
- Antígenos a ser detectados

Material requerido

- Buffer de recuperación antigénica
- Horno de microonda doméstico de 750 - 800 Watt con bandeja giratoria

Preparación tisular

Portaobjetos con adhesivo tisular o portaobjetos con carga positiva

OLLA A PRESIÓN

El calentamiento con olla a presión es mucho más uniforme que otros métodos de calentamiento. Una olla a presión con una presión operativa de 103 KPA / 15 PSI asegura una temperatura de 120° C a la máxima presión. Los elementos importantes son:

- Elección del buffer de recuperación antigénica
- Volumen del buffer de recuperación antigénica.
- Fuente de calor
- Tiempo de calentamiento
- Antígenos a ser detectados

Material requerido

- Olla a presión de acero inoxidable
- Plato térmico eléctrico u hornalla de gas
- Canastillas portaobjeto metálicas o de plástico resistente al calor o coplin de plástico o metal
- Buffer de recuperación antigénica

Preparación tisular

Portaobjetos con adhesivo tisular o portaobjetos con carga positiva

BAÑO DE AGUA TÉRMICO - VAPORIERA

Una de las fuentes de calentamiento de soluciones de recuperación antigénica más conveniente es el baño de agua tradicional o una vaporiera de vegetales con capacidad de alcanzar temperaturas de hasta 100°C (baño termostático). Su principal ventaja es la temperatura controlada del baño de agua y la emisión de vapores humectantes constantes. Los elementos importantes son:

- Elección del buffer de recuperación antigénica
- El baño de agua térmico no debe superar los 94 a 99°C (punto previo a la ebullición)
- Vaporiera graduada a temperatura que no supere los 99°C
- Tiempo de calentamiento
- Antígenos a ser detectados

Material requerido

- Baño de agua térmico o vaporiera de vegetales
- Coplin de plástico
- Solución de buffer de recuperación antigénica

Preparación tisular

Portaobjetos con adhesivo tisular o portaobjeto con carga positiva.

PRETRATAMIENTO PROTEOLÍTICO

Distintos investigadores han demostrado que el pretratamiento enzimático de las secciones tisulares que fueron fijadas en formol e incluídas en parafina aumenta subsecuentemente la reactividad inmunohistoquímica para ciertos antígenos.

Muchos laboratorios emplean la digestión enzimática para queratinas, inmunoglobulinas CD 68, CD 30 y otros marcadores.

Los protocolos de digestión enzimática (tiempo, concentración, etc) varían entre los distintos laboratorios reflejando diferencias en la fijación tisular. Por lo tanto, el pretratamiento proteolítico de las secciones tisulares que se utiliza debe ser optimizado de acuerdo al proceso de fijación de cada laboratorio.

Material requerido

- **MÉTODO DE TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO, TRIPSINA**
Tripsina 10 mg en 10 ml de TRIS buffer (pH 7,6) conteniendo 10 mg de cloruro de calcio.
- **MÉTODO DE TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO, PROTEASA TIPO XIV**
Proteasa tipo XIV sigma N° P 5.147 10 mg en 10 ml de PBS.
- **MÉTODO DE TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO, PEPSINA**
Pepsina 4 mg (3.100 u/mg proteína, sigma P 6.887) Agua destilada 960 ml HCL 5 N 40 ml
- **Cámara húmeda**
- **Plato térmico o estufa de 37°C – 40°C.**

Preparación tisular

No requiere portaobjetos con adhesivo tisular, sin embargo por los continuos lavados de la técnica, se recomienda portas tratados con silane o polilysine A.

Protocolo

Desparafinar y rehidratar las secciones tisulares.

MÉTODO DE TRATAMIENTO PROTEOLÍTICO

- Cubrir las secciones con la solución enzimática
- Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 15 minutos. El tiempo óptimo de incubación depende del tiempo de fijación en formol del tejido estudiar.
- La reacción se corta lavando con agua destilada o buffer de lavado.
- Continuar con la técnica.

Nota: La sobredigestión se manifiesta por un deterioro del detalle citológico y por una reducción de la inmunotinción.

COMBINACIÓN DE MÉTODOS

CALENTAMIENTO CON HORNO DE MICROONDAS COMBINADO CON OLLA A PRESIÓN

Ciertos epitopes son mejor recuperados cuando se utiliza una combinación de calentamiento con horno de microondas con olla a presión. Estos incluyen: ciclina D1, CD5, CD23, CD10, etc.

Material requerido

- Buffer de recuperación antigénica
- Horno de microonda doméstico de 750- 800 Watt con bandeja giratoria
- Olla a presión de plástico para horno de microonda
- Coplin de plástico

Preparación tisular

Portaobjetos con adhesivo tisular o portaobjetos con carga positiva

Digestión enzimática combinada con calentamiento con horno de microondas más olla a presión

Se realiza el procedimiento de combinación de horno de microondas con olla a presión, luego de finalizado, los preparados son tratados con tripsina, Proteasa tipo XIV, pepsina o proteinasa K, o se procede en forma inversa, primero la digestión enzimática y luego la combinación en el horno de microondas con olla a presión. En estos casos de combinación de métodos por calor y digestión enzimática, se tendrá especial cuidado en los tiempos tanto de exposición al calor como a la acción de las enzimas proteolíticas, que deberán estandarizarse previamente en testigos positivos.

DEFINICIONES Y CONCEPTOS

• INMUNOGENICIDAD

Capacidad de una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo, ya sea por síntesis de inmunoglobulinas o por estimulación de células inmunológicamente competentes. La inmunogenicidad depende de la naturaleza química del antígeno. Para que una molécula sea inmunogénica debe tener la suficiente complejidad estructural, como para interactuar con los distintos componentes del sistema inmune.

1. Las moléculas de peso molecular menor de 10.000 son poco inmunógenas.
2. A mayor complejidad química, mayor inmunogenicidad.
3. Para la obtención de la respuesta inmunológica, debe existir una diferencia antigénica con el animal inoculado, de donde se obtendrá el antisuero específico, que será un animal de especie diferente al de la obtención del antígeno.

• ANTIGENICIDAD

Particularidad de un antígeno que permite ser reconocido por un anticuerpo. Hemos visto ya que los antígenos demostrables pueden perder en mayor o menor medida su capacidad antigénica, debido a los procesos de desnaturalización de la fijación, y cuáles son los procedimientos para recuperar o reconvertir sus epitopes.

Los **haptenos** son moléculas **capaces de reaccionar en forma específica con un anticuerpo pero no de inducir su síntesis**, para lo cual es necesario el complejo **hapteno-proteína**.

• ESPECIFICIDAD

Se define como el hecho en que las inmunoglobulinas de un determinado antisuero sean capaces de unirse sólo a una sustancia (en cuyo caso se dice que ese antisuero es **específico para esa sustancia**), o por el contrario que un determinado antisuero se una a varias sustancias. Esta última circunstancia puede ocurrir por dos razones:

- a. Que los anticuerpos estén poco purificados y existan en solución varios de ellos, dirigidos algunos contra antígenos distintos del que se desea demostrar. (reacción inespecífica).
- b. Porque distintos antígenos posean determinantes antigénicos comunes, por lo que serán reconocidos por los mismos anticuerpos. Esto es lo que denomina reacción cruzada, donde se obtendría una reacción específica, pero no deseada.

CRITERIOS DE ESPECIFICIDAD DE HAIRN

- A. La marcación debe aparecer sólo en los tejidos que contengan el antígeno problema y debe estar limitada a ese antígeno.
- B. No debe producirse marcación utilizando un antisuero libre del anticuerpo específico.
- C) La marcación debe inhibirse pretatando el tejido con inmunosero específico, pero no con suero no inmune (test de bloqueo).
- D) No debe producirse marcación, si el antisuero es primero adsorbido con el antígeno, pero no debe haber diferencia si se usa

un antígeno distinto.

- E) La marcación no debe aparecer cuando el antisuero es aplicado a tejidos iguales o del mismo tipo que se esté estudiando, pero libres del antígeno que se desea demostrar. (salvo que se marquen antígenos para un determinado diagnóstico y se encuentren en el mismo tejido controles intrínsecos del antígeno a demostrar).

Debemos mencionar aquí, un concepto importante: Las uniones que enlazan el antígeno con el anticuerpo, son del tipo **no covalente** (uniones iónicas, uniones puente de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, dispersiones London y fuerzas hidrofóbicas).

Varios son los factores que pueden alterar éstos tipos de enlaces. Un anticuerpo puede ser altamente específico respecto al antígeno que se desea demostrar y sin embargo, ante un cambio de pH de la solución de incubación de éste anticuerpo, puede disminuir la "sensibilidad" del método, debido a que ante éste cambio de pH, una menor cantidad de antígeno podrá ser marcada en la muestra para inmunodetectar.

De las fuerzas mencionadas anteriormente, la más importante es la hidrofóbica, que trabaja con el 50 al 70% de las fuerzas de atracción que unen al antígeno con su anticuerpo específico. Otra fuerza del sistema es la repulsión estérica.

• SENSIBILIDAD

Este concepto en una técnica inmunohistoquímica puede establecerse por los siguientes parámetros:

1. La cantidad mínima de antígeno que se pueda localizar, en comparación con otras técnicas: cuanto mayor cantidad de antígeno pueda ser detectada, **mayor será la sensibilidad de la técnica**.
2. La dilución de los antisueros localizadores: cuanto menor sea **la concentración** de antisuero necesario para marcar una cantidad fija de antígeno, o lo que es lo mismo **cuanto mayor (más alta) sea su dilución, mayor será la sensibilidad de la técnica**.
3. La cantidad de diagnósticos positivos que se pueden hacer con distintos métodos de inmunomarcación, en un número fijo de casos.

En los métodos de inmunohistoquímica, la sensibilidad depende directamente de la actividad del anticuerpo en el antisuero, de los sistemas de detección que se utilicen, de los métodos de conjugación con las sustancias marcadoras que se emplean y de la cantidad de éstas moléculas marcadoras por unidad de anticuerpo.

• ANTISUEROS

Se denominan así a las soluciones que contienen inmunoglobulinas de determinada especificidad, existiendo los de métodos de obtención policlonal y los de métodos de obtención monoclonal.

Los antisueros **policlonales** contienen inmunoglobulinas que fueron sintetizadas en un animal, por distintas células plasmáticas, con la consecuente proliferación de varios clones de linfocitos B, que reconocen de forma específica cada uno de sus determinantes antigénicos. El resultado es la producción de una gran variedad de inmunoglobulinas dirigidas contra distintos determinantes, que difieren en tamaño, carga y afinidad.

Los antisueros **monovalentes o monoclonales** contienen inmunoglobulinas que fueron sintetizadas en un animal previamente inmunizado contra un determinado antígeno. Posteriormente se fusiona el núcleo de una célula plasmática linfocito B de ese animal con el citoplasma de un plasmocito neoplásico, obteniéndose células híbridas que sintetizan las cadenas de inmunoglobulinas codificadas como las producía la célula linfocito B normal, es decir provienen de una única célula madre. El híbrido resultante de la fusión entre la célula neoplásica (mieloma) y un linfocito B específico para un determinado antígeno, después de varias divisiones, da lugar a un clon, la totalidad de cuyos híbridos posee el mismo tipo de inmunoglobulinas. En definitiva un antisuero monoclonal es el producto de un clon único de células secretoras de inmunoglobulinas. Por ello, todas las moléculas de inmunoglobulina producidas, presentan idénticas características inmunológicas: especificidad, afinidad, carga, peso molecular, isotipo y propiedades.

Cuando trabajamos con antisueros, sean concentrados o prediluidos, debemos seguir las indicaciones del fabricante, en cuanto a la temperatura de conservación. Si han de ser congelados, conviene fraccionarlos a fin de no someter a continuos cambios de temperatura el antisuero, cada vez que se va a preparar una dilución. Una vez efectuadas, las diluciones finales se pueden conservar en heladera, por un tiempo predeterminado. Si se trata de diluciones primarias, de donde luego se obtienen las finales, conviene freezarlas. Si los antisueros vienen en forma liofilizada, se siguen las indicaciones del fabricante para su reconstitución.

PROTOCOLO BÁSICO DE INMUNOMARCACIÓN

• FIJACIÓN - DESHIDRATACIÓN - INCLUSIÓN

Dependerán del tamaño de las muestras. Para técnicas de inmunohistoquímica, conviene en lo posible, bloques de menor grosor.

Los parámetros de procesado, ya fueron indicados. Tengamos en cuenta los tiempos, tipo y temperaturas de los fijadores. Los solventes del procesado histológico, deben ser renovados con periodicidad. La parafina debe ser de buena calidad y renovarla con cambios durante la inclusión.

Si ha de fijarse y procesarse el material de estudio en microondas, seguir un protocolo que afecte lo menor posible, los antígenos a demostrar.

• FIJACIÓN CORTES Y MONTADO

Los cortes serán finos (3 a 5 micras) y montados en portas pretratados con adhesivos o en portas con carga positiva.

• LAVADOS – PENETRACIÓN DE LOS REACTIVOS – USO DE DETERGENTES

Luego de cada incubación, se lava profusamente en buffer, para arrastrar todo resto de antisuero o reactivo de detección que pueda producir una marcación inespecífica de fondo. Para contrarrestar la poca penetración de algunos conjugados y el depósito inespecífico de fondo, se recurre a detergentes como el Triton (1:100) o el Tween (1:2000).

Estos detergentes producen una mejor permeabilización de las membranas y por lo tanto un lavado más efectivo de los depósitos inespecíficos.

1- PASOS PREVIOS A LA INCUBACIÓN CON ANTICUERPO PRIMARIO

a. Inhibición de la peroxidasa endógena

Consiste en la inhibición de la peroxidasa remanente en el tejido a través del sustrato para la enzima, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Si éste paso no se efectúa, el revelado del cromógeno se depositará, no sólo en los sitios de inmunoreactividad antígeno-anticuerpo, mediados por la peroxidasa trazadora de la unión Ag-Ac, sino también en la peroxidasa remanente del tejido, dando marcación inespecífica de fondo.

b. Recuperación antigénica o digestión enzimática si se requiere

c. Bloqueo de uniones inespecíficas

Se realiza con suero normal que contiene inmunoglobulinas no dirigidas contra el antígeno. El suero de bloqueo o proteína de bloqueo, deberá ser de una especie distinta que la del antisuero primario, o la misma que la del antisuero secundario (generalmente se utiliza cabra, caballo o cerdo). La dilución en buffer y el tiempo de incubación varían según el protocolo que se siga.

Existen sistemas de detección altamente sensibles y específicos (por ej.: polímero de enlace u otros sistemas del tipo multilink), que no requieren de bloqueo de uniones inespecíficas.

2. INCUBACIONES

Las incubaciones, por procedimientos manuales, no automatizados, se realizan en cámara húmeda que consiste en un recipiente humedecido con agua, buffer o solución fisiológica, donde se colocan los portaobjetos.

Antisuero primario o específico

Es aquel que contiene inmunoglobulinas dirigidas contra un antígeno específico con una dilución predeterminada.

Antisuero secundario

Es aquel que contiene Ig dirigidas contra la especie de la que se obtuvo el anticuerpo primario. El secundario puede o no estar conjugado con otras sustancias (por ej. biotina).

Sistema de detección

Se trata de complejos de reacciones encadenadas y consecutivas, que encierran la enzima marcadora, cuyo procedimiento técnico puede constar de uno, dos o varios pasos posteriores a la incubación con el anticuerpo específico (según se utilice polímero de enlace, sistemas ABC o LSAB o CSA respectivamente).

Revelado de la enzima

Se realiza por adición de un cromógeno (por ej. DAB) a un buffer con el agregado del sustrato para la enzima (en el caso de la peroxidasa H₂O₂).

Los tiempos de revelado varían de 5 a 20 minutos y la acción se corta sumergiendo los vidrios en agua destilada o buffer.

3. AUTOMATIZACIÓN

Existen diversos aparatos que automatizan las incubaciones, lavados, revelado y contraste de las técnicas inmunohistoquímicas. Con la automatización se logra una uniforme distribución de los reactivos sobre el tejido, tiempo de incubaciones iguales para todos los vidrios, constante temperatura y protocolo, evitando las variables de resultados de la operación manual.

Sin embargo, sobre todo en nuestro medio, aconsejamos el revelado en forma no automatizada, bajo control microscópico.

BIBLIOGRAFÍA

- A. Arra: Guía para recuperar antígenos en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina: Curso de Inmunohistoquímica Básica, Cuadernillo de actividades; Hospital Garrahan julio 2001
- H. Aldana Marcos: Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico: Histoinforme Año XIV Vol 1 – Mayo 2003
- R. García del Moral: Laboratorio de Anatomía Patológica. Edición 1993
- R. García del Moral: La inmunocitoquímica en citología diagnóstica. Laboratorio y Atlas de Citología – 1999- 223- 230
- Molinolo- Fernández Alonso- Meiss – A. Sens. Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica: 1983
- David W. Martin Jr., Peter A. Mayes, Víctor W. Rodwel: Bioquímica de Harper: Novena edición
- Ganes T. Barrett: Inmunología básica y su aplicación en medicina - 1978
- C.R. Tylor – R.J. Cote: Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist Edición 1995
- Héctor Battifora – Inmunohistochemistry in tumor diagnosis, Congreso Argentino de Patología: Mar del Plata 1992
- Polymer Envision System: DAKO Corporation 1995 / 2000.

Referencias

- Kelly DP, Dewar Mk, Johns RB, Shao WL, Yates JF. Cross-linking of amino acids by formaldehyde. Preparation and ¹³C NMR spectra of model compounds. In Friedman M, ed. Protein cross linking: Symposium on protein cross linking. San Francisco 1976
- Taylor Cr. Kledzik G. Immunohistologic techniques in surgical pathology: A spectrum of new special stains. Human Pathology 1981;12:590
- Battifora H. Kopinski M: The influence of protease digestion and duration of fixation on the immunostaining of keratins: J. Histochem Cytochem 1986;34:1095
- Brinn N, Terrel W: Selected enzyme histochemical techniques facilitated by microwave oven.: J Histotechnology 1986;9:231
- Chiu KY.: Use of microwaves for rapid immunoperoxidase staining of paraffin section. Med Lab Sci 1987;44:3
- Leong ASY, MiliosJ, Duncis CG.: Antigen preservation in microwave-irradiated tissues: a comparison with formaldehyde fixation. J Pathology 1988;156:275
- Shi SR, Key ME, Kalra KL.: Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue section. J Histochem Cytochem 1991;39:741
- Shi Sr, Iman A, Young L, Cote R, Taylor C.: Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies.: J Histochem Cytochem 1995;43:193
- Della Speranza V.: Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry: HistoLogic: Vol XXXIV, N°2, nov 2001
- Taylor C.R, Shi S.R, Cote R.J.: Antigen retrieval for Immunohistochemistry: status and need for greater standardization. Appl Immunohistochem 1996; 4: 144-166
- Boenisch T. Appl Immunohistochem 2001; 9 (2): 176-179

Referencias

- Ht. Cristina T. Chaves / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar

FIJACIÓN, DECALCIFICACIÓN Y PROCESADO ADECUADOS PARA LA CONSERVACIÓN DE ANTÍGENOS TISULARES

Ht. Cristina T. CHAVES / Ht. Mónica ELIZABARAZ

FIJACIÓN TISULAR

Consiste en interrumpir los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular, tratando de conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo.

TIPOS DE FIJACIÓN

En función de las características del estudio microscópico, se distinguen dos tipos de fijación:

- Fijación histológica o citológica, que apunta principalmente a la conservación de la arquitectura y estructura de los tejidos y células, sin considerar los cambios moleculares inducidos sobre sus componentes bioquímicos.
- Fijación histoquímica, que apunta a preservar la composición molecular y bioquímica de los tejidos por sobre los detalles morfológicos celulares.

CLASE DE AGENTES FIJADORES

Los agentes fijadores se clasifican, según su mecanismo de actuación en dos grupos: fijadores por métodos físicos y fijadores por métodos químicos. La fijación por métodos físicos de frío, es el método de elección para realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiere conservar intacta la estructura proteica del tejido o su contenido enzimático. En el caso de las técnicas de inmunofluorescencia los procedimientos de criofijación son los adecuados para la correcta visualización del fluorocromo ligado o conjugado a un anticuerpo dirigido contra un antígeno específico.

De la variedad de técnicas de demostración de antígenos, arribaremos aquí las técnicas inmunoenzimáticas (inmunoperoxidasa, inmunofosfatasa alcalina), las cuales se aplican en la actualidad generalmente sobre tejidos fijados químicamente e incluidos en parafina.

REGLAS GENERALES EN LA FIJACIÓN

Para evitar la autólisis, el tejido debe ser colocado rápidamente en el fijador.

El tejido debe estar seccionado en láminas que no superen los 0,4 cm de espesor máximo.

El volumen necesario de fijador está determinado por el volumen de la pieza y la relación debe ser veinte veces su volumen.

La presión osmótica del líquido fijador y la de la muestra serán equivalentes, de ser necesario se compensará la misma con la del fijador, utilizando soluciones salinas.

El pH del fijador debe aproximarse al pH fisiológico, salvo que en su composición deba contener ácidos.

El tiempo de fijación es específico para cada fijador, pero existe un tiempo máximo de fijación que no debe ser sobrepasado.

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN SOBRE LOS ANTÍGENOS

En las técnicas de inmunohistoquímica básicamente se demuestran proteínas. Por acción de diversos agentes las proteínas pueden alterarse y perder su estructura terciaria o cuaternaria, o aún su estructura secundaria. Este fenómeno se denomina desnaturalización, por ésta causa la proteína pierde en gran medida su actividad biológica. El fenómeno en algunos casos es reversible y en otros irreversible.

Algunos factores que desnaturalizan las proteínas son:

- **Físicos:** por ejemplo calor (encima de 37°), las radiaciones, los ultrasonidos, etc.
- **Químicos:** por acción de ciertos fijadores, solventes y reactivos como:
 - **Fijadores simples** como el formol o alcohol 96° o 100°
- **Mezclas fijadoras**
- **Ácidos fuertes**, que las coagulan irreversiblemente, como el nítrico, el tricloroacético y el pícrico.
- **Soluciones a pH extremos**, menores de 3 o mayores de 10.
- **Disolventes orgánicos**, como los alcoholes, acetona, intermediarios.
- **Sales de metales pesados**, con las que las proteínas forman sales complejas.
- **Sales neutras** como el sulfato de amonio, de sodio, etc.

Las proteínas, son macromoléculas con una **conformación espacial determinada**, que puede perderse parcialmente bajo los efectos de una fijación química.

FIJADORES POR RETICULARIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

La fijación se produce por desnaturalización de las moléculas tisulares por rotura masiva de los puentes de hidrógeno determinantes de la estructura helicoidal y la formación ulterior de una malla reticular polipeptídica por enlaces químicos entre los grupos activos desmascarados por el líquido fijador.

Los principales agentes fijadores que actúan por éste mecanismo son el formaldehído, el glutaraldehído, el paraaldehído y el tetróxido de osmio.

• FORMALDEHÍDO (H-C=O H)

Detallaremos el proceso químico de fijación de éste agente fijador, por ser el más frecuentemente usado. La formalina es el nombre comercial de una solución que contiene un 40% de formaldehído y un 60% de agua.

El formaldehído forma complejos con la mayor parte de las macromoléculas tisulares. Su grupo aldehído (doble unión al oxígeno), se une a un único átomo de carbono. Esta unión es muy inestable (posee una alta energía) y se tratará de unir a otros grupos para disminuirla. Específicamente el formaldehído se une a sitios que contienen átomos de hidrógenos reactivos, como las aminas, amidas, hidroxilos, péptidos, sulfidrilos, anillos aromáticos de aminoácidos, azúcares, grasas y posiblemente carboxilos. Se fijan proteínas, glicoproteínas, ácidos nucleicos y polisacáridos.

La fijación con formaldehído produce **uniones cruzadas** mediante puentes metílenos entre las biomoléculas como proteínas, péptidos y los ácidos nucleicos. Produce un anclaje del citoesqueleto en los tejidos, manteniendo así la forma de la célula. Este fijador, puede también reducir los enlaces disulfuro de dos grupos sulfhidrilo, que a su vez, pueden reaccionar con el formaldehído y tomar parte en los enlaces metileno.

Este efecto de fijación denominado **cross-linking**, (uniones o enlaces **cruzados** que se producen entre la molécula del fijador y la de la proteína), consigue su efecto de **fijar** las proteínas, pero éstas pueden perder su conformación espacial. Al momento de realizar técnicas de detección de antígenos en tejidos fijados en formol, puede ocurrir que los determinantes antigénicos, queden **ocultos**, impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico. En éstos casos, para revertir el efecto **cross-linking** del fijador, se realizarán métodos de re-conversión antigénica.

El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria, en muchos casos altera la región antigénica o la enmascara.

Se une a aminoácidos básicos como la lisina y forma los puentes metilénicos ya mencionados. Las uniones cruzadas forman una fuerte malla que inmoviliza todas las macromoléculas, asociándolas con la membrana y el citoesqueleto del citoplasma y del núcleo.

Las moléculas fijadas, se unen por numerosas uniones cruzadas con varias moléculas de formol y otras uniones iónicas, puentes de hidrógeno y de Van der Waal que desnaturalizan las macromoléculas.

Los tejidos fijados en formol por 24 a 48 hs adquieren numerosas uniones cruzadas y otras uniones que no son alteradas con los subsecuentes pasos de la técnica histológica. En contraste, los tejidos fijados por menor tiempo (4 a 24 hs), son alterados luego por los pasos de la técnica histológica, por ejemplo las proteínas o los ácidos nucleicos son desnaturalizados por el alcohol, o el calor de la estufa.

La cantidad de uniones cruzadas dependerá de la concentración, pH, temperatura y tiempo de acción del fijador.

FIJADORES POR DESHIDRATACIÓN TISULAR

Sustancias altamente higroscópicas, que actúan eliminando tanto el agua libre como el agua ligada a las moléculas proteicas. Este cambio proteico provoca una desnaturalización, con alteraciones en la organización y estructura celular. Alteran poco la estructura antigénica.

Los fijadores alcohólicos como el metanol, el etanol y la acetona, son considerados fijadores precipitantes ya que desnaturalizan las proteínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria (tridimensional) de la molécula proteica. La estructura primaria y secundaria se mantiene intacta y si la secuencia aminoacídica es la que actúa como antígeno, son fijadores ideales para técnicas inmunohistoquímicas. La acetona es poco penetrante, se la utiliza generalmente para frotis o secciones de criostato.

OTROS FIJADORES-MEZCLAS FIJADORAS

MEZCLAS FIJADORAS A BASE DE CLORURO DE MERCURIO

El cloruro de mercurio (sublimado, bicloruro de mercurio) así como otras sales de mercurio fueron comunes fijadores histológicos en el pasado. Penetra rápidamente y precipita todas las proteínas, reaccionando con un número de residuos aminoacídicos, incluidos los grupos tiol, amino, imidazol, fosfato e hidroxilo. Los cristales de mercurio depositados en el tejido, necesitan ser removidos antes de continuar la técnica histológica. El cloruro de mercurio está contenido en mezclas como el Zenker, Helly, Ridley y la solución de B 5.

MEZCLAS FIJADORAS A BASE DE METALES PESADOS

Sales de metal como sales de zinc pueden ser potentes precipitantes proteicos, formando complejos insolubles con los polipéptidos.

La solución de Zinc formalina ha sido propuesta por algunos autores como un fijador de preservación antigénica para mejorar los resultados de una inmunotinción. Otra mezcla fijadora propuesta es el fijador de Fish (descubierto por F. Blum, Alemania 1893), a base de cloruro de zinc, formalina y agua.

MEZCLAS FIJADORAS A BASE DE ÁCIDO PÍCRICO

- **BOUIN:** Este fijador es conocido por penetrar rápidamente y causar una leve contracción en los tejidos. Contiene ácido pícrico, formol y ácido acético, los cuales precipitan las proteínas, coagulándolas, que se combinan para formar picratos y también producen uniones salinas intermoleculares. (Pearse, 1980).

Otras mezclas a base de ácido pícrico son el fijador de Bouin- Hollander que contiene acetato de cobre y el fijador de Duboscq Brasil (Bouin alcohólico).

PRINCIPIOS GENERALES DE LA FIJACIÓN

No existe un método universal de fijación, o lo que es lo mismo, un agente fijador adecuado para un tejido, puede no serlo para otro.

No todos los fijadores conservan indefinidamente el tejido, ya que la fijación no equivale a conservación tisular. En el caso del formol, el fijador más utilizado, es al mismo tiempo un excelente conservante.

Un “defecto de fijación” jamás puede ser corregido.

La base fundamental para la correcta detección de antígenos tisulares radica en el proceso de fijación.

Si por alguna razón en la fijación afectamos irreversiblemente un antígeno, no podremos demostrarlo de ninguna manera.

FACTORES QUE PUEDEN INFLUENCIAR EN EL RESULTADO DE UNA INMUNOMARCACIÓN

- La fijación
- La decalcificación.
- El procesamiento de la muestra.
- La naturaleza del antígeno.
- Su concentración en la muestra
- Su distribución (nuclear, citoplasmática, relacionado a membranas, extra celular).

FIJADORES PARA INMUNOHISTOQUÍMICA

Los mejores para las técnicas de inmunohistoquímicas son los que contengan en su composición formol, o mezclas fijadoras con formol (Zenker, B5, formol con sales de zinc, etc.). También se usa frecuentemente Bouin, que por regla general, no provoca una desnaturación irreversible de las muestras. Otro fijador utilizado, buen preservador de cantidad de antígenos, pero de penetración más lenta que el formol, es el etanol 96°, que se utiliza usualmente en citología. Para tejidos, el etanol solo, produce generalmente una retracción y distorsión de la morfología. Puede usarse con mejores resultados morfológicos y antigénicos en mezclas fijadoras, o bajo una fijación en frío que es la base del método de Sainte- Marie, indicado especialmente para la demostración de algunos antígenos. Cada uno de éstos fijadores, tiene un poder de penetración distinto. Un buen fijador, debe brindar el mejor detalle morfológico, en un tiempo de fijación lo más breve posible.

El siguiente cuadro esta basado en una modificación de guías de Taylor, Battifora y otros autores, sobre la base de la experiencia de nuestro Laboratorio.

PRESERVACIÓN DE LA INMUNOREACTIVIDAD	
CALIDAD DE PRESERVACIÓN	FIJADOR
BUENA	Formol neutro, B5, Fish, Zinc Formol
INTERMEDIA	Formol pH ácido, Bouin, Duboscq-Brasil, Zenker, Helly, Zamboni
MALA	Fijadores oxidantes, dicromatos, permanganatos ácidos.

CONTROL DE FIJACIÓN (BATTIFORA 1987)

Puede usarse como molécula indicadora de labilidad de marcación debida a la fijación, la identificación de vimentina. Ésta es una molécula lábil, que se ve adversamente afectada por la fijación y el procesado. Por lo tanto, si la vimentina es detectable en la muestra de estudio, se puede presumir de que otros antígenos puedan también ser detectados. Pueden usarse otros controles, tales como Keratinas o factor VIII, pero la vimentina es la más indicada, ya que casi siempre los cortes contienen algunas células de origen mesenquimático o endotelios, cuya reacción debe ser positiva.

pH DE FIJACIÓN

En general, la mayor preservación morfológica y antigénica, se obtiene usando fijadores a pH neutro o fisiológico. A pH ácido, la antigenicidad puede verse afectada según el fijador. Por debajo de pH 3, la antigenicidad de las moléculas puede perderse, probablemente como resultado de la destrucción de la estructura secundaria, terciaria y/o cuaternaria de las proteínas.

TEMPERATURA

Dentro de los límites indicados, la temperatura de fijación, no es probablemente crítica. Para la mejor preservación de la morfología y antigenicidad, la fijación a temperatura ambiente o en frío, es aún el método indicado. De cualquier manera, la temperatura de fijación no debe exceder los 30°C/ 37°C, siendo ya crítica a los 40°C. De fijar una muestra a éstas temperaturas, se tendrá especial cuidado en el tiempo.

EL PROCESADO DEL TEJIDO

En general, la deshidratación e inclusión en parafina, sigue los mismos parámetros en cuanto a tiempos y temperatura de los detallados para la fijación. Tiempos cortos combinados con cambios frecuentes de solventes e intermediarios, cambios de parafina y calor que no exceda los 62°C, son ideales para conservar la morfología y la antigenicidad.

Debemos tener en cuenta que una correcta fijación implica cortar el proceso de fijado una vez transcurrido el tiempo. Si la muestra ha sido incorrectamente fijada o no se ha procedido al lavado con el fin de eliminar el resto del reactivo fijador, los pasos subsecuentes de deshidratación, la seguirán fijando si se la coloca directamente en alcohol 96°, aumentando un tiempo de fijación excesivo, que puede aumentar la posibilidad de decremento de inmunoreactividad.

DECALCIFICACIÓN ADECUADA EN INMUNOHISTOQUÍMICA

Se denomina decalcificación a la completa eliminación de sales de calcio presentes en los tejidos después de haber realizado su fijación. Los principales agentes decalcificadores están formados por ácidos fuertes o débiles, empleados en forma aislada o conjuntamente con distintos líquidos decalcificadores. Además se utilizan resinas de intercambio iónico y quelantes químicos.

DECALCIFICACIÓN QUÍMICA

Ácidos inorgánicos fuertes: ácido nítrico, ácido clorhídrico.

Ácidos inorgánicos débiles: ácido sulfuroso.

Ácidos orgánicos: ácido fórmico, ácido acético, ácido tricloroacético, ácido pícrico.

Agentes quelantes: ácido etilen-diamino-tetracético (EDTA).

La elección de un agente decalcificador depende de la dureza de la muestra a decalcificar y de los estudios posteriores que se deben realizar. Siempre se tendrá en cuenta que si se decalcifica excesivamente, se destruirán los componentes titulares y no se arribará a un diagnóstico apropiado, más aún si se requieren estudios posteriores de inmunohistoquímica.

El ácido nítrico es el agente más rápido y eficaz, sin embargo utilizado en altas concentraciones (superiores al 6%), tiende a producir gran destrucción tisular, además de interferir en forma perniciosa en la demostración inmunohistoquímica.

Recomendamos enfáticamente no utilizar ácido nítrico en forma rutinaria como método de decalcificación. Su uso quedará restringido a huesos muy duros y compactos o dientes. Aún cuando deba utilizarse, no deberá estar en concentraciones que superen el 6%.

El ácido clorhídrico si bien no es tan rápido como el nítrico, produce menor agresión tisular y empleado en mezclas decalcificantes, puede acelerar el proceso decalcificador sin alterar demasiado las demostraciones inmunohistoquímicas.

Los ácidos orgánicos producen escasos artefactos tisulares e interfieren poco en los resultados finales de la inmunomarcación. Como actúan lentamente, requieren la renovación frecuente del líquido decalcificador.

Para disminuir en lo posible las alteraciones del agente decalcificador, la fijación de la muestra debe haberse completado, antes de iniciar el proceso. Los fijadores que contienen dicromato de potasio, bicloruro de mercurio (B-5, Zenker, Helly) o formaldehído tamponado, mejoran notablemente el procedimiento de decalcificación, aceleran el proceso, reducen la hinchazón del colágeno, del estroma y de la matriz ósea.

Cuando el tejido óseo está infiltrado por tumor, se deben separar las partes blandas para su procesamiento rutinario y las partes óseas para el proceso de decalcificación.

TEMPERATURA DE DECALCIFICACIÓN

Al igual que para el proceso de fijación, las temperaturas elevadas, por encima de 37° C, producen alteraciones tisulares. A los 60°C la maceración es máxima. Para evitar éstos procedimientos irreversibles, es conveniente tratar las muestras a temperatura ambiente con una agitación suave manual o mecánica que acelera el proceso decalcificador.

POST-TRATAMIENTO DEL TEJIDO

Después del proceso de decalcificación en el que se han empleado ácidos, el exceso de estos últimos deberá ser eliminado mediante lavados en soluciones neutralizantes. Cada decalcificador requiere de un protocolo específico de tratado posterior. Es fundamental seguirlo, puesto que la inmunomarcación de tejidos decalcificados puede ser interferida por un exceso residual de los ácidos empleados. Un pretratamiento de los cortes en solución acuosa de carbonato de litio al 1% mejora la neutralización.

Los decalcificadores más usados en nuestro medio, para una correcta conservación antigénica son:

- Ácido fórmico - Ácido clorhídrico
- Bouin
- EDTA

DECALCIFICACIÓN DE MÉDULA ÓSEA

Estas biopsias se obtienen por punción aspiración (de 1 a 2 cm. de longitud) y frecuentemente se realizan improntas o extendidos que son utilizados en hematología.

En el caso del tratamiento de las biopsias de médula ósea, es imprescindible la combinación de una fijación y decalcificación adecuada. Si bien en la literatura encontraremos variados procedimientos, en nuestro medio se plantean controversias en cuanto a la fijación y decalcificación ideal. Sin embargo, varios autores coinciden que lo más importante en éstos procedimientos, será la conservación morfológica y bioquímica de la estructura linfóide, lo más adecuada posible para la demostración de antígenos tisulares.

Los artefactos de extracción del material, del proceso de fijación y/o de decalcificación, pueden tornarse irreversibles para su estudio histopatológico.

En nuestra experiencia, el procedimiento ideal para médula ósea se obtiene con una fijación en Bouin (máximo 4 hs) seguida de una decalcificación en EDTA.

El Bouin es un excelente fijador con cierto poder decalcificador. Por eso es que frecuentemente se lo utiliza en nuestro medio como fijador-decalcificador. Sin embargo como agente decalcificador debe someterse la muestra a un tiempo de exposición generalmente mayor a las 24 hs. Este tiempo prolongado en el agente, perjudica la demostración de antígenos tisulares.

Otras combinaciones adecuadas son:

- Fijación en formol tamponado – Decalcificación en EDTA
- Fijación en B5 – Decalcificación en EDTA
- Fijación en formol tamponado, B5 o Helly - Decalcificación en ácido fórmico-clorhídrico

• FORMOL TAMPONADO

Formol al 38% - 40%	100	ml
Agua destilada	900	ml
Fosfato de sodio monobásico	4	gr
Fosfato de sodio dibásico	6, 5	gr

• BOUIN

Solución saturada en agua destilada de ácido pícrico	750	ml
Formaldehído 38% - 40%	250	ml
Ácido acético glacial	50	ml
pH final aproximado: 2.5		

Controlar la decalcificación. Una vez concluido el proceso, lavar abundantemente en alcohol 70° como paso previo a la deshidratación e inclusión en parafina.

• EDTA (ácido etilendiaminotetracético)

Sal disódica de E.D.T.A.	5,5	gr
Formol neutro al 10 %	100	ml

El tiempo medio de decalcificación para médula ósea es de 5 a 7 días. Con el tiempo ésta solución puede enturbiarse. Para aclararla se neutraliza la acidez de la solución hasta pH 7 con 2,5 gr de hidróxido de sodio por cada 100 ml. Es el decalcificador que mejor preserva las estructuras de los tejidos para las coloraciones y la inmunohistoquímica.

• ÁCIDO FÓRMICO – CLORHÍDRICO:

Ácido fórmico

Agua destilada	400	ml
Ácido fórmico	100	ml

Ácido clorhídrico

Agua destilada	420	ml
Ácido clorhídrico	80	ml

Solución de uso

Mezclar ambas soluciones. Cambiar diariamente y controlar.

Una vez decalcificada la muestra, lavar durante 1 hora en agua corriente, deshidratar, aclarar e incluir en parafina.

BIBLIOGRAFÍA

- Raimundo García del Moral: Laboratorio de Anatomía Patológica. Primera Edición.
- Hernán Aldana Marcos: "Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico" Histoinforme 1: 5-8 -Sociedad Argentina de Histotecnología- Mayo 2003-
- Taylor,C; Cote,R; Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist – Second Edition
- Ht. Ema Ester González-Dr. Miguel Gustincic: Resumen para la "Carrera de Médico Especialista en Patología" 2003 -HIGA EVITA – LA-NÚS -Servicio de Anatomía Patológica - laurencena@hotmail.com
- Mac Manus J.F.A. y Mouri R.: Tratado de técnica histológica
- Cejas H.R.: Manual de técnicas histológicas
- Jhon D. Bancroft, Alan Stevens, David R. Turner: Técnica histológica
- Martoja: Técnica histológica

Referencias

- Ht. Cristina T. Chaves / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar
- Ht. Mónica Elizabaraz / Hospital de Clínicas José de San Martín / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / elizabaraz@hotmail.com

INMUNOHISTOQUÍMICA EN MATERIAL CITOLÓGICO

“La importancia de la fijación y el procesado”

Ht. Cristina Chaves

INTRODUCCIÓN

ALGUNOS CONCEPTOS IMPORTANTES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

Es un conjunto de técnicas y procedimientos que se realizan a fin detectar un antígeno en una muestra determinada. Es la ciencia del uso de anticuerpos marcados para visualizar “in situ” su presencia. Depende de la afinidad exclusiva que muestran los anticuerpos por sus epitopes: **la especificidad**.

Se consigue aportar certeza sobre la presencia o ausencia de un antígeno determinado. El tipo de reacción que se establece ente el antígeno y su anticuerpo específico, es una reacción primaria, proceso no visible que se pone en evidencia a través de un marcador que hace posible la visualización microscópica. Los marcadores más utilizados a fines diagnósticos en citología, son dos enzimas: **la enzima peroxidasa y la fosfata alcalina**.

Para entender la importancia de la preservación celular adecuada y los procedimientos técnicos que permitan una buena observación microscópica para éste tipo de técnicas, resumiremos los reactantes y reactivos principales:

- **El Anticuerpo:** Son inmunoglobulinas dirigidas específicamente hacia un antígeno determinado. Su método de obtención puede ser del tipo monoclonal o policlonal. Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que contienen dos cadenas pesadas (H) y dos livianas (L). Su estructura está compuesta por dos zonas de polaridad diferente: una porción Fc y una porción Fab. En la porción Fab se encuentran zonas hipervariables denominadas **paratopes, que poseen la propiedad de reconocimiento del antígeno**.
- **El Antígeno:** Este tipo de técnicas detectan fundamentalmente proteínas. Así como en el anticuerpo sólo zonas especializadas tienen la propiedad de reconocimiento, en el antígeno existen zonas denominadas “**epitopes**” **donde radica su actividad antigénica**. Los procedimientos de fijación química que se utilizan para evitar los procesos de autólisis y muerte celular y para preservar la morfología, afectan en mayor o menor medida estas regiones, impidiendo o restringiendo la unión antígeno-anticuerpo. Existen técnicas denominadas de **reconversión antigénica** que apuntan a revertir el enmascaramiento de los epitopes y a reconfigurarlos para hacerlos de éste modo, accesibles a su anticuerpo.
- **Los sistemas de detección:** Son aquellos complejos o sistemas que contienen sustancias tales que posibilitan la localización del antígeno. El sistema de detección permite visualizar la reacción primaria antígeno – anticuerpo, a través de reacciones únicas o secuenciales, por medio de un cromógeno. Los sistemas actuales del tipo ABC o LSAB, utilizan como molécula amplificadora de la reacción, la biotina, su actividad endógena puede ser mayor en muestras derivadas de hígado, riñón, retroperitoneo, vejiga y órganos linfáticos.
- **Enzimas marcadoras:**
 - **Peroxidasa:** Es una enzima que utiliza el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como aceptor de electrones, para catalizar reacciones oxidativas en sustratos, formando precipitados coloreados. Es común en leucocitos y en eritrocitos. El sustrato colorimétrico más utilizado para poner de manifiesto su actividad es la Diaminobencidina (DAB) que produce un precipitado marrón insoluble. Su actividad endógena debe bloquearse si se han de usar sistemas de detección que la contengan.
 - **Fosfatasa alcalina:** Si vamos a utilizar un sistema de detección con fosfatasa alcalina, podemos tener problemas en materiales derivados de intestino o riñón, en esos casos podemos realizar fácilmente un bloqueo con levamisol.

Si bien las técnicas inmunohistoquímicas aplicadas a extendidos citológicos tienen los mismos fundamentos que en cortes histológicos, ciertos parámetros y procedimientos deben tenerse en cuenta.

FIJADORES

El fijador por excelencia en citología es el alcohol 96°. Es un fijador que actúa por precipitación ya que desnaturaliza las proteínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria de la molécula proteica y si bien su poder de penetración es menor que otros, su pH está encerrado en la neutralidad lo cual proporciona al antígeno fijado, una mayor afinidad por variedad de antisueños y reactivos. La preservación morfológica y antigénica es excelente.

Debido a su pH neutro y a que los extendidos generalmente no exceden de las 24 hs de fijación, los procedimientos de reconversión antigénica se efectúan en menor medida que en cortes histológicos. No obstante, esto dependerá del tiempo de fijación, del antígeno a demostrar y del anticuerpo y sistema de detección a utilizar.

Los fijadores aglutinantes como Carnoy o Saccomano no son buenos fijadores antigénicos, por lo tanto si se han de usar, es conveniente luego de 30 a 40 minutos, realizar una postfijación con líquidos que contengan altas proporciones de alcohol 96°.

La utilización de formol neutro tamponado quedará circunscripta a la fijación de botones o bloques celulares, ya que éste fijador no permite la adhesión celular sobre el extendido. El formaldehído fija por reticulización, estableciendo fuertes uniones por puentes metileno con gran variedad de grupos funcionales entre las proteínas. Estas uniones “en cruz” o “cross linking” producen el anclaje de las moléculas al citoesqueleto.

MUESTRAS HEMÁTICAS

Uno de los grandes inconvenientes en las inmunomarcaciones de extendidos citológicos son aquellos que contienen una cantidad considerable de sangre y por lo tanto una alta concentración de peroxidasas y catalasas endógenas. El Carnoy por ejemplo, es un fijador que produce cierto grado de hemólisis a un pH considerablemente bajo, lo cual puede afectar de manera irreversible la demostración de ciertos antígenos. Como contrapartida, la técnica de rehidratación celular, permite trabajar a pH cercanos a la neutralidad e inmediatamente finalizado el procedimiento, se fijan los extendidos en alcohol 96°. Esto permite por un lado una fuerte hemólisis y desnaturalización de catalasas y peroxidasas y por otro, una fijación ideal en alcohol 96°.

SUSTANCIAS ENDÓGENAS

Si bien el fijador produce cierto efecto desnaturalizante, la actividad endógena de enzima peroxidasa o de biotina es mucho mayor que en cortes histológicos. Por lo tanto la inhibición de la peroxidasa endógena es un punto crítico en los pasos de la técnica. Se debe aumentar la concentración de sustrato (H₂O₂) y/o los tiempos de incubación. En cuanto a la actividad de biotina endógena se tendrá especial cuidado en extendidos que provengan de órganos tales como hígado, bazo y riñón. En éstos casos se utilizarán sistemas de detección libres de biotina o se bloquearán los sitios de unión de la biotina endógena con una solución al 0.001 a 0.1 % de avidina en PBS por 20 a 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de una incubación con biotina al 0.001 a 0.2 % en PBS por 15 minutos a temperatura ambiente. Otra forma más económica de bloquear los sitios de unión, es el tratamiento de los extendidos en una solución de dos claras de huevo diluidas en 200ml de agua destilada, seguido de una incubación de leche en polvo descremada al 5 % en PBS. Estos pasos pueden realizarse antes o inmediatamente después de la incubación con el anticuerpo específico.

MATERIAL DE ESTUDIO

Es de vital importancia el aprovechamiento de las muestras a través de suficientes centrifugaciones, obtención de botones celulares, inclusión de sedimentos y coágulos de fibrina (frecuentemente queda atrapada celularidad representativa en ésta proteína), habilidad para el manejo de las muestras, realización de extendidos finos, fijación inmediata. Aunque sobradamente conocidos éstos parámetros son de vital importancia al momento de demostrar un antígeno en un extendido citológico.

OBTENCIÓN DE MATERIAL PARA INCLUSIÓN

Siempre que se pueda, es ideal obtener un bloque o botón celular para inclusión, ya sea a través de punciones, o incluyendo el sedimento que puede quedar en el fondo de los recipientes que contienen los extendidos o inclusive sedimentos de centrifugaciones. La información que nos brindan los cortes histológicos puede resultar muy útil para el diagnóstico citológico y resulta ideal para utilizar en técnicas de inmunomarcación, ya que nos permite la obtención de más de un vidrio de determinada población celular a la que frecuentemente se le debe realizar más de una determinación.

APROVECHAMIENTO DE LOS EXTENDIDOS DISPONIBLES

No siempre disponemos de material de inclusión o de uno o varios extendidos no coloreados para realizar las técnicas. Por lo tanto, frecuentemente se realizan marcaciones sobre extendidos ya coloreados con Papanicolaou. La tinción de base no afecta la observación microscópica de la inmunotinción posterior. La tinción de PAP, puede decolorarse fácilmente, previa extracción del cubreobjeto, con cambios en alcohol etílico absoluto, seguidos de 96°, alcohol 70° y agua.

Cuando sólo disponemos de algunos extendidos, se elaborará un panel de acuerdo a un rango prioritario de demostración de antígenos. En el caso de que el extendido tenga material representativo de punta a punta del portaobjeto, pueden efectuarse hasta tres marcaciones en el mismo porta. Si la demostración de un antígeno requiere por ejemplo de cierto método de reconversión antigénica y debe marcarse otro que no la requiera, puede dividirse el material a partir de cortar el portaobjeto con un diamante, obteniendo dos o tres vidrios que contengan suficiente material para inmunomarcar.

MÉTODOS DE RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA EN CITOLOGÍA

Ya hemos visto que el fijador habitual en citología, suele ser el alcohol 96°. Los alcoholes fijan por deshidratación coagulando las proteínas, sin la formación de compuestos aditivos, permiten una buena penetración del anticuerpo y no bloquean los determinantes inmunoreactivos. Sin embargo producen frecuentemente cambios conformacionales. La digestión proteolítica después de la fijación con alcohol es inútil y puede resultar en la destrucción del antígeno.

Se han usado con éxito métodos de recuperación por calor. Se ha demostrado que a través de ciertas modificaciones, pueden utilizarse procedimientos exitosos para la recuperación de receptores de estrógeno y progesterona, Ki 67, LCA, Her2Neu, CD20, CD3, AE1-AE3, CK7, CK20, TTF1, marcadores neuroendócrinos, S100, etc. En contraste con el material fijado en formol e incluido en parafina, el éxito de éste método no está tan relacionado al modo de fijación. Se ha propuesto que podrían reestablecerse los puentes hidrofóbicos y que la inmunoreactividad sería facilitada por un aumento en la permeabilidad de las membranas de la célula, proporcionando así acceso a antígenos celulares y nucleares previamente enmascarados. La modificación incluye la incorporación de una pequeña cantidad de detergente en la solución de recuperación y reducir los tiempos de exposición a temperaturas entre 80°C a 94°C, para mantener la morfología celular.

El buffer de recuperación para citología sigue siendo el citrato buffer a pH 6, o rescatadores comerciales a base de citrato. A pH 10, la morfología se pierde notablemente y a pH 9 se comprueba un mayor desprendimiento celular. El pH de rescate para una buena conservación morfológica y antigénica oscila entre 6 y 8 y los procedimientos que han dado mejores resultados son los que utilizan vapor.

También se ha propuesto que la inmunoreactividad de ciertos antígenos de membrana, se potencia por medio de la exposición a solventes de lípidos como el cloroformo, ya que ciertas proteínas están parcialmente enterradas en la doble capa lipídica de la membrana celular, por lo que una exposición al cloroformo contribuye al desenmascaramiento antigénico. Con éste método pueden demostrarse variedad de antígenos, por ejemplo citoqueratinas de distinto peso molecular, filamentos intermedios, CD56, LCA, HMB, etc.

El tratamiento con cloroformo es muy sencillo: una vez retirado el cubre, se lava el extendido con varios cambios de alcohol etílico absoluto por inmersión y se lo coloca en cloroformo P.A. toda la noche, o al menos por unas 6 hs. A continuación, se coloca el extendido nuevamente en alcohol etílico absoluto, pasaje por 96° alcohol 70° y se continúa la técnica convencional.

REVELADOS

Al momento de revelar la actividad enzimática, debemos tener en cuenta:

- La disposición tridimensional de las células
- Por sus características naturales, algunas células fagocíticas (polimorfonucleares) pueden tener cierta tendencia a captar distintos reactivos produciendo artefactos que deben tenerse en cuenta al momento de realizar un diagnóstico, evitando errores de interpretación.
- Se deberá tener especial atención en los tiempos de revelado y se efectuará un estricto control bajo microscopio óptico.
- El contraste nuclear con hematoxilina se hará con mayor tiempo de coloración y virado.

TESTIGOS POSITIVOS

- Extendidos diagnosticados
- Extendidos adicionales
- Células reactivas a determinados anticuerpos
- Botones celulares

RECOLECCIÓN DE CÉLULAS PARA TESTIGOS POSITIVOS:

1. Flúidos corporales y punciones con aguja fina: Si la celularidad lo permite se realizan portas extras que se guardan por un tiempo limitado, según el fijador utilizado.
2. Tejidos sólidos: Al cortar la muestra sin fijar, se raspa ligeramente con una hoja de bisturí, realizando luego los extendidos
3. Aguja de punción aspirativa: Se enjuaga la aguja en solución fijadora, realizando luego los extendidos.
4. Cultivos celulares

LIMITACIONES DE LA TÉCNICA

Pueden existir variaciones en los resultados por:

- Fijación
- Métodos de pretratamiento
- Procedimiento técnico
- Diferencia de sensibilidad entre los clones de anticuerpos según sean aplicados a cortes histológicos o muestras citológicas
- Interpretación de inmunoreactividad entre los observadores
- Imposibilidad de reproducir una población celular determinada

RECOMENDACIONES

- Fijación inmediata, para interrumpir los procesos de autólisis.
- Las muestras deben ser adecuadamente rotuladas de acuerdo al fijador utilizado.
- Si se ha de usar fijador de Saccomanno, respetar la proporción por lo menos 3 a 1 el volumen de la muestra.
- El material debe ser procesado inmediatamente.
- Usar portas silanizados o con carga positiva para evitar que se desprenda el material.
- Los extendidos finos en monocapa independientemente del método que se realice, minimizan los problemas de fondo y favorecen una "limpieza" de proteínas inespecíficas.

- Aplicar técnicas de rehidratación de ser posible, siempre antes de la fijación.
- No desechar restos de material: Pueden servir para inclusión en parafina
- Debe poder contarse con los datos clínicos del paciente, además de la indicación del órgano del cual procede el material.
- Correcta titulación de los anticuerpos a utilizar.
- Obtención de testigos positivos.
- Leer las indicaciones del data sheet.
- No realizar Digestión enzimática en muestras remitidas en alcohol.

BIBLIOGRAFÍA

- Rodney T. Miller: Technical Immunohistochemistry 2001 Pág 33. 2002
- Thomas Boenisch Basic Enzymology www.dakousa.com 2001
- Ng W, Choi F, Cheung L. Wu C: Rehydration of air-dried smears with normal saline: Application in fluid Cytology. Acta Cytol 1994, 38:56-64
- Leong AS: Immunostaining of cytologic specimen. Am J Clinical Pathology 1996, 105:139-140
- Gómez Morales, M; Navarro, N; Viquer García Moreno, J; García del Moral, R: Laboratorio y Atlas de Citología – Interamericana- McGraw-Hill- 1998
- Macrea. E.: Boletín técnico para histotecnólogos. Vol XXXVI, N°2 December 2003, SAKURA. Resumen publicado en "Histoinforme" Vol II Año XV Julio 2004

Referencias

- Ht. Cristina T. Chaves / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar

EFECTOS DE LA FIJACIÓN Y SISTEMAS DE RESCATE ANTIGÉNICO

Hernán J. Aldana Marcos

Cuando por primera vez aparecieron en escena las técnicas de inmunohistoquímica (INM) en el diagnóstico histopatológico allá por los años 70, numerosas comisiones en todo el mundo trataron, sin lograrlo, de estandarizar los métodos de fijación y procesamiento de los tejidos. Debido a este hecho el histotecnólogo se encuentra con la dura tarea de luchar con cientos de piezas de dudosa fijación y sin conocer el tiempo que lleva la pieza en el fijador. Dos hechos que como veremos son fundamentales para el éxito de la INM.

En la figura 1 observamos un diagrama que representa las mutuas relaciones entre los factores que influyen en el desarrollo final del procedimiento inmunohistoquímico. Para tener éxito en el mismo es obvia la necesidad de conocer cada uno de dichos factores. Sin embargo, debido a que la tinción INM es el resultado de un complicado set de interrelaciones entre los factores (representados por una línea) la exacta contribución de cada factor individual no puede determinarse. La Fijación en el centro del diagrama indica la gran importancia de la misma dentro de este complejo set de interrelaciones. **Un “defecto de fijación” jamás puede ser corregido.**



Pero entonces ¿Qué puede hacer el histotecnólogo para lograr el éxito de la INM?

En toda técnica de inmunomarcación, es de vital importancia, preservar el antígeno a demostrar. Los métodos de fijación y preservación del tejido, preparado citológico o material en estudio, dependerán de la **labilidad del antígeno**.

Actualmente existen variados métodos de lo que se denomina “reconversión antigénica”, además de contar con sistemas de detección altamente sensibles, capaces de demostrar antígenos celulares, que hayan sido sometidos a la fijación, procesado histológico e inclusión en parafina rutinarios.

El histotecnólogo debe conocer y analizar con profundidad cada uno de los métodos tratando de buscar la mejor forma de observar, verificar y mejorar la tinción INM.

PRINCIPIOS GENERALES DE LA FIJACIÓN

No existe un método universal de fijación, o lo que es lo mismo, un agente fijador adecuado para un tejido, puede no serlo para otro. No todos los fijadores conservan indefinidamente el tejido, ya que la fijación no equivale a conservación tisular. Como mencionamos anteriormente un **“defecto de fijación” jamás puede ser corregido**. Es inútil realizar cualquier estudio histológico sobre un material con graves defectos de fijación.

El extendido uso del formol como fijador de rutina se debe a su fácil elaboración, bajo costo y excelente preservador de la morfología.

Aunque el mecanismo exacto de la fijación con formol no se puede asegurar con exactitud, se cree que el formaldehído forma complejos con la mayor parte de las macromoléculas tisulares. Su grupo aldehído (doble unión al oxígeno), se une a un único átomo de carbono. Esta unión es muy inestable (posee una alta energía) y se tratará de unir a otros grupos para disminuir la energía. Específicamente el formaldehído se une a sitios que contienen átomos de hidrógenos reactivos, como las aminas, amidas, hidroxilos, péptidos, sulfhidrilos, anillos aromáticos de aminoácidos, azúcares, grasas y posiblemente carboxilos. Todos estos componentes se hallan en las principales biomoléculas de la célula y de la matriz extracelular.

La fijación con formaldehído produce **“uniones cruzadas” mediante puentes metilenos** entre las biomoléculas como proteínas, péptidos, carbohidratos y ácidos nucleicos. Produce un anclaje de las estructuras dentro de la célula (membrana nuclear, cromatina, membrana plasmática, organelas principalmente el citoesqueleto) y de las fibras de la matriz extracelular. De esta forma mantiene la forma de la célula, la unión entre células y la unión y estabilidad de la matriz extracelular.

Las técnicas de INM, ponen en evidencia una gran variedad de componentes celulares y tisulares, la mayor parte de los anticuerpos son contra **proteínas (incluyendo péptidos y polipéptidos)** aunque también pueden demostrarse moléculas con lípidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y metabolitos intermedios.

El efecto de fijación denominado **cross-linking**, (uniones o enlaces “cruzados” que se producen entre la molécula del fijador y la de las proteínas u otras biomoléculas), consigue su efecto de “fijar”, pero debemos tener en cuenta que durante la reacción de fijación las biomoléculas pueden **perder su conformación espacial o quedar enmascaradas o escondidas**. Puede ocurrir entonces, que los determinantes antigénicos, queden “ocultos”, impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico. En estos casos, para revertir el efecto **cross-linking** del fijador, se realizarán métodos de reconversión antigénica.

COMPRENDAMOS EL PROCESO DE FIJACIÓN CON FORMOL

El formaldehído disuelto en agua (formol), se hidrata a radical metilenglicol o sea es rápidamente convertido en metilenglicol (alcohol), quedando poca cantidad de aldehído (formaldehído). Posteriormente se produce un equilibrio entre formaldehído y metilenglicol. El metilenglicol penetra rápidamente en los tejidos. El formaldehído lo hace mas lentamente (aproximadamente 5 mm cada 4 hs.). El formaldehído se une lentamente en forma cruzada con las proteínas y los ácidos nucleicos. A partir del metilenglicol se forman más grupos formaldehído que continúan fijando el tejido. Cuando los tejidos son inmersos en formol, son rápidamente penetrados por metilenglicol y el formaldehído presente en solución. Al principio, la cantidad de formaldehído es escasa, pero a medida que se une covalentemente a las proteínas, se produce mas formaldehído a partir del metilenglicol de la solución fijadora, continuando la fijación. De ahí es que una correcta fijación lleve su tiempo, según el tamaño de la muestra y de la temperatura, el grado de penetración del fijador establecerá un tiempo mínimo (de 4 a 24 hs. estándar, para biopsias, 48 hs. o más para piezas enteras).

El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria: En muchos casos en donde **el epítipo es conformacional** (3D) altera la región antigénica o la enmascara. En los casos donde **el epítipo es lineal** (secuencia lineal de aminoácidos) puede enmascarar la región antigénica. Por lo tanto para ambos casos se necesita la recuperación antigénica.

Los tejidos fijados en formol por 24 a 48 hs adquieren numerosas uniones cruzadas y otras uniones que no son alteradas con los subsiguientes pasos de la técnica histológica. En contraste, los tejidos fijados por menor tiempo (4 a 24 hs), son alterados luego por los pasos de la técnica histológica, por ejemplo las proteínas o los ácidos nucleicos son desnaturalizados por el alcohol, o el calor de la estufa.

La cantidad de uniones cruzadas dependerá de la concentración, pH, temperatura y tiempo de acción del fijador. Algunos autores señalan que el formol ácido (pH aproximado 4), produce fuertes uniones cruzadas a diferencia del formol bufferado neutro o básico. También indican (dando lugar a la polémica), que la fijación con formol bufferado inactiva más grupos reactivos que el formol ácido, pudiendo producir un mayor enmascaramiento de grupos antigénicos.

El formol a temperatura ambiente penetra 5 mm por cada 4 horas, aproximadamente. Si elevamos la temperatura a 37°C, acortaremos los tiempos de penetración del fijador. Puede reducirse el tiempo, si la fijación se realiza a baja presión dentro de equipos automáticos de procesamiento de muestras. El microondas puede utilizarse para aumentar la difusión y reacción química del fijador. En cualquier caso se debe tener en cuenta que una rápida fijación de la superficie externa de la pieza, produce una lentitud en la penetración del fijador y determinando una mala fijación del centro de la muestra. Por lo tanto es aconsejable si se ha de usar microondas, colocar las muestras por inmersión en el fijador a temperatura ambiente por unas horas y luego colocar los bloques en microondas durante 15 minutos a 55°C.

Una fijación prolongada puede producir un decremento en el reconocimiento de los determinantes antigénicos. A mayor cantidad de uniones cruzadas entre proteínas adyacentes, aumenta la trama química y también se cubren los sitios antigénicos. Lo ideal es que se conozca el tiempo que lleva la muestra en formol. Las muestras no deben superar el espesor de 5 mm y la cantidad de fijador debe ser igual o mayor a 10 partes por 1 de muestra.

El Glutaraldehído forma más uniones cruzadas que el formaldehído, causando desnaturalización de las proteínas por alteración de la estructura alfa hélice. Por eso no se lo usa en INM. Sin embargo, fija rápidamente y es un excelente fijador de microscopio electrónica.

Los fijadores alcohólicos como el metanol, el etanol y la acetona, son considerados fijadores precipitantes ya que desnaturalizan las proteínas destruyendo los puentes hidrofóbicos que mantienen la estructura terciaria (tridimensional) de la molécula proteica. La estructura primaria y secundaria se mantiene intacta y si la secuencia aminoacídica es la que actúa como antígeno (epítipo lineal), son fijadores ideales. La acetona y el metanol son poco penetrantes, se los utiliza generalmente para frotis o secciones de criostato.

Si el antígeno se halla en péptidos de menor tamaño, conviene utilizar fijadores que produzcan uniones cruzadas ya que éstas evitan la difusión del péptido.

Se pueden utilizar también mezclas fijadoras mixtas es decir, precipitantes y formadoras de uniones cruzadas a la vez, como el Bouin o el Zamboni que llevan ácido pícrico (precipitante) y formol (formador de uniones cruzadas).

Bueno, muy lindo esto de la fijación, pero... en el caso de que mi antígeno quede oculto por la acción del fijador ¿cómo recupero la antigenicidad?

Los métodos de “rescate o recuperación antigénica”, tienen por objeto, precisamente, hacer accesible al anticuerpo, esas partes específicas, los epitopes, que han quedado “enmascarados”, por los efectos de la fijación.

Existe una extensa proliferación de artículos que describen estrategias y métodos para restaurar la antigenicidad de los tejidos. Son tantos y tan variados que el histotecnólogo puede confundirse. Pero comencemos por describir las generalidades de los más usados y no olvidemos que la experiencia de mesada es lo más importante.

Los trabajos pioneros de Fraenkel-Conrat sugirieron que los efectos desnaturalizantes de la fijación con formol, pueden remediarse con altas temperaturas o con soluciones alcalinas fuertes. Estas observaciones son la base de la recuperación antigénica.

Los métodos de recuperación antigénica pueden dividirse groseramente en aquellos que requieren calor y aquellos que no.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA SIN CALOR

SOLUCIONES ALCALINAS

La exposición de tejidos embebidos en celoidina a soluciones fuertemente alcalinas (NaOH/metanol 1:5 por 30 min.) produce un aumento de la inmunotinción. También se demostró que existe una relación inversa entre la concentración de álcali (C) y el tiempo (t). Por ejemplo: a mayor concentración de hidróxido de sodio menor es el tiempo necesario para obtener el resultado deseado. Sin embargo, las concentraciones altas de álcali tienen efectos nocivos destruyendo la morfología o despegando el tejido del portaobjetos.

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

El tratamiento de tejidos embebidos en parafina y fijados en formol con proteasas ha demostrado su efectividad en desenmascarar algunos antígenos.

Aunque nadie puede asegurar el efecto exacto sobre la recuperación antigénica de las proteasas, el uso de enzimas proteolíticas, tendría por objeto "cortar", por decirlo de alguna manera, la cadena polipeptídica enrollada aleatoriamente por los efectos del cross-linking de la fijación, en varios puntos, permitiendo así, la accesibilidad de los determinantes antigénicos a su anticuerpo específico.

Numerosos trabajos han demostrado que el tiempo requerido de exposición a proteasas es dependiente del tiempo de permanencia de la muestra en el fijador. Desgraciadamente, en general el histotecnólogo desconoce el tiempo de fijación. La sobre exposición a las enzimas proteolíticas puede destruir la antigenicidad del tejido, creando falsos resultados negativos, o dañar la morfología. Los tiempos óptimos de exposición deben ser determinados en cada laboratorio y lo que sería un sueño imposible, es ideal lograr una estandarización de los pasos y protocolos de fijación (invitemos a los patólogos y cirujanos a nuestros cursos).

- Incubar las secciones hidratadas en tripsina o pepsina por 20-30 min. (como punto de partida) a 37°C.

Preparar las soluciones enzimáticas de esta forma:

- 40 mg pepsina en 100 ml 0.01N HCl
- 10 mg tripsina en 100 ml 0.1 M buffer salino Tris (pH 7.8)

- Luego de la incubación enzimática lavar las secciones en tres cambios de buffer salino Tris (pH 7.4).

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA CON CALOR (RAC)

En estos casos, los distintos métodos responsables de la recuperación antigénica, tienen el mismo efecto que la predigestión enzimática, con la ventaja de que no existen efectos de sobredigestión, aunque pueden producirse contracción del tejido. Reconstituyen la inmunoreactividad perdida por efectos de fijadores químicos, pH ácidos o alcalinos, utilización de sales metálicas pesadas, etc.

Existen controversias respecto al fundamento por el que se produce el rescate antigénico por éstos métodos. Hasta hoy, la utilización de los mismos sigue en la práctica desarrollándose en forma que calificaríamos de empírica, con basamentos científicos distintos. Sin embargo, son utilizados, previos a la técnica intrínseca de inmunomarcación, con buenos resultados.

Este tipo de recuperación es fácilmente estandarizable. Deben tenerse en cuenta los siguientes puntos:

1. La relación entre la temperatura (T) y el tiempo (t) es inversa.

Esto quiere decir que, a mayor temperatura, menor es el tiempo necesario para obtener buenos resultados. Temperaturas por abajo de los 80°C no son significativamente beneficiosas. La temperatura de 90-100°C es óptima. Un trabajo reciente demostró una intensa inmunotinción con el siguiente protocolo: 100°C x 20 min.; 90°C x 30 min.; 80°C x 50 min.; 70°C x 10 horas.

2. El pH de la solución de recuperación es muy importante para algunos anticuerpos.

Algunos marcadores como el L26, PCNA, AE1, EMA, y NSE no parecen ser afectados por el pH de la solución de recuperación. Otros antígenos como el MIB-1 y el ER, exhiben una disminución de la tinción a pH neutros y una fuerte tinción a pH muy ácidos o muy alcalinos. Otros como el HMB-45, muestran una débil reacción a bajo pH, pero intensa a pH alto. Estos datos sugieren que, con algunas excepciones, el buffer de recuperación (Tris-HCl o el buffer acetato de sodio) a pH 8.0-9.0 es el indicado para la mayoría de los antígenos. Sin embargo, el buffer de citrato de sodio 0.01 M pH 6, es el más usado como solución de recuperación antigénica.

Buffers de bajo pH parecen ser mejores para ciertos antígenos nucleares, como la proteína retinoblastoma, receptores de estrógenos y andrógenos. En estos casos los buffers acetato (pH 1.0-2.0) o el buffer glicina (pH 3.6) aparentemente son superiores al buffer citrato.

3. Se desconoce la función y la importancia de la composición de los buffers en la recuperación antigénica.

En algunos casos se demostró que la inmunotinción se mejora calentando los portaobjetos en agua destilada, lo que sugiere que la composición química de las soluciones de recuperación no es importante. Cuando se reportó por primera vez el uso de calor en la recuperación antigénica, se recomendó el uso de soluciones buffers conteniendo sales de zinc (sulfato) o plomo (citrato). Sin embargo, hoy es aceptado que el uso de estas sales tóxicas no ofrece ninguna ventaja sobre las soluciones de buffers simples. Además numerosos laboratorios, han adoptado el uso del buffer citrato, en general esta solución buffer es menos efectiva que los buffers acetato, Tris-HCl, o glicina-HCl.

4. La elección de la fuente de calor no es significativa.

Aunque se dicen muchas cosas, la forma de obtención y mantenimiento de la temperatura requerida para el rescate antigénico (horno de microondas, olla a presión, baño de agua térmico, vaporiera, olla a presión en microondas, autoclave, etc), depende de la conveniencia.

El uso de microondas acelera el tiempo de calentamiento. Sin embargo, se necesitan de 2 a 3 ciclos de calor y enfriamiento (para evitar el hervor de la solución de recuperación). Además, existen numerosos trabajos que indican que el microondas produce artefactos de técnica. Con un microondas hogareño es importante determinar (calibrar) el tiempo necesario para alcanzar la temperatura necesaria. Es más efectiva la realización de varios ciclos de calentamiento que extender el calentamiento en un solo ciclo.

Si se utiliza una olla a presión una excesiva incubación de los portaobjetos a alta temperatura y presión altera la histología, particularmente en piel en donde el colágeno y la elastina aparecen fragmentados. Aunque depende de la olla a presión, en general 1-2 min. son suficientes para el desenmascaramiento antigénico.

La diferencia existente entre los efectos del tratamiento con buffers en microondas y con la olla a presión, es que en el primero "la agitación molecular", se produce por una radiación electromagnética, con alta frecuencia de oscilación y corta longitud de onda, mientras que en la segunda, la agitación molecular se produce por presión atmosférica. Se pueden combinar ambos efectos físicos (microondas-presión), para obtener con mejores resultados el "desenmascarado", de algunos epitopes de difícil demostración.

Un efecto secundario de ambos métodos, es el calor, que ayuda también a la agitación molecular produciendo un proceso similar al descrito por el desenmascarado por enzimas proteolíticas (ruptura de los ligamientos cruzados o cross-linking del fijador, restauración de la conformación del epitope).

Las temperaturas en estos casos pueden llegar hasta los 120°C. Estos efectos valen también para la utilización del autoclave.

En cuanto a la recuperación de epitopes por baño térmico (baño termostático) y la vaporiera, en éstos casos, la recuperación se produce netamente por efectos de calor y vapor. La temperatura oscila entre 95°C a 99°C como máximo.

CONSEJO

La tendencia de las empresas en vender soluciones de recuperación con nombres propios, impide que conozcamos que buffer estamos utilizando, lo que nos pone en desventaja, y más ahora que nuestros presupuestos se han reducido fuertemente. No existen soluciones mágicas, son sólo soluciones de buffers preparadas para ahorrar tiempo (pero no dinero). Por lo tanto, es conveniente que prepares tu solución de recuperación o al menos insistas en conocer que es lo que te venden.

EDTA

Un trabajo reciente de Morgan y col., confirmado por numerosos investigadores, sugiere que los iones de Calcio unidos a las proteínas inhiben la inmunotinción. Aparentemente los iones de Calcio alterarían la conformación del epitope. Este efecto puede ser revertido mediante el uso de EDTA un quelante de Calcio.

CONCLUSIÓN

La inmunohistoquímica es una ciencia en continuo desarrollo. La complejidad de las interacciones entre el tejido y el fijador, la ausencia de protocolos de fijación estándar entre los laboratorios, el amplio espectro de diferentes anticuerpos y de estrategias de detección de los mismos hacen que por ahora sea imposible lograr una estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas. Por lo tanto depende del histotecnólogo determinar en forma racional, reproducible y a bajo costo los mejores protocolos de recuperación antigénica para su laboratorio (y por supuesto compartir su experiencia con el resto de los histotecnólogos).

BIBLIOGRAFÍA

- Aragon P.A. y Chaves C. Fijación y procesamiento de biopsias. Servicio de Anatomía Patológica Hospital de Clínicas José de San Martín. Servicio de Anatomía Patológica Hospital Ramos Mejía. 2002.
- Chaves C. Reconversión antigénica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Ramos Mejía. 2002
- Della Speranza V. Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry. Histologic. Vol. XXXIV, No. 2, Nov. 2001. (La mayor parte de

este trabajo es traducido de este texto).

- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. J Biol Chem. 1948;174: 2673-2684.
- Morgan J.M., Navabi H., Jasani B. Role of calcium in high temperature antigen retrieval at different pH values. J Pathol. 1997; 182: 233-237.
- Pool C.W. y Buijs R.M. Antigen identity in immunocytochemistry. En: Molecular Neuroanatomy. Van Leeuwen, Buijs, Pool y Pach (eds). Elsevier Science Publishers B.V. 1988. pp.233-266.
- Taylor C.R., Shi S-R, Cote R.J. Antigen retrieval for immunohistochemistry: status and need for greater standardization. Appl Immunohistochem 1996; 4: 144-166.

Referencias

- Prof. Dr. Hernán Javier Aldana Marcos / Facultad de Medicina / Universidad de Morón / Buenos Aires / Argentina / haldana@unimoron.edu.ar

MÉTODOS DE RESCATE ANTIGÉNICO

FUNDAMENTO Y GENERALIDADES

HT. Norma Pozzo. HT. Sandra Camarero

La finalidad de las técnicas de inmunohistoquímica, es demostrar la presencia de un antígeno determinado para lo cual debemos considerar la fijación, entre otros, como punto crítico para poder dejar de manifiesto esos antígenos.

Si bien cada laboratorio tiene estandarizado su procesamiento de muestras, en muchas ocasiones debemos trabajar con piezas de dudosa fijación y procesamiento, o bien con tacos de archivo de muchos años.

El efecto de fijación denominado **cross-linking**, (uniones o enlaces "cruzados" que se producen entre la molécula del fijador y la de las proteínas u otras biomoléculas), consigue su efecto de "fijar", pero debemos tener en cuenta que durante la reacción de fijación las biomoléculas pueden **perder su conformación espacial o quedar enmascaradas o escondidas**. Puede ocurrir entonces, que los determinantes antigénicos, queden "ocultos", impidiendo el reconocimiento del anticuerpo específico. En éstos casos, para revertir el efecto "cross-linking" del fijador, se realizarán métodos de reconversión antigénica.

El formol no altera la estructura secundaria ni primaria de las proteínas, pero sí la terciaria y cuaternaria: en muchos casos en donde el epítopo es conformacional (3D) altera la región antigénica o la enmascara. En los casos donde el epítopo es lineal (secuencia lineal de aminoácidos) puede enmascarar la región antigénica. Por lo tanto para ambos casos se necesita la recuperación antigénica.

La cantidad de uniones cruzadas dependerá de la concentración, pH, temperatura y tiempo de acción del fijador. Algunos autores señalan que el formol ácido (pH aproximado 4), produce fuertes uniones cruzadas a diferencia del formol bufferado neutro o básico. También indican (dando lugar a la polémica), que la fijación con formol bufferado inactiva más grupos reactivos que el formol ácido, pudiendo producir un mayor enmascaramiento de grupos antigénicos.

Los métodos de "rescate o recuperación antigénica", tienen por objeto, precisamente, hacer accesible al anticuerpo, esas partes específicas, los epítopos, que han quedado "enmascarados", por los efectos de la fijación.

Estos métodos de rescate antigénico, pueden nombrarse de distintas formas:

- (R.A) Rescate Antigénico
- (E.R) Epítopo Retrieval
- (HIER) Heat Induced Epítopo Retrieval
- Epítopo Unmasking
- Enzimatic Epítopo Retrieval

Cada anticuerpo en su hoja de especificaciones nos indicará si es con calor y a qué pH, o si debe realizarse utilizando enzimas proteolíticas. En muchos casos la forma de nombrar este método varía de acuerdo a la marca del anticuerpo, básicamente por una cuestión comercial, pero están hablando de lo mismo.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA SIN CALOR

ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

El tratamiento con proteasas, de tejidos incluidos en parafina y fijados en formol ha demostrado su efectividad en desenmascarar algunos antígenos.

Aunque nadie puede asegurar el efecto exacto de las proteasas, el uso de enzimas proteolíticas, tendría por objeto "cortar", por decirlo de alguna manera, la cadena polipeptídica enrollada aleatoriamente por los efectos del cross-linking de la fijación, en varios puntos, permitiendo así, la accesibilidad de los determinantes antigénicos a su anticuerpo específico.

Numerosos trabajos han demostrado que el tiempo requerido de exposición a proteasas es dependiente del tiempo de permanencia de la muestra en el fijador. Lamentablemente, en general el histotecnólogo desconoce el tiempo de fijación. La sobre exposición a las enzimas proteolíticas puede destruir la antigenicidad del tejido, creando falsos resultados negativos, o dañar la morfología. Los tiempos óptimos de exposición deben ser determinados en cada laboratorio.

RECUPERACIÓN ANTIGÉNICA CON CALOR

Necesitamos:

- 1- Un equipo que genere calor o agitación molecular.
 - Microondas.

- Olla a presión.
- Olla a presión en microondas.
- Autoclave.
- Baño térmico.
- Vaporiera.

2- Solución de rescate.

- Solución comercial
- Solución no comercial
- pH dependiendo las especificaciones del anticuerpo

En estos casos, los distintos métodos responsables de la recuperación antigénica, tienen el mismo efecto que la predigestión enzimática, con la ventaja de que no existen efectos de sobredigestión, aunque pueden producirse contracción del tejido. Reconstituyen la inmunoreactividad perdida por efectos de fijadores químicos, pH ácidos o alcalinos, utilización de sales metálicas pesadas, etc.

Existen controversias respecto al fundamento por el que se produce el rescate antigénico por éstos métodos. Hasta hoy, la utilización de los mismos sigue en la práctica desarrollándose en forma que calificaríamos de empírica, con basamentos científicos distintos. Sin embargo, son utilizados, previos a la técnica intrínseca de inmunomarcación, con buenos resultados.

Este tipo de recuperación es fácilmente estandarizable. Deben tenerse en cuenta los siguientes puntos:

1. La relación entre la temperatura (T) y el tiempo (t) es inversa.

Esto quiere decir que, a mayor temperatura, menor es el tiempo necesario para obtener buenos resultados. Temperaturas por abajo de los 80°C no son significativamente beneficiosas. La temperatura de 90-100°C es óptima. Un trabajo reciente demostró una intensa inmunotinción con el siguiente protocolo: 100°C x 20 min.; 90°C x 30 min.; 80°C x 50 min.; 70°C x 10 horas.

2. El pH de la solución de recuperación es muy importante para algunos anticuerpos.

Algunos marcadores como el L26, PCNA, AE1, EMA, y NSE no parecen ser afectados por el pH de la solución de recuperación. Otros antígenos como el MIB-1 y el ER, exhiben una disminución de la tinción a pH neutros y una fuerte tinción a pH muy ácidos o muy alcalinos. Otros como el HMB-45, muestran una débil reacción a bajo pH, pero intensa a pH alto. Estos datos sugieren que, con algunas excepciones, el buffer de recuperación (Tris-HCl o el buffer acetato de sodio) a pH 8.0-9.0 es el indicado para la mayoría de los antígenos. Sin embargo, el buffer de citrato de sodio 0.01 M pH 6, es el más usado como solución de recuperación antigénica.

Buffers de bajo pH parecen ser mejores para ciertos antígenos nucleares, como la proteína retinoblastoma, receptores de estrógenos y andrógenos. En estos casos los buffers acetato (pH 1.0-2.0) o el buffer glicina (pH 3.6) aparentemente son superiores al buffer citrato.

3. Se desconoce la función y la importancia de la composición de los buffers en la recuperación antigénica.

En algunos casos se demostró que la inmunotinción se mejora calentando los portaobjetos en agua destilada, lo que sugiere que la composición química de las soluciones de recuperación no es importante. Cuando se reportó por primera vez el uso de calor en la recuperación antigénica, se recomendó el uso de soluciones buffers conteniendo sales de zinc (sulfato) o plomo (citrato). Sin embargo, hoy es aceptado que el uso de estas sales tóxicas no ofrece ninguna ventaja sobre las soluciones de buffers simples. Además numerosos laboratorios, han adoptado el uso del buffer citrato, en general esta solución buffer es menos efectiva que los buffers acetato, Tris-HCl, o glicina-HCl.

LA ELECCIÓN DE LA FUENTE DE CALOR NO ES SIGNIFICATIVA

Aunque se dicen muchas cosas, la forma de obtención y mantenimiento de la temperatura requerida para el rescate antigénico (horno de microondas, olla a presión, baño de agua térmico, vaporiera, olla a presión en microondas, autoclave, etc), depende de la conveniencia.

El uso de microondas acelera el tiempo de calentamiento. Sin embargo, se necesitan de 2 a 3 ciclos de calor y enfriamiento (para evitar el hervor de la solución de recuperación). Además, existen numerosos trabajos que indican que el microondas produce artefactos de técnica. Con un microondas hogareño es importante determinar (calibrar) el tiempo necesario para alcanzar la temperatura necesaria. Es más efectiva la realización de varios ciclos de calentamiento que extender el calentamiento en un solo ciclo.

Si se utiliza una olla a presión una excesiva incubación de los portaobjetos a alta temperatura y presión altera la histología, particularmente en piel en donde el colágeno y la elastina aparecen fragmentados. Aunque depende de la olla a presión, en general 1-2 min. son suficientes para el desenmascaramiento antigénico.

La diferencia existente entre los efectos del tratamiento con buffers en microondas y con la olla a presión, es que en el primero "la agitación molecular", se produce por una radiación electromagnética, con alta frecuencia de oscilación y corta longitud de onda, mientras que en la segunda, la agitación molecular se produce por presión atmosférica. Se pueden combinar ambos efectos físicos (microondas-

presión), para obtener con mejores resultados el “desenmascarado”, de algunos epitopes de difícil demostración.

Un efecto secundario de ambos métodos, es el calor, que ayuda también a la agitación molecular produciendo un proceso similar al descrito por el desenmascarado por enzimas proteolíticas (ruptura de los ligamientos cruzados o cross-linking del fijador, restauración de la conformación del epitope).

Las temperaturas en éstos casos pueden llegar hasta los 120°C. Estos efectos valen también para la utilización del autoclave.

En cuanto a la recuperación de epitopes por baño térmico (baño termostático) y la vaporiera, en éstos casos, la recuperación se produce netamente por efectos de calor y vapor. La temperatura oscila entre 95°C a 99°C como máximo.

La inmunohistoquímica es una ciencia en continuo desarrollo. La complejidad de las interacciones entre el tejido y el fijador, la ausencia de protocolos de fijación estándar entre los laboratorios, el amplio espectro de diferentes anticuerpos y de estrategias de detección de los mismos hacen que por ahora sea imposible lograr una estandarización de las técnicas inmunohistoquímicas. Por lo tanto depende del histotecnólogo determinar en forma racional, reproducible y a bajo costo los mejores protocolos de recuperación antigénica para su laboratorio (y por supuesto compartir su experiencia con el resto de los histotecnólogos).

BIBLIOGRAFÍA

- Aragon P.A. y Chaves C. Fijación y procesamiento de biopsias. Servicio de Anatomía Patológica Hospital de Clínicas José de San Martín. Servicio de Anatomía Patológica Hospital Ramos Mejía. 2002.
- Chaves C. Reconversión antigénica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Ramos Mejía. 2002
- Della Speranza V. Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry. Histologic. Vol. XXXIV, No. 2, Nov. 2001. (La mayor parte de este trabajo es traducido de este texto).
- Fraenkel-Conrat H., Olcott H.S. The reaction of formaldehyde with proteins. Cross-linking between amino and primary amide or guanidyl groups. J Biol Chem. 1948;174: 2673-2684.
- Morgan J.M., Navabi H., Jasani B. Role of calcium in high temperature antigen retrieval at different pH values. J Pathol. 1997; 182: 233-237.
- Taylor C.R., Shi S-R, Cote R.J. Antigen retrieval for immunohistochemistry: status and need for greater standardization. Appl Immunohistochem 1996; 4: 144-166.
- Aldana Marcos. H Aldana Marcos,H: “Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico” Histoinforme 1: 5-8 -Sociedad Argentina de Histotecnología- Mayo 2003-

Referencias

- HT Norma Pozzo / HT. Sandra Camarero / Servicio de Patología del Hospital “J. P. Garrahan” / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patologia@garrahan.gov.ar

PROTOCOLOS BÁSICOS DE RESCATE ANTIGÉNICO

HT. Cristina Chaves/ HT. Norma Pozzo

INTRODUCCIÓN

Las proteínas se desnaturalizan con el proceso de fijación y en mayor o menor medida pierden su conformación espacial. Los procedimientos de recuperación antigénica apuntan a reconfigurar los epitopes enmascarados por fijadores que contengan formaldehído o alcoholes, ya sea en forma simple o en mezclas fijadoras.

Ya hemos visto en los temas de fijación, decalcificación y procesado y en reconversión antigénica, la importancia de preservar adecuadamente el antígeno a demostrar.

Básicamente existe métodos de recuperación por calor y métodos de recuperación de epitopes por digestión enzimática.

PREPARACIÓN TISULAR

Portaobjetos con adhesivo tisular o portaobjetos con carga positiva.

SOLUCIONES UTILIZADAS

• TRIS-EDTA BUFFER (10mM Tris Base, 1mM EDTA Solución, 0.05% Tween 20, pH 9.0)

Tris Base 1.21 g

EDTA 0.37 g

Agua destilada..... 1000 ml (100 ml para una solución 10x)

Mezclar hasta disolver, llevar el pH a 9.0 y luego agregar 0.5ml de tween20 (opcional- recomendado) y mezclar bien.

Guardar esta solución a temperatura ambiente(estable por 3 meses) o a 4°C para preservar por un tiempo mayor.

Nota: este bufer es muy bueno para muchos anticuerpos pero a menudo puede dar mayor coloración inespecífica de fondo(background).

• BUFFER EDTA (1mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 8.0)

EDTA 0.37 g

Agua destilada.....1000 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar el pH con hidróxido de Na, y luego agregar 0.5ml de tween 20 (opcional- recomendado)

Guardar esta solución a temperatura ambiente(estable por 3 meses) o a 4°C para preservar por un tiempo mayor.

• BUFFER CITRATO DE SODIO (10mM Sodium Citrate, 0.05% Tween 20, pH 6.0)

Citrato de sodio (dihydrate)..... 2.94 g

Agua destilada.....1000 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar el pH a 6.0 con ácido clorhídrico 1N y luego agregar 0.5ml de tween20(opcional-recomendado)

Es el más comúnmente utilizado, sirve perfectamente para gran cantidad de anticuerpos dando muy buena intensidad de marcación y muy poco background

• BUFFER ACIDO CITRICO (10mM Citric Acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0):

Citric acid (anhydrous) 1.92 g

Distilled water..... 1000 ml

Mezclar hasta disolver. Ajustar el pH a 6.0 con hidróxido de sodio y luego agregar 0.5ml de tween20(opcional-recomendado)

Se puede utilizar combinado con el buffer citrato de sodio.

HORNO DE MICROONDAS

Es un método eficiente para el calentamiento rápido de soluciones acuosas. El efecto de agitación molecular, se produce en primera instancia por irradiación de ondas electromagnéticas, dando como efecto secundario calor por encima de los 110°C.

La estandarización del procedimiento es muy importante, por ejemplo: volumen constante de la solución de recuperación antigénica, tiempo de exposición y número constante de preparados, ciclos y potencia. La presencia de bandeja giratoria otorga un calentado más uniforme.

Variaciones en estas condiciones pueden influir en los resultados obtenidos.

Sin embargo, a pesar de ser un método rápido y eficiente, se debe tener en cuenta que no todos los microondas son iguales y que con el uso pierden su potencia. Adicionalmente los protocolos de procedimiento pueden variar según el antígeno a demostrar, por ejemplo

más ciclos de microondeado para antígenos de demostración más dificultosa. Esto puede provocar desprendimiento de los cortes y contracción tisular no deseada. Varios autores indican entonces, ciclos más cortos y repetidos a potencias que oscilan entre 5 a 8.

En base a la experiencia de otros autores, proponemos un protocolo que suma las ventajas del calentamiento rápido con el efecto humectante del baño de agua.

PROTOCOLO DE MICROONDAS “EFECTO BAÑO MARÍA”

1. En un recipiente plástico resistente al calor, colocar entre 150 y 300 ml de agua destilada, según el tamaño del recipiente, para hacer un efecto "baño María".
2. Introducir dentro de un coplin de plástico resistente, la solución de buffer citrato y luego las láminas (en el práctico se usará 350 ml de buffer comercial listo para usar)
3. Colocar de ser necesario portaobjetos sin cortes para que las ondas electromagnéticas circulen uniformemente.
4. Colocar el coplin dentro del recipiente plástico mencionado en el punto 1.
5. Primer golpe de microondas a potencia máxima 7 minutos.
6. Abrir la puerta del microondas y verificar el nivel de solución rescatadora. De ser necesario agregar agua destilada o buffer para evitar el secado de los cortes y mantener la concentración de buffer rescatador.
7. Dejar descansar dentro del microondas 3 minutos, a continuación, segundo golpe de microondas a potencia máxima 5 minutos.
8. Abrir la puerta del microondas y verificar el nivel de solución rescatadora. De ser necesario agregar agua destilada o buffer para evitar el secado de los cortes y mantener la concentración de buffer rescatador.
9. Tercer golpe de microondas potencia máxima 3 minutos.
10. Retirar con cuidado el recipiente plástico y sacar el coplin del mismo. Dejar a temperatura ambiente durante aproximadamente 20 minutos.
11. Lavar los cortes en agua destilada y luego colocarlos en buffer de lavado PBS-Tween o TBS-Tween. Continuar con la técnica.

VAPORIERA DE VEGETALES – BAÑO DE AGUA TÉRMICO

Una de las fuentes de calentamiento de soluciones de recuperación antigénica más conveniente es el baño de agua tradicional o una vaporiera de vegetales con capacidad de alcanzar temperaturas de hasta 100°C (baño termostático). Su principal ventaja es la temperatura controlada del baño de agua y la emisión de vapores humectantes constantes.

- Los elementos importantes son:
- La elección del buffer de recuperación antigénica.
- Vaporiera graduada a temperatura que no supere los 99°C.
- El baño de agua térmico no debe superar los 94 a 99°C (punto previo a la ebullición)
- Tiempo de calentamiento y antígenos a ser detectados.

Los buffers más utilizados para este tipo de procedimientos son:

1. El buffer de citrato de sodio 0.01 M pH 6, es el más usado como solución de recuperación antigénica.
2. Recientemente se han incorporado otro tipo de soluciones de rescate: por ejemplo soluciones a base de Tris-EDTA pH 9, con resultados altamente satisfactorios.

PROTOCOLO DE VAPORIERA

1. Precalentar la solución de rescate antigénico entre 30 y 40 minutos en un coplin resistente al calor, dentro de la vaporiera con cantidad suficiente de agua destilada para que emita vapor.
2. Colocar los cortes en el coplin, dentro de la vaporiera por 45 minutos, controlando la temperatura 94° / 99° C
3. Retirar el coplin y dejar a temperatura ambiente no menos de 20 minutos.
4. Lavar los cortes en agua destilada y luego colocarlos en buffer de lavado PBS-Tween o TBS-Tween. Continuar con la técnica.

PROTOCOLO BAÑO TÉRMICO

1. Precalentar la solución de rescate antigénico en un coplin resistente al calor durante aproximadamente 30 minutos, dentro del baño térmico, con cantidad suficiente de agua destilada para que emita vapor.
2. Colocar los cortes en el coplin, dentro del baño térmico, por 40 a 45 minutos, controlando la temperatura 95°/99°
3. Retirar el recipiente y dejar a temperatura ambiente no menos de 20 minutos.
4. Lavar en buffer de lavado PBS-Tween o TBS-Tween. Continuar con la técnica.

EFEECTO VAPOR-PRESIÓN

Este método es un efecto combinado vapor - presión, que puede ser utilizado para antígenos de difícil demostración. Suma las ventajas de ambos métodos: un desenmascarado de epitopes efectivo y fuerte (efecto de presión atmosférica, temperaturas muy altas) y la hu-

mectación constante de los cortes (efecto vapor) y por tanto, menor contracción tisular y desprendimiento.

PROTOCOLO OLLA A PRESIÓN A GAS EFECTO BAÑO MARÍA

1. Precalentar en una olla a presión cantidad suficiente de agua destilada y simultáneamente colocar en un coplin de plástico o metálico resistente al calor cantidad suficiente de buffer rescatador.
2. Colocar la tapa sin cerrar herméticamente y esperar a que la temperatura del buffer esté entre 90-95°C (entre 30-40 minutos).
3. Retirar cuidadosamente la tapa y colocar las láminas dentro del coplin.
4. Colocar nuevamente la tapa sin cerrar herméticamente y esperar 35 minutos.
5. Con cuidado cerrar herméticamente la tapa.
6. A partir de que la válvula emite vapor (presión) esperar 5 minutos.
7. Apagar la llama, y dejar descansar 2 minutos.
8. Abrir cuidadosamente la olla, retirar el coplin y dejar descansar 20 minutos.
9. Lavar los cortes en agua destilada y luego colocarlos en buffer de lavado PBS-Tween o TBS-Tween. Continuar con la técnica.

TÉCNICAS DE DESENMASCARADO POR EL USO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

El uso de enzimas proteolíticas, tiene por objeto "cortar", por decirlo de alguna manera, la cadena polipeptídica enrollada aleatoriamente por los efectos del cross-linking de la fijación, en varios puntos, permitiendo así, la accesibilidad de los determinantes antigénicos a su anticuerpo específico. Este efecto de "cross-linking o uniones cruzadas o enlaces en cruz", está provocado por el tipo de enlace metileno que establecen ciertos fijadores con las proteínas actuando por reticulización (el más común y frecuentemente usado el formaldehído).

Como paso previo a la inmunomarcación, se utilizan entonces una variedad de enzimas, entre ellas: Proteinasa K, Tripsina, Pepsina, Proteasas de varios tipos, etc., (ya sea en su forma comercial prediluida o en su extracción purificada, generalmente en polvo). Estas enzimas actúan sobre un sustrato (en éste caso sobre un antígeno), con temperatura, pH y tiempo de exposición determinados para cada una de ellas, por un lado y además por los parámetros de fijación y procesamiento utilizado para el antígeno a demostrar. Es decir cada enzima actúa sobre parámetros propios, que debemos conocer, antes de utilizarla.

El efecto proteolítico de estas enzimas, ayuda al desenmascarado de epitopes, pero también pueden producir "efectos de sobredigestión", con pérdida de la morfología. Por lo tanto es necesario la utilización de controles positivos, la optimización de la técnica, que, según varios autores depende del tiempo de fijación de la muestra, y probar distintos tiempos de exposición además de cierto y acotado margen de temperatura, ya que por lo general las enzimas pueden desnaturalizarse y perder su capacidad biológica, por arriba de los 40°C (la temperatura de exposición variará entonces entre temperatura ambiente a 37°C hasta 40°C como máximo, mientras que el tiempo de exposición varía entre cinco a veinte minutos o más).

Las enzimas más utilizadas en la actualidad son: la pepsina (digestión fuerte), la tripsina (digestión moderada) y la proteinasa K (digestión suave).

PROTOCOLO DE DIGESTIÓN CON PROTEINASA K

- 1) Luego de la inhibición de peroxidasa endógena colocar los cortes en PBS o TBS
- 2) Secar cuidadosamente el portaobjeto por debajo y alrededor del corte y colocar de 1 a 2 gotas de proteinasa K
- 3) Dejar actuar la enzima durante 5 a 6 minutos (la digestión puede extenderse hasta 15 minutos si es necesario)
- 4) Cortar la acción enzimática con buffer PBS o TBS, con varios lavados de arrastre.
- 5) Lavar por inmersión en un coplin con PBS o TBS y continuar con la técnica.

BIBLIOGRAFÍA

- Arra,A; Schultz,M; Chaves,C: Cuadernillo de actividades "Curso Inmunohistoquímica" – Hospital Juan P. Garrahan – Sociedad Argentina de Histotecnología – 2001
- Aldana Marcos,H: "Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico" Histoinforme 1: 5-8 -Sociedad Argentina de Histotecnología- Mayo 2003-
- Taylor C., Shi,S., Cote R.: Antigen retrieval for immunohistochemistry: status and need for greater standardization. Appl Immunohistochem 1996; 4:144-166
- <http://www.ihcworld.com>

Referencias

- HT Norma Pozzo / Servicio de Patología del Hospital "J. P. Garrahan" / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patologia@garrahan.gov.ar
- Ht. Cristina T. Chaves / Hospital General de Agudos J. M. Ramos Mejía / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / cristinachaves@uolsinectis.com.ar

PROTOCOLO BÁSICO DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Curso de Inmunohistoquímica. SAH 2006

1-Desparafinar e hidratar los cortes hasta el alcohol 96

2- Inhibición de la peroxidasa endógena

Solución de inhibición:

Agua oxigenada 30% 30 ml

Alcohol Etílico Absoluto 70 ml

Otras opciones:

Solución inhibidora:

Agua oxigenada 30% 10 ml

Alcohol etílico absoluto 90 ml

Agua oxigenada 30% 10 ml

Agua destilada 90 ml

3- Abundante lavado con buffer

4- Rescate antigénico con calor o enzimas proteolíticas de acuerdo a las especificaciones del anticuerpo

5- Abundante lavado con buffer

6- Bloqueo de uniones inespecíficas si se requiere de acuerdo al sistema de detección que vamos a utilizar

7- Abundante lavado con buffer

8- Incubación con anticuerpo primario

9- Lavado con buffer

10- Incubación con anticuerpo secundario biotinilado

11- Lavado con buffer

12- Incubación con complejo HRP

13- Lavado con buffer

14-Revelado con DAB

15-Cortar el revelado con agua destilada

16- Contraste nuclear con Hematoxilina

17- Virar con agua corriente

18- Deshidratar, aclarar y montar

4.

BIOSEGURIDAD

Ht. Norma Pozzo

CRIOSTATOS



CM 1510



**LUIS
MARSAN**

Deán Funes 427
Buenos Aires - Argentina
Tel: 4931-6439 / 4130
www.luismarsan.com.ar

Leica
MICROSYSTEMS



CM 1850 UV



CM 1850

BIOSEGURIDAD EN LOS LABORATORIOS DE HISTOTECNOLOGÍA

HT. Norma Pozzo

El tema de la Bioseguridad no es un tema menor y mucho menos para tomarlo con ligereza como suele suceder. Mucha es la bibliografía que podemos consultar pero la mayoría de las veces nos encontramos con que la teoría y las necesidades de elementos de protección son muy lejanas a las que nosotros tenemos acceso. No obstante esto, hay algunas medidas que podemos tomar sin necesidad de dinero, pero lo mas importante es **tomar y hacer tomar conciencia de la necesidad de cuidarse**.

Una de las peores cosas que nos sucede, es el acostumbrarnos a determinada situación aceptándola como normal, un ejemplo muy común, y solo por citar uno de ellos, es el olor al formol que en general hay en los laboratorios de Anatomía Patológica

Hay que tener en cuenta que la exposición del técnico a estas sustancias es diaria y que es acumulativa en el organismo, pudiendo manifestarse consecuencias a largo plazo.

La información contenida en esta recopilación, tiene como objeto por sobre todo, informarnos. Generalmente no nos enseñan a tomar los recaudos necesarios con el manejo cotidiano de reactivos comunes en los laboratorios. Y si bien el tema es por demás extenso, trataré brevemente de resumir los conceptos más importantes. Toda la información completa está disponible para consulta en las páginas web que figuran en las referencias.

En las hojas de seguridad que encontrarán al final hay mucha información de algunos de los químicos que utilizamos todos los días, esa es el tipo de información que debemos solicitar a nuestros proveedores, luego nos queda ver dentro de nuestras posibilidades, de que forma podemos poner en práctica lo aconsejado en las mismas

Pero vamos, en primer lugar, a definir BIOSEGURIDAD: la bioseguridad es una disciplina cuya finalidad es proteger la vida del hombre para que éste logre armonizar su vida laboral y social en un estado de completo bienestar físico, mental y psico-social, exento de todo peligro, daño o riesgo. Al anteponer el prefijo Bio y formar la palabra Bioseguridad evocamos inmediatamente el concepto de protección a la vida, situación que puede lograrse, en parte, evitando accidentes, conociendo el peligro y el modo de evitar tareas riesgosas o maniobras inseguras

IGNORANCIA-DESAPRENSION-IMPRUDENCIA= ACCIDENTE

Tenemos que tener en cuenta que si bien toda actividad lleva implícita la posibilidad de un accidente de trabajo, su conocimiento anticipado nos da la oportunidad de prevenirlo. El técnico de un Laboratorio de Anatomía Patológica, tanto citotécnico como histotécnico se encuentra dentro de la categoría de personal de alto riesgo, ya sea por manipulación del material orgánico como por la utilización de diversas sustancias químicas. Por lo tanto la bioseguridad en el Laboratorio, deberá enfocarse sobre la posibilidad de:

1. contaminación infectocontagiosa de material biológico: **todo material recibido en fresco debe tratarse como contaminado**, cada laboratorio deberá elaborar las normas pertinentes con la manipulación de este tipo de muestras
2. peligrosidad de sustancias tóxicas, nocivas, corrosivas o irritantes por el otro.

Tomemos en cuenta también, que la presencia de agentes químicos en el trabajo, no significa que necesariamente vamos a intoxicarnos, pero indica la posibilidad de riesgo y eso deberá ser evaluado. El cálculo de riesgo se estima evaluando las propiedades tóxicas de los productos como así también las condiciones de exposición del trabajador.

Quienes en los laboratorios manejamos elementos tales como reactivos químicos, material radiactivo, especímenes, cultivos y toxinas o bien los residuos generados de estas actividades, nos exponemos a una gran variedad de riesgos:

• BIOLÓGICOS

Según la OMS se establecen cuatro grupos de riesgo para los microorganismos que pueden causar daño en humanos y animales, atendiendo a la peligrosidad del agente y si el daño es individual, comunitario o al medio ambiente

Grupo de riesgo I: trabajo con agentes que provocan escaso riesgo individual y comunitario. Son microorganismos con pocas posibilidades de provocar enfermedades humanas y veterinarias.

Grupo de riesgo II: riesgo individual moderado y comunitario limitado. Son agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o veterinarias con pocas posibilidades de causar un riesgo grande.

Grupo de riesgo III: tienen riesgo individual elevado y el comunitario escaso, las infecciones No se propagan de una persona a otra.

Grupo de riesgo IV: riesgo individual y comunitario elevado. Suelen provocar graves enfermedades en el hombre y los animales y se propagan fácilmente.

• FÍSICOS

Térmicos, mecánicos y eléctricos Condicionados a factores humanos y ambientales: iluminación y ventilación inadecuadas.

• QUÍMICOS

Entenderemos por agente químico cualquier sustancia que pueda afectarnos directa o indirectamente (aunque no estemos efectuando nosotros mismos las tareas). Una sustancia química puede afectarnos a través de tres (3) vías: inhalatoria (respiración :esta es, con muchísima diferencia, la principal), ingestión (por la boca), dérmica (a través de la piel).

Las sustancias químicas usadas en nuestros laboratorios se clasifican de acuerdo a sus características químicas, físicas o tipo de riesgo que representen para el hombre o el medio ambiente.

Cotidianamente en los laboratorios manejamos una gran cantidad de químicos que muchas veces no sabemos como tratar, estando además expuestos a “riesgos químicos”, pero... “¿Qué es riesgo químico? Riesgo químico es aquel susceptible de ser producido por una exposición no controlada a agentes químicos.

Las sustancias químicas se clasifican en:

Explosivos: se consideran las mas peligrosas e incluyen no solo los explosivos sino sustancias tales como sales metálicas que por si mismas en ciertas mezclas o cuando se exponen al choque, fricción o al calor pueden explotar y provocar quemaduras o incendio.

Inflamables: líquidos con un punto de destello de 210 o más.

Tóxicas: pueden causar efectos extremadamente serios, agudos o crónicos incluyendo la muerte cuando son inhalados, tragados, o absorbidos a través de la piel.

Daños: efectos limitados en la salud si son inhalados, tragados o absorbidos a través de la piel.

Oxidantes: sustancias que producen reacciones altamente exotérmicas en contacto con otras sustancias inflamables o con materiales combustibles.

Irritantes: sustancias capaces de provocar una reacción inflamatoria local sin afectar severamente los tejidos.

Corrosivas: sustancias que pueden destruir los tejidos vivos.

Cancerígenas: agentes químicos cuyos efectos adversos es la producción de tumores en el hombre y los animales.

Teratogénicas: agentes que producen defectos en la natalidad (malformaciones)

Mutagénicas: compuestos o sustancias que producen cambios químicos en la composición de bases del ADN.

Peligrosas al medio ambiente: Sustancia que tienen efectos perjudiciales sobre ecosistemas cuyos constituyentes pueden abarcar micro flora del suelo, micro fauna y hasta primates.

CONOCER LOS SÍMBOLOS QUE REPRESENTAN LOS RIESGOS QUÍMICOS, PERMITE TOMAR MEDIDAS DE PRECAUCIÓN PARA EVITAR ACCIDENTES.

INCOMPATIBILIDAD DE PRODUCTOS QUÍMICOS

En la mayoría de los laboratorios guardamos bajo nuestras mesadas o armarios, gran cantidad de químicos sin tener en cuenta su incompatibilidad, basándonos para su guardado, la frecuencia de uso o en muchos casos el orden alfabético.

Consideraremos nueve grupos que pueden generar riesgo en su almacenamiento

Grupo 1: Inflamables

Grupo 6: Tóxicos

Grupo 2: Oxidantes

Grupo 7: Peroxidantes

Grupo 3: Reductores

Grupo 8: Pirofóricos

Grupo 4: ácidos y bases fuertes concentrados

Grupo 9: Gases comprimidos

Grupo 5: Productos reactivos con el agua

Los cinco primeros, producen reacciones fuertemente exotérmicas liberando intenso calor e incluso pueden explotar si entran en contacto con productos incompatibles.

Los productos reactivos con el agua, producen reacciones violentas y liberan productos altamente tóxicos, además de dificultar la extinción en caso de incendio.

Los **tóxicos** requieren zonas de almacenamiento ventiladas.

Los **peroxidables** pueden formar peróxidos inestables y deben almacenarse en ambientes frescos y oscuros.

Los **pirofóricos** entran en combustión en contacto con el aire y en ocasiones con el agua, y necesitan medidas especiales de almacenamiento.

Los **gases** plantean riesgos, además de los inherentes al producto, al estar comprimidos en un recipiente.

La forma correcta de almacenarlos sería separar estos grupos y aplicarles las medidas de seguridad adecuada a cada uno de ellos, desafortunadamente esto no se puede aplicar en la mayoría de los casos, no sólo por no contar con los medios edilicios necesarios sino porque además, es fácil encontrar un producto que se clasifica en dos o más grupos simultáneamente por lo que sería necesario estable-

cer criterios adicionales.

El accidente que puede reportar consecuencias más grave es el incendio. Por consiguiente la inflamabilidad será el criterio prioritario.

En el caso de los químicos que en contacto con el agua liberan productos inflamables, tóxicos o corrosivos, habrá que disponer de extintores adecuados.

Con los químicos inflamables insolubles y de menor densidad que el agua fría deberá utilizarse agua pulverizada o extintores alternativos ya que el agua puede extender el incendio.

Teniendo en cuenta, en primer lugar, la inflamabilidad y en segundo lugar la incompatibilidad del producto con el agua, la separación entre grupos podría establecerse de la siguiente manera:

Grupo 1. Productos inflamables compatibles con el agua: Los sólidos como el azufre y líquidos como el metanol, etanol, acetona, ácido acético son algunos ejemplos de este grupo. El volumen de estos productos almacenado determinará si es necesario disponer de un almacén exclusivo o simplemente bastará un tabique o material incombustible, siendo además recomendable contar con cubetas para evitar derrames.

Grupo 2. Productos inflamables incompatibles con el agua: la incompatibilidad con el agua se puede dar en dos formas:

- a. En base a una reactividad peligrosa como en los metales alcalinos y alcalinos-térreos sobre todo finamente divididos que reaccionan vigorosamente con el agua (Ej.: calcio, litio, magnesio, sodio).
- b. En base a la inmiscibilidad y menor densidad que el agua, hecho que puede dificultar las tareas de extinción. (Ej.: tolueno, éter de petróleo, hexano).

Si las cantidades de almacenamiento son pocas, también pueden almacenarse juntos, teniendo extinguidores de espuma, polvo o agua pulverizada.

Grupo 3. Productos no inflamables compatibles con el agua: este es un grupo heterogéneo donde se incluyen ácidos, bases, tóxicos, oxidantes o reductores, los que tienen en común su compatibilidad con el agua.

Los tóxicos deben ser almacenados en lugares ventilados.

Los ácidos, bases, oxidantes y reductores deben almacenarse por separado; algunos ácidos inorgánicos tienen un efecto oxidante muy marcado, en estos casos, deberemos almacenarlos como oxidante y alejarlo de productos y materiales combustibles. También conviene separar sólidos de líquidos para evitar las mezclas en casos de roturas o derrames.

al igual que el anterior, este es un grupo heterogéneo con el agravante que, en contacto con el agua, producen reacciones peligrosas. Los subgrupos pueden constituirse separando bases, ácidos, tóxicos, oxidantes o reductores.

Grupo 5. Productos inestables a temperaturas superiores a la ambiental: Por ejemplo el peróxido de hidrógeno es una sustancia oxidante fuerte, soluble en agua, que puede descomponerse violentamente al estar expuesto a calor excesivo. Manteniéndolos lejos de fuentes de calor, podrán clasificarse en función de sus riesgos y compatibilidad con el agua.

Grupo 6. Productos inestables o muy volátiles a temperatura ambiente que necesitan un ambiente refrigerado: requieren una cámara o ambiente frío, con su interior libre de focos de ignición, y disponer de un sistema alternativo en caso de falta de suministro de energía. No es aconsejable almacenar inflamables en refrigeradores domésticos y asegurarse de que no posean elementos eléctricos en su interior.

Grupo 7. Productos pirofóricos: arden espontánea-mente en contacto con el aire y normalmente en contacto con el agua (Ej.: fósforo blanco).

Grupo 8. Gases comprimidos, licuados o contenidos en botellas o botellones: Deben estar almacenados en lugares ventilados, ubicados en el exterior, libres de toda fuente de ignición, colocados en posición vertical, debidamente protegidos para evitar su caída, separando físicamente los gases inflamables del resto y las botellas llenas de las vacías.

ALMACENAMIENTO DE PEQUEÑAS CANTIDADES

Lo expuesto anteriormente es válido para todo tipo de almacenamiento aunque está orientado, fundamentalmente, a almacenamiento de un número variado de productos químicos en cantidades importantes. No obstante, existen depósitos de productos químicos con variedad de ellos, pero en cantidades pequeñas. En este caso podremos simplificar la estrategia separando, del resto, los inflamables compatibles o incompatibles con el agua (en término de inmiscibilidad) y almacenados en un armario de seguridad en una zona ventilada y libre de focos de ignición.

Para disponer de un depósito seguro y elaborar las normas preventivas y protección adecuadas se establecerá, en primer lugar, una estrategia de almacenamiento, para esto es necesario tener la mayor cantidad de información sobre los riesgos de los productos y su reactividad con otros, mediante las hojas de seguridad de cada uno de ellos (que de no ser entregada junto con el producto debemos solicitar a nuestros proveedores) manuales, libros, etcétera.

INCOMPATIBILIDAD DE QUÍMICOS:

QUIMICO	INCOMPATIBLE CON
ACETILENO	cromo, bromo, fluor, cobre, plata y mercurio
ÁCIDO ACÉTICO	acetileno, óxido de cromo (VI), ácido nítrico, alcoholes, etilenglicol, ácido perclórico, peróxidos, permanganatos.
ÁCIDO NÍTRICO CONCENTRADO	ácido acético, anilina, óxidos de cromo (VI), ácido cianhídrico, sulfuro de hidrógeno, líquidos y gases inflamables
ÁCIDO OXÁLICO	plata, mercurio
ÁCIDO PERCLÓRICO	anhídrido acético, bismuto y sus aleaciones, alcoholes y papel madera
ÁCIDO SULFÚRICO	clorato de potasio, perclorato de potasio, permanganato de potasio
ALQUILOS DE ALUMINIO	agua
AMONÍACO, GAS DE LABORATORIO	mercurio, cloro, hipoclorito de calcio, yodo, bromo, fluoruro de hidrógeno
ANILINA	ácido nítrico, peróxido de hidrógeno
BROMO	véase cloro
CARBÓN ACTIVO	hipoclorito de calcio, oxidantes
CIANUROS	ácidos
CLORATO DE POTASIO	véase cloratos
CLORATOS	sales de amonio, ácidos, polvo metálico, azufre, sustancias inflamables u orgánicas finamente dispersas.
CLORO	amoníaco, acetileno, butadieno, butano, metano, propano, hidrógeno, bencina de petróleo, benceno, polvo metálico
COBRE	acetileno, peróxido de hidrógeno
FLUOR	guardar apartado de otros productos
FLUORURO DE HIDRÓGENO	amoníaco gas de laboratorio ó solución
FÓSFORO	azufre, compuestos que contienen oxígeno, Ej.: cloratos
HIDROCARBUROS (butano, propano, benceno)	fluor, cromo, bromo, óxido de cromo (VI)
LÍQUIDOS INFLAMABLES	nitrito de amonio, óxido de cromo (VI), peróxido de hidrógeno, ácido nítrico, peróxidos sódicos, halógenos
MERCURIO	acetileno, amoníaco.
METALES ALCALINOS	agua, tetracloruro de carbono, alogenuros de álcalos, anhídrido carbónico, halógenos.
NITRATO DE MERCURIO	ácidos, polvo metálico, líquidos inflamables, cloratos, nitratos, azufre, sustancias finamente dispersas orgánicas o inflamables
ÓXIDO DE CROMO	ácido acético, alcanfor, naftaleno, glicerina, bencina de petróleo, alcoholes, líquidos inflamables
PERCLORATO DE POTASIO	véase cloratos
PERMANGANATO DE POTASIO	glicerina, ácido sulfúrico, etilenglicol, benzaldehído
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO	cobre, bromo, hierro, metales y sales metálicas, alcoholes, acetona, sustancias orgánicas, anilinas, nitro metano, sustancias inflamables
PERÓXIDO SÓDICO	metanol, etanol, ácido acético glacial, anhídrido acético, benzaldehído, sulfuro de carbono, glicerina, etilenglicol, acetato de etilo, acetato de metilo, furfural
PLATA	acetileno, ácido oxálico, ácido tartarico, compuestos de amonio
POTASIO	metales alcalinos
SODIO	metales alcalinos
SULFURO DE HIDRÓGENO	ácido nítrico fumante, gases oxidantes
YODO	acetileno, amoníaco (gas/solución)

La distribución del Laboratorio es fundamental. El almacenaje de estos productos debe hacerse en lugares frescos y oscuros, lejos de las salidas de emergencia o de las entradas y salidas generales, para evitar el bloqueo del fuego en caso de incendio. Debe contarse con extractores, extinguidores de fuego y baldes de arena en los lugares adecuados

Es importante saber que las drogas, colorantes, solventes, etc. deben exhibir etiquetas que provean la información de seguridad de los mismos, por lo que los técnicos deben habituarse a leer exhaustivamente las de uso diario para conocer:

- nombre del producto e información descriptiva
- fórmula y peso molecular
- estructura química
- pureza
- N° de catálogo
- recomendaciones para el manejo
- condiciones de almacenamiento sugeridas
- tamaño del envase y presentación
- N° de lote
- advertencia de peligro y pictograma correspondiente
- información de salud y seguridad
- propiedades físicas
- hoja de datos de seguridad.

LAS ETIQUETAS Y PICTOGRAMAS PUEDEN PRESENTARSE EN DIVERSAS FORMAS, TODAS IGUAL DE VALIDAS

NORMAS QUE REGULAN EL ROTULADO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS

NORMA IRAM 3797. Sistema de rotulado nacional. Este sistema coincide con el sistema de rotulado de la ONU sobre transporte de sustancias peligrosas. En nuestro país reglamentado por el Decreto 779/95 y Res. 197/97.



Además de los pictogramas presentes en las etiquetas, aparecen los siguientes símbolos.

SÍMBOLO	SIGNIFICADO	SÍMBOLO	SIGNIFICADO
T+	Muy Tóxico.	O	Comburente.
T	Tóxico.	C	Corrosivo.
Xn	Nocivo.	Xi	Irritante.
F	Fácilmente inflamable.	E	Explosivo.
F+	Extremadamente inflamable.	N	Peligroso para medio ambiente.

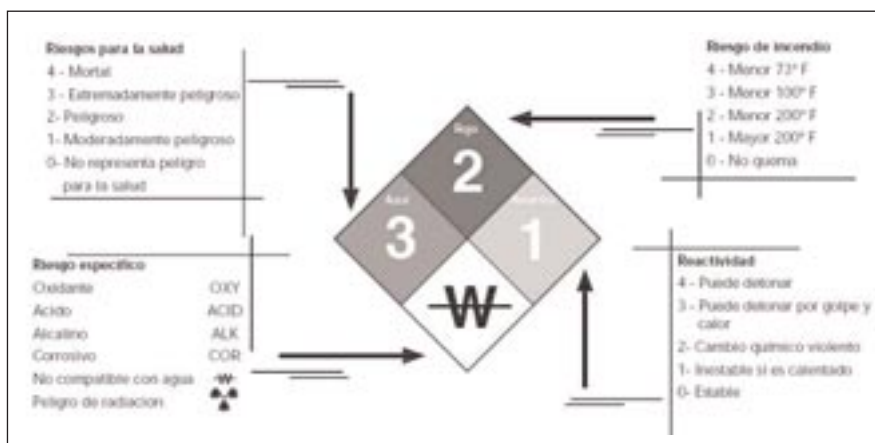
CÓDIGO NFPA 704

Sistema de identificación de riesgos para que en un eventual incendio o emergencia, las personas afectadas puedan reconocer los riesgos de los materiales respecto del fuego, aunque éstos no resulten evidentes. Este código ha sido creado para la utilización específica de los cuerpos de bomberos.

En la etiqueta consta del nombre del material y cuatro secciones con un color asignado en cada caso:

Salud	Azul
Inflamabilidad	Rojo
Reactividad	Amarillo
Riesgo especial	Blanco

En cada una de las secciones se coloca el grado de peligrosidad: 0, 1, 2, 3, 4, siendo en líneas generales, 0 el menos peligroso, aumentando la peligrosidad hasta llegar a 4, nivel más alto.



CÓDIGO HIMG: Consiste en una etiqueta que consta del nombre del material y cuatro secciones:

Salud / Inflamabilidad / Reactividad / Protección Personal

ES IMPRESCINDIBLE AL MOMENTO DE COMPRAR DROGAS Y REACTIVOS, SOLICITAR AL VENDEDOR LA FICHA TÉCNICA Y DE SEGURIDAD DEL PRODUCTO QUE ESTAMOS REQUIRIENDO, COMO ASÍ TAMBIÉN EXIGIR QUE EL ENVASE DEL MISMO TENGA LOS PICTOGRAMAS DE SEGURIDAD, LAS FRASES S Y LAS FRASES R

RECOMENDACIONES DE TRABAJO

Es importante cumplir y hacer cumplir ciertas normas dentro de los laboratorios

- Normas de higiene personal, tales como no beber, comer o fumar en lugares prohibidos ni durante la manipulación de sustancias nocivas.
- Lavarse las manos las veces que sean necesarias.
- No pipetear directamente con la boca.
- Tener las áreas de trabajo bien delimitadas e identificadas
- Desinfectar adecuadamente las mesadas y elementos utilizados en las prácticas con material en fresco ya sea citológico o tejidos
- No reutilizar material descartable
- Utilizar al menos guantes, barbijo y antiparras para evitar el contacto con drogas volátiles al pesar
- Conocer antes de utilizar una sustancia química, sus propiedades, peligros y formas de evitarlos.
 - Manipular las muestras, sustancias químicas, material radioactivo, etc., en lugar apropiado.
 - Leer detenidamente la etiqueta del envase de las sustancias químicas,
 - Contar en un lugar visible y de rápido acceso con los teléfonos de Centros de Toxicología.

CONTROLES DE SALUD Ver página 52 del Módulo 2

Las frases R (Risk Phrases) nos indican riesgos específicos derivados de los peligros de una sustancia

- | | |
|---|---|
| R1 Riesgo de explosión en estado seco. | R35 Provoca quemaduras graves. |
| R2 Riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición. | R36 Irrita los ojos. |
| R3 Grave riesgo de explosión por choque, fricción, fuego u otras fuentes de ignición. | R37 Irrita las vías respiratorias. |
| R4 Forma compuestos metálicos explosivos muy sensibles. | R38 Irrita la piel. |
| R5 Peligro de explosión por la acción del calor. | R39 Peligro de efectos irreversibles muy graves. |
| R6 Peligro de explosión, en contacto o sin contacto con el aire. | R40 Posibles efectos cancerígenos. |
| R7 Puede provocar incendios. | R41 Riesgo de lesiones oculares graves. |
| R8 Peligro de fuego en contacto con sustancias combustibles. | R42 Posibilidad de sensibilización por inhalación. |
| R9 Peligro de explosión al mezclar con sustancias combustibles. | R43 Posibilidad de sensibilización en contacto con la piel. |
| R10 Inflamable. | R44 Peligro de explosión al calentar cerrado. |
| R11 Muy inflamable. | R45 Puede ser cancerígena. |
| R12 Extremadamente inflamable. | R46 Puede provocar daños hereditarios. |
| R13 Gas licuado extremadamente inflamable. | R47 Puede provocar malformaciones. |
| R14 Reacciona violentamente con el agua. | R48 Peligro de daños graves para la salud en caso de exposición prolongada. |
| R15 Reacciona con el agua produciendo gases muy inflamables. | R49 Puede causar cáncer por inhalación. |
| R16 Riesgo de explosión en mezcla con sustancias comburentes (oxidantes). | R50 Muy tóxico para los organismos acuáticos. |
| R17 Se inflama espontáneamente al aire. | R51 Tóxico para los organismos acuáticos. |
| R18 Al usarlo puede formar mezclas vapor-aire explosivas/inflamables. | R52 Nocivo para los organismos acuáticos. |
| R19 Puede formar peróxidos explosivos. | R53 Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente acuático. |
| R20 Nocivo por inhalación. | R54 Tóxico para la flora. |
| R21 Nocivo en contacto con la piel. | R55 Tóxico para la fauna. |
| R22 Nocivo por ingestión. | R56 Tóxico para los organismos del suelo. |
| R23 Tóxico por inhalación. | R57 Tóxico para las abejas. |
| R24 Tóxico en contacto con la piel. | R58 Puede provocar a largo plazo efectos negativos en el medio ambiente. |
| R25 Tóxico por ingestión. | R59 Peligroso para la capa de ozono. |
| R26 Muy tóxico por inhalación. | R60 Puede perjudicar la fertilidad. |
| R27 Muy tóxico en contacto con la piel. | R61 Riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto. |
| R28 Muy tóxico por ingestión. | R62 Posible riesgo de perjudicar la fertilidad. |
| R29 Emite gases tóxicos en contacto con agua. | R63 Posible riesgo durante el embarazo de efectos adversos para el feto. |
| R30 Puede inflamarse fácilmente durante el uso. | R64 Puede perjudicar a los niños alimentados con leche materna. |
| R31 Emite gases tóxicos en contacto con ácidos. | R65 Nocivo. Si se ingiere puede causar daño pulmonar. |
| R32 Emite gases muy tóxicos en contacto con ácidos. | R66 La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel. |
| R33 Peligro de efectos acumulativos. | R67 La inhalación de vapores puede provocar somnolencia y vértigo. |
| R34 Provoca quemaduras. | R68 Posibilidad de efectos irreversibles. |

Frases S (Safety Phrases) indican precauciones de seguridad

- S1 Manténgase el recipiente bien cerrado.
- S2 Manténgase el recipiente en lugar seco.
- S3 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
- S4 Manténgase lejos de locales habitados.
- S5 Consérvese en... (líquido apropiado a especificar por el fabricante).
- S6 Consérvese en... (gas inerte apropiado a especificar por el fabricante).
- S7 Manténgase el recipiente bien cerrado.
- S8 Manténgase el recipiente en lugar seco.
- S9 Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado.
- S12 No cerrar el recipiente herméticamente.
- S13 Manténgase lejos de alimentos, bebidas y piensos.
- S14 Consérvese lejos de... (materiales incompatibles a especificar por el fabricante).
- S15 Conservar alejado del calor.
- S16 Conservar alejado de toda llama o fuente de chispas –No fumar–.
- S17 Manténgase lejos de materiales combustibles.
- S18 Manipúlese y ábrase el recipiente con prudencia.
- S20 No comer ni beber durante su utilización.
- S21 No fumar durante su utilización.
- S22 No respirar el polvo.
- S23 No respirar los gases/humos/vapores/aerosoles (denominación/es adecuada/s a especificar por el fabricante).
- S24 Evítese el contacto con la piel.
- S25 Evítese el contacto con los ojos.
- S26 En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acuda a un médico.
- S27 Quítese inmediatamente la ropa manchada o salpicada.
- S28 En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con... (productos a especificar por el fabricante).
- S29 No tirar los residuos por el desagüe.
- S30 No echar jamás agua a este producto.
- S33 Evítese la acumulación de cargas electrostáticas.
- S35 Elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
- S36 Úsese indumentaria protectora adecuada.
- S37 Úsense guantes adecuados.
- S38 En caso de ventilación insuficiente, úsese equipo respiratorio adecuado.
- S39 Úsese protección para los ojos / la cara.
- S40 Para limpiar el suelo y los objetos contaminados por este producto, úsese... (a especificar por el fabricante).
- S41 En caso de incendio y/o de explosión, no respirar los humos.
- S42 Durante las fumigaciones/pulverizaciones, úsese equipo respiratorio adecuado (denominación/es adecuada/s a especificar por el fabricante).
- S43 En caso de incendio, utilizar... (los medios de extinción los debe especificar el fabricante). (Si el agua aumenta el riesgo, se deberá añadir: "No usar nunca agua").
- S45 En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstrole la etiqueta).
- S46 En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrole la etiqueta o el envase.
- S47 Consérvese a una temperatura no superior a ...°C (a especificar por el fabricante).
- S48 Consérvese húmedo con ... (medio apropiado a especificar por el fabricante).
- S49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen.
- S50 No mezclar con ... (a especificar por el fabricante).
- S51 Úsese únicamente en lugares bien ventilados.
- S52 No usar sobre grandes superficies en locales habitados.
- S53 Evítese la exposición, recábense instrucciones especiales antes del uso.
- S56 Elimínense esta sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.
- S57 Utilícese un envase de seguridad adecuado para evitar la contaminación del medio ambiente.
- S59 Remítirse al fabricante o proveedor para obtener información sobre su recuperación/reciclado.
- S60 Elimínense el producto y su recipiente como residuos peligrosos.
- S61 Evítese su liberación al medio ambiente. Recábense instrucciones específicas de la ficha de datos de seguridad.
- S62 En caso de ingestión no provocar el vómito: acúdase inmediatamente al médico y muéstrole la etiqueta o el envase.
- S63 En caso de accidente por inhalación, alejar a la víctima fuera de la zona contaminada y mantenerla en reposo.
- S64 En caso de ingestión, enjuagar la boca con agua (solamente si la persona está consciente).

Combinación de frases S

- S1/2 Consérvese bajo llave y manténgase fuera del alcance de los niños.
- S3/7 Consérvese el recipiente bien cerrado y en lugar fresco.
- S3/9/14 Consérvese en lugar fresco y bien ventilado y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
- S3/9/14/49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen, en lugar fresco y bien ventilado y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
- S3/9/49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen, en lugar fresco y bien ventilado.
- S3/14 Consérvese en lugar fresco y lejos de ... (materiales incompatibles, a especificar por el fabricante).
- S7/8 Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar seco.
- S7/9 Manténgase el recipiente bien cerrado y en lugar bien ventilado.
- S7/47 Manténgase el recipiente bien cerrado y consérvese a una temperatura no superior a ...°C (a especificar por el fabricante).
- S20/21 No comer, ni beber, ni fumar durante su utilización.
- S24/25 Evítese el contacto con los ojos y la piel.
- S27/28 Después del contacto con la piel quítese inmediatamente toda la ropa manchada.
- S29/35 No tirar los residuos por el desagüe; elimínense los residuos del producto y sus recipientes con todas las precauciones posibles.
- S29/56 No tirar los residuos por el desagüe; elimínese esa sustancia y su recipiente en un punto de recogida pública de residuos especiales o peligrosos.
- S36/37 Úsense indumentarias y guantes de protección adecuados.
- S36/37/39 Úsense indumentaria y guantes adecuados y protección para los ojos/la cara.
- S36/39 Úsense indumentaria adecuada y protección para los ojos / la cara.
- S37/39 Úsense guantes adecuados y protección para los ojos / la cara.
- S47/49 Consérvese únicamente en el recipiente de origen y a temperatura no superior a ...°C (a especificar por el fabricante).

BIBLIOGRAFÍA

- www.merck.de/spain
- <http://www.estrucplan.com.ar/index.asp> <http://www.estrucplan.com.ar/Legislacion/Ciudad%20Autonoma/Leyes/Ley00154.asp>
- <http://www.inti.gov.ar>
- <http://www.vrid.usach.cl/ima/buenambiente/REALINVENT7.htm>
- <http://pcc105.quimica.uniovi.es/quimiorq/seguridad/portada.htm>
- Histoinforme -Año XV- Volumen II – 2004.
- Histoinforme. Año XVI- Volumen I- 2005
- Revista de la Sociedad Argentina de Histotecnología.Vol 17. N°2. 2006. Alteraciones de individuos expuestos al xilol
- Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales. España.
- <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspnsyna.htm#top>
- Universidad Politécnica de Valencia. <http://www.sprl.upv.es> http://www.sprl.upv.es/pdf/IOP_SQ_04.pdf
- Curso Teórico-Práctico de Citología Hospital de Clínicas “José de San Martín”.2006
- <http://www.mtas.es/insht/ipcsnspn/nspnsyna.htm#top>
- http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/United_States/Safety_Information.html

Referencias

- HT Norma Pozzo / Servicio de Patología del Hospital “J. P. Garrahan” / Ciudad Autónoma de Buenos Aires / Argentina / patologia@garrahan.gov.ar

INDICE

Módulo 1. FIJACION Y MEZCLAS FIJADORAS	3
Fijación Tisular • <i>Cristina T. Chaves / Mónica Elizabaraz</i>	5
Decalcificación • <i>Cristina Chaves</i>	16
Formas y técnicas de inclusión en parafina. Orientación de muestras • <i>Patricia Alejandra Aragón</i>	19
Fundamentos Básicos de las Tinciones Histológicas. (Técnicas Anhilínicas, Impregnaciones Argénticas e Histoquímica)	
Parte I • <i>Hernán Javier Aldana Marcos</i>	23
Parte II • <i>Cristina Chaves</i>	33
<i>Hernán Javier Aldana Marcos / Crisdтина Chaves</i>	40
Módulo 2. CITOLOGÍA	45
Bioseguridad y manejo de material • <i>Sandra M. Noya Lamas</i>	47
Obtencion de muestras y material no ginecológico • <i>Lilian B. Pisilli</i>	56
Aparato Respiratorio - Citopreparación • <i>Patricia A. Aragón</i>	71
Módulo 3. INMUNOHISTOQUÍMICA	77
Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica • <i>Norma Pozzo / Sandra Camarero</i>	79
Principios Básicos de la Inmunohistoquímica. Definiciones y conceptos,	
Reconversión antigénica, Protocolo básico de inmunomarcación • <i>Cristina Chaves</i>	84
Fijación, decalcificación y procesado adecuados para la conservación de antígenos tisulares	
<i>Ht. Cristina T. Chaves / Ht. Mónica Elizabaraz</i>	96
Inmunohistoquímica en material citológico: "La importancia de la fijación y el procesado" • <i>Ht. Cristina T. Chaves</i>	102
Efectos de la fijación y Sistemas de Rescate Antigénico • <i>Hernán J. Aldana Marcos</i>	106
Métodos de Rescate Antigénico: Fundamento y Generalidades • <i>HT. Norma Pozzo. HT. Sandra Camarero</i>	111
Protocolos Básicos de Rescate Antigénico • <i>HT. Cristina Chaves / HT. Norma Pozzo</i>	114
Protocolo Básico de Inmunohistoquímica • <i>Curso de Inmunohistoquímica SAH</i>	117
Módulo 4. BIOSEGURIDAD	119
Bioseguridad en los Laboratorios de Histotecnología • <i>Norma Pozzo</i>	121
Módulo 5. BIOSEGURIDAD	129
Técnicas	131

Diseño • Impresión
ingridrecchia@gmail.com

Se terminó de imprimir en Abril de 2007
Ciudad Autónoma de Buenos Aires • Argentina

HISTOTECNOLOGÍA

