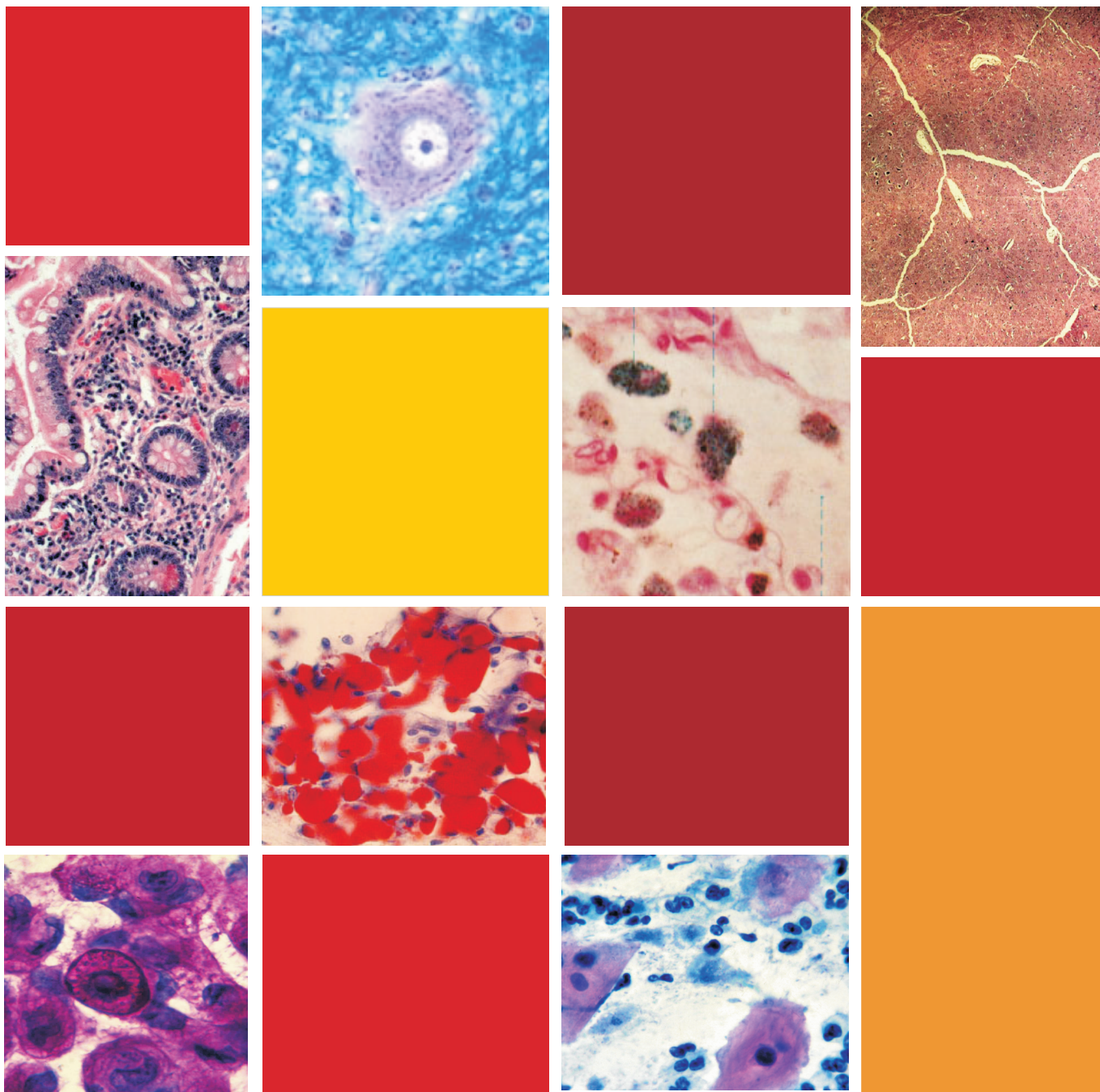


PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS BÁSICAS APLICADAS A LA HISTOTECNOLOGÍA II.



ENCUENTRO REGIONAL DE HISTOTECNOLOGIA 2009



Desde 1996 estamos al servicio de la venta,
asesoramiento y mantenimiento de equipos
en el área de la histopatología.

Somos representantes en
Argentina de:

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA CM1850

El criostato con desinfección UVC
para la histología de rutina y la
patología clínica

Deán Funes 427 (C1214AAC). Cap. Fed. Bs.As. Argentina.
Tel.: (54)011-4931-6439 L. Rot.
www.luismarsan.com.ar - e-mail: lmarsan@speedy.com.ar

Curso teórico práctico de procedimientos y técnicas básicas aplicadas a la histotecnología II

23,24 y 25 de Abril de 2009

"Hospital Niño Jesús" Pasaje Hungría 750, San Miguel de Tucumán

PROGRAMA DE ACTIVIDADES

Jueves 23 de Abril:

- 12 a 13 Inscripción y entrega de credenciales.
13 a 14 Apertura del curso.
14 a 14.30 Leica Microsystems: "El líder en microtomía".
- 14.30 a 19 Temas a desarrollar:
Citología: Bioseguridad: reglas básicas de protección. Obtención y remisión de muestras.
Tratamiento de muestras no ginecológica.
Respiratorio: esputo y lavados bronquiales. Punciones.
Líquidos: ascítico, pericárdico, peritoneal, ovario, LCR, otros.

Viernes 24 de abril :

- 9 a 13 Temas a desarrollar:
Fijación. Reconstitución de tejidos desecados.
Decalcificación.
Procesamiento, y orientación de muestras.
- 13 a 15 ALMUERZO.
15 a 19 Práctico supervisado por los docentes: Aplicación de los contenidos teóricos vistos en la mañana.

Sábado 25 de Abril

- 9 a 13 Fundamentos básicos de técnicas para médula ósea y ganglio linfático HyE, PAS, Retículo y Giemsa.
13 a 15 ALMUERZO.
15 a 1830 Práctico supervisado por los docentes: Aplicación de los contenidos teóricos vistos en la mañana.
Coloración de: HyE, Giemsa y Reticulo. Observación y reconocimiento de estructuras histopatológicas. Evaluación de procedimientos y técnicas aplicadas en el curso.
- 1830 a 19 Cierre del Curso. Entrega de certificados.

Docentes:

Prof. Dr. Hernán J. Aldana Marcos. Dr. en Biología, Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Belgrano de Buenos Aires y Profesor Titular de la Cátedra de Histología, Embriología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Morón, Provincia de Buenos Aires.

HT. Norma Pozzo. Servicio de Patología. Hospital de Pediatría J. P. Garrahan. CABA

HT. CT. Patricia Aragón, Departamento de Patología del Hospital de Clínicas José de San Martín. CABA

Ayudantes de los Trabajos Prácticos:

Daniel Iñigo, Karina Andrea Rocca . Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Niño Jesús. San Miguel de Tucumán.

La Sociedad Argentina de Histotecnología agradece a:

Leica Microsystem de Alemania y a su representante exclusivo en Argentina, el Sr. Luis Marsan.

Dra. Conejos, Dra. Paz, Daniel Iñigo, Karina Rocca. Personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital del Niño Jesús. San Miguel de Tucumán.

Prof. Dr. Hernán Aldana Marcos.

Autoridades del Hospital del Niño Jesús, San Miguel de Tucumán.

Autoridades y personal del SIPROSA y Ministerio de Salud de la Provincia de Tucumán.



Luis Marsan

Deán Funes 427 (C1214AAC)
Cap. Fed. Bs.As.- Argentina
Tel.:(54) 011 4931-6439 L.Rot
www.luismarsan.com.ar



LEICA EG1150

Sistema de inclusión
de tejidos modular

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA EG1160

Centro de inclusión de tejidos
compacto y programable

Leica
MICROSYSTEMS

www.luismarsan.com.ar

1.

PRINCIPIOS BÁSICOS SOBRE: FIJACIÓN, DECALCIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO. (pag. Nº 7 - 17)

Ht. Cristina T. Chaves

INCLUSIÓN EN PARAFINA. ORIENTACIÓN DE MUESTRAS. (pag. Nº 18 - 23)

Ht. Ct. Patricia Alejandra Aragón

FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS (TÉCNICAS ANILÍNICAS, IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS E HISTOQUÍMICA). (PARTE I) (pag. Nº 24 - 28)

Prof. Dr. Hernán Javier Aldana Marcos

FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS (TÉCNICAS ANILÍNICAS, IMPREGNACIONES ARGÉNTICAS E HISTOQUÍMICA). (PARTE II) (pag. Nº 29 - 35)

Ht. Cristina Chaves

TEORÍA DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS. (pag. Nº 36 - 47)

Prof. Dr. Hernán Javier Aldana Marcos



LEICA RM2125RT

Micrótopo de rotación para la histología clínica de rutina.

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA RM2245

El micrótopo de rotación más eficaz en el corte semimotorizado.

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA RM2255

El primer micrótopo, dos en uno para satisfacer las máximas exigencias.

Leica
MICROSYSTEMS

PRINCIPIOS BÁSICOS SOBRE: FIJACIÓN, DECALCIFICACIÓN Y PROCESAMIENTO

Nota:

“La presente sección del cuadernillo contiene una recopilación de varios autores que han colaborado con sus manuscritos y/o charlas en eventos científicos de la Sociedad Argentina de Histotecnología, la Sociedad Argentina de Patología y la Sociedad Argentina de Citología.

Si bien en casi su totalidad, tiene un enfoque hacia la Inmunohistoquímica, consideramos importante incluirlo sin modificaciones ya que en muchas ocasiones, los tejidos requieren de estas técnicas independientemente del laboratorio donde se realicen. Por lo tanto, es fundamental preservar la morfología y la antigenicidad de la muestra.

FIJACION

Proceso físico o químico por el cual se interrumpe la degradación (autólisis) que aparece tras la muerte celular. Tiene como fin conservar la arquitectura y composición del tejido lo más parecido a como se encontraba en el organismo vivo

TIPOS DE FIJACIÓN DE ACUERDO A LAS CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO

Fijación histológica o citológica:

Dirigida a conservar arquitectura y estructura de tejidos y células sin considerar cambios moleculares inducidos sobre sus componentes bioquímicos

Fijación histoquímica:

Dirigida a preservar composición molecular y bioquímica de los tejidos por sobre los detalles morfológicos celulares

SEGÚN SU MECANISMO DE ACCIÓN

Fijación por métodos Físicos

CONGELACIÓN: enfriamiento de por lo menos -50°C o menos, como método para detener la autólisis y la putrefacción tisular.

Es el método elegido para realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiere conservar intacta la estructura proteica o antigénica del tejido o su contenido enzimático.

El congelado debe ser instantáneo y realizarse inmediatamente.

El congelado lento provoca la formación de microcristales intratisulares de hielo que pueden agregarse con el paso del tiempo y producir rotura y laceración tisular.

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.

Fijadores por métodos Químicos

Son generalmente en forma líquida.

Actúan desnaturalizando e insolubilizando las proteínas tisulares.

Bloquean la autólisis por inactivación enzimática.

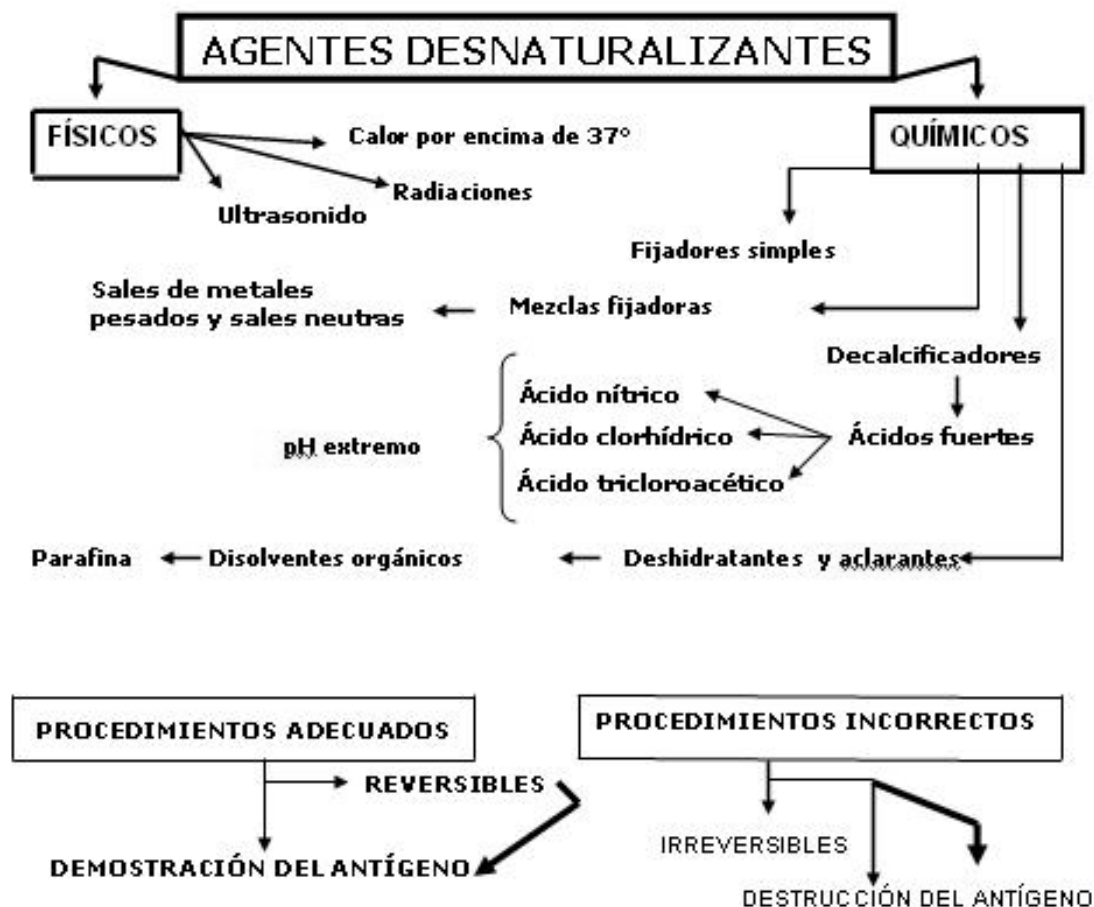
Impiden el crecimiento bacteriano.

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
- Velocidad de penetración: rapidez con la que un fijador se difunde en el interior de un tejido. Por lo tanto el tamaño de la pieza a fijar deberá ser directamente proporcional a la velocidad de penetración del fijador. Hay que tener muy en cuenta éste 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.
- 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.



- Los fenómenos irreversibles de desnaturalización provocan una total pérdida de la actividad biológica.
- Si bien el proceso de fijación para microscopía óptica, altera la estructura terciaria y cuaternaria de una proteína, difícilmente altera la estructura secundaria mientras que la primaria se mantiene conservada, por lo tanto, los fenómenos de desnaturalización causados, son generalmente reversibles.
- Es **FUNDAMENTAL** que en los procedimientos histológicos de fijación histológica o citológica, **NO SE PROVOQUE UNA DESNATURALIZACIÓN IRREVERSIBLE QUE DAÑE LA INMUNORREACTIVIDAD ANTIGÉNICA.**
- La impericia en el tratamiento de las muestras, puede provocar un daño irreparable en la demostración del antígeno.

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN, DECALCIFICACIÓN, PROCESADO E INCLUSIÓN SOBRE LOS ANTÍGENOS

- En toda técnica de inmunomarcación, es de vital importancia, preservar el antígeno a demostrar.
- La fijación de un tejido o material en estudio, dependerá de la labilidad y concentración del antígeno en la muestra.
- Como frecuentemente desconocemos a priori estos parámetros, debemos seguir métodos adecuados tanto de fijación como de descalcificación, procesados e inclusión.

A continuación desarrollaremos algunos conceptos y fundamentos de estos procedimientos, aplicados a la conservación apropiada del antígeno.

EFFECTOS DE LA FIJACIÓN SOBRE LOS ANTÍGENOS

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.
- UN DEFECTO DE FIJACIÓN JAMÁS PUEDE SER CORREGIDO.
- Es inútil realizar cualquier estudio histológico sobre un material con graves defectos de fijación.

FIJACIÓN CON FORMALDEHÍDO:

El extendido uso del formol como fijador de rutina se debe a su fácil elaboración, bajo costo y excelente preservación de la morfología.

Aunque el mecanismo 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, lípidos 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 manera mantiene la forma de la célula, la unión entre células y la unión y estabilidad de la matriz extracelular.

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 *epitope es conformacional* (3D) altera la región antigénica o la enmascara. En los casos donde el *epitope es lineal* (secuencia lineal de aminoácidos) puede enmascarar la región antigénica. Por lo tanto para ambos casos se necesita la recuperación antigénica.

El formaldehído penetra con relativa lentitud. Al principio, la cantidad de formaldehído es escasa, pero a medida que se une **covalentemente** a las proteínas, se produce mas formaldehído a partir de la solución fijadora, continuando la fijación. De ahí 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 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, si la muestra es grande, (resecciones quirúrgicas, órganos completos, etc.) 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.

En consecuencia de lo expuesto, **el tiempo de fijación será directamente proporcional al tamaño de la muestra.**

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 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 7 a 10 minutos a bajas potencias (potencia 3 a 4 como máximo) y a temperaturas que no excedan los 40° a 50°C. **Sin embargo en base a nuestra experiencia, la utilización del horno microondas para la fijación y procesamiento de biopsias quedará circunscripta a técnicos altamente calificados en éstos procedimientos.**⁽⁵⁾ El peligro de un calentamiento fuerte que destruya los sitios antigénicos es irreversible; en la creencia de un procedimiento rápido para el diagnóstico, podemos alterar una muestra de tal manera, que su demostración inmunohistoquímica sea inviable.

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.

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).

OTROS FIJADORES UTILIZADOS COMÚNMENTE:

FIJADORES POR DESHIDRATACIÓN TISULAR:

Todos éstos fijadores son sustancias altamente higroscópicas que liberan el agua libre y la ligada a moléculas. Los fijadores alcohólicos como el metanol, el etanol, la acetona y el cloroformo, 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 (epitope lineal), son fijadores ideales. La acetona, el etanol 100° y el metanol son poco penetrantes y endurecen los tejidos, se los utiliza generalmente para frotis o secciones de criostato. Sin embargo, todos los fijadores alcohólicos tienen un pH neutro, lo que constituye una gran ventaja en éste tipo de técnicas. En particular la acetona altera muy poco la estructura antigénica, es altamente recomendable para la fijación de frotis hematológicos. 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.

Dentro de éste grupo de fijadores, se encuentra el alcohol 96° que es el más utilizado en extendidos citológicos. Algo a tener en cuenta cuando utilizamos éste fijador, es justamente que destruye los puentes hidrofóbicos. Si el epitope es conformacional puede alterar o enmascarar la región antigénica. Existen técnicas modificadas de reconversión antigénica que apuntan a reconformar estos epitopes alterados por la fijación con 96°. En cuanto al cloroformo que puede ser utilizado en mezclas fijadoras o como líquido intermediario en la inclusión con parafina, también tiene una aplicación de reconformación de epitopes en extendidos.

GLUTARALDEHÍDO:

Este fijador forma más uniones cruzadas que el formaldehído, causando desnaturalización de las proteínas por alteración de la estructura alfa hélice, por ese motivo, no se lo usa en inmunohistoquímica. Sin embargo, fija rápidamente y junto al tetróxido de osmio son los fijadores por excelencia para microscopía electrónica. Un aspecto a tener en cuenta con respecto a éste fijador es la fijación primaria en la que se lo utiliza, para técnicas aplicadas a patologías de nervio periférico. A mayor exposición a la acción del glutaraldehído, menor será la posibilidad de demostrar antígenos, ya que produce gran cantidad de enlaces por puente metileno y la reconversión antigénica resulta dificultosa.

Recomendamos que si se han de requerir estudios de inmunohistoquímica sobre éste tipo de patologías, nos asesorem con técnicos altamente calificados y especializados en éstas técnicas.

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. Es un excelente fijador estructural que conserva la composición proteica de los tejidos convenientemente, por tanto, si se lo usa adecuadamente, de buena aplicación para técnicas de inmunohistoquímica. Es el fijador de elección (junto al formol buffereado) para médula ósea en nuestro medio. Además por su poder decalcificador, es frecuente utilizarlo para descalcificación de hueso esponjoso, en estos casos deberemos tomar delicados recaudos. (Ver indicaciones en la siguiente página).

UTILIZACIÓN DEL BOUIN COMO FIJADOR:

- ~ Tiempo de fijación: 4 a 24 hs como máximo, según el tamaño de la pieza.
- ~ Lavados abundantes en alcohol 70° hasta la decoloración total de la muestra, para asegurar la eliminación completa de ácido pícrico.

Desafortunadamente, por ignorancia, empecinamiento o franca negligencia, en muchos casos no se siguen los procedimientos básicos de fijación en mezclas que contengan ácido pícrico.

Lo que en varias oportunidades suele ocurrir en los laboratorios donde se utiliza el líquido de BOUIN, es lo siguiente:

- Excederse en el tiempo máximo de fijación al usarlo como decalcificador, tornando a la muestra extremadamente quebradiza al corte, provocando una severa distorsión morfológica Y UN DECREMENTO DE LA INMUNOREACTIVIDAD.
- Lavar en agua antes del procesado provocando fenómenos osmóticos que alteran la inmunorreactividad y la morfología tisular.
- Dejar restos de ácido pícrico en los lavados postfijación, provocando una acción continua del ácido que perdura en el tiempo, aún en la muestra ya incluida en parafina.

INDICACIONES EN LA UTILIZACIÓN DEL LÍQUIDO DE BOUIN:

- Es uno de los mejores fijadores para la conservación proteica, si lo usamos correctamente, arribaremos a resultados óptimos.
- Respetemos a nuestros próceres de la técnica histológica, que han fundamentado sobradamente, las ventajas y desventajas en la utilización del ácido pícrico.
- Cuando usamos líquido de Bouin, sigamos los procedimientos adecuados de fijación y postfijación.
- Si por razones ajenas a nuestra voluntad, conciencia y criterio técnico debemos decalcificar en Bouin, controlemos la descalcificación al menor tiempo posible de exposición al ácido pícrico.
- Lavemos abundantemente en alcohol 70° u 80° hasta la decoloración total de la muestra, antes de colocarlo en alcohol 96° para su posterior procesado.
- Jamás se nos ocurra cometer la imprudencia de enjuagar en agua, concluida la fijación.

Otras mezclas a base de ácido pícrico son el fijador de Bouin- Hollander que contiene acetato de cobre, utilizado también como decalcificador en hueso esponjoso y el fijador de Duboscq Brasil (Bouin alcohólico), empleado en punciones renales. Las mismas recomendaciones descriptas para el Bouin corresponden para éstas mezclas.

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 B5.

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.

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 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 sólo, 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 cuadro 1 que se representa a continuación, está basado en una modificación de guías de Taylor, Battifora y otros autores, sobre la base de la experiencia de nuestro Laboratorio:

PRESERVACIÓN DE LA INMUNORREACTIVIDAD:

Calidad de preservación	Fijador
Buena	Formol neutro, B5, Fish, Zinc Formol, Bouin, Alcoholes
Intermedia	Formol pH ácido, Bouin usado como decalcificador, Duboscq-Brasil, Zenker, Helly, Zamboni
Mala	Fijadores oxidantes, dicromatos, permanganatos ácidos.

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 desnaturalización de la estructura secundaria.

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 42°C. De fijar una muestra a éstas temperaturas, se tendrá especial cuidado en el tiempo.

DECALCIFICACIÓN ADECUADA EN INMUNOHISTOQUÍMICA:

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 tisulares y no se arribará a un diagnóstico apropiado, más aún si se requieren estudios posteriores de inmunohistoquímica.

Existen dos tipos mayores de agentes decalcificantes: agentes ácidos y quelantes.

1- Agentes Ácidos:

Ácido Nítrico:

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 antigénica. Varios autores antes del advenimiento de la inmunohistoquímica proponían concentraciones acuosas del 7 al 7.5 %, indicando detalladamente el método de neutralización post-decalcificación.

En este punto citamos a García del Moral (1993):

- Formula utilizarlo al 5% en solución acuosa y observa: "En caso de que la solución sea alcohólica, la proporción de ácido nítrico debe ser del 7.5%. Tiempo medio de decalcificación para un bloque óseo de **5 mm de espesor de 12 a 24 hs**".

Basándonos en nuestras indagaciones, los problemas de reconocimiento del antígeno en una muestra tratada con ácido nítrico se sustentan en las siguientes razones:

- Es frecuentemente usado para decalcificar cabeza femoral, pero en forma incorrecta.
 - No se tiene en cuenta que el hueso esponjoso es extremadamente lábil a ácidos tan fuertes.
 - Se prefiere insistir en la decalcificación del hueso compacto, para facilitar los cortes.
 - Se lo utiliza en soluciones acuosas de concentraciones altas.
 - El espesor de bloque no es el indicado, sea por insuficiente pericia al pasar la sierra por el residente y/o anatomopatólogo, sea por adjudicar la tarea a personal no competente para éste procedimiento.
 - Debido al excesivo espesor, el tiempo de exposición supera ampliamente al máximo permitido.
 - La suspensión de la muestra en una gasa para decantar los depósitos cálcicos y evitar la saturación del líquido decalcificador, no se respeta.
 - No se agita ni se cambia la solución decalcificadora para acelerar el proceso.
 - Se reemplaza el proceso de aceleración por un calentamiento de la muestra por encima de los 30°C,
- HORRORES DE PROCEDIMIENTO QUE TERMINAN ARRUINÁNDOLA.**
- La neutralización del ácido es escasa o **NULA**.
 - ETC, ETC, ETC,...

Pero entonces, ustedes se preguntarán, si el ácido nítrico es lo peor que existe en el planeta tierra para decalcificar... ¿No?

ES BUENO, PERO PELIGROSO. HAY QUE SABER UTILIZARLO:

- Es fuerte, potente y rápido, (suficientemente acelerado de por sí, como para que nosotros lo aceleremos aún más).
- Se puede utilizar en hueso compacto pero si existe hueso esponjoso en la muestra, no superemos porcentajes inadecuados. Recomendamos el 6% a 7% como máximo en soluciones acuosas.
- El tiempo de decalcificación es directamente proporcional al espesor de la muestra.
- La suspensión de la muestra es altamente recomendable, aunque en algunos casos la pericia del operador (anatomopatólogos o residentes o técnicos entrenados en macroscopía patológica), permite un espesor tan fino que a las pocas horas se completó la decalcificación.
- **Respetemos el tiempo del proceso anterior “la fijación”, que en varias circunstancias, dependiendo del tamaño de la pieza, DEBE ser larga, aunque se produzcan muchos enlaces covalentes.**
- **El proceso de decalcificación con ácido nítrico es lo suficientemente agresivo, como para superar los efectos causados por la alteración de las estructuras proteicas del formaldehído, entonces completemos la fijación antes de iniciar la decalcificación.**
- **En esos casos, el histotécnico a cargo de la fijación de piezas óseas de gran tamaño debe “REGISTRAR” la fecha de inicio y finalización del tiempo de fijación, facilitando así, los métodos de reconversión antigénica que correspondan.**

ÁCIDO CLORHÍDRICO:

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, sin alterar demasiado las demostraciones inmunohistoquímicas.

ÁCIDOS DÉBILES:

Los ácidos débiles como el fórmico, producen escasos artefactos tisulares e interfieren poco en los resultados finales de la inmunomarcación. Como actúan lentamente, requieren la renovación frecuente del líquido decalcificador. Se puede combinar las ventajas de ácidos débiles y fuertes en mezclas decalcificantes tales como fórmico-clorhídrico, para adquirir rapidez, morfología e inmunorreactividad adecuada.

2- AGENTES QUELANTES:

El agente quelate más empleado como técnica de descalcificación es el EDTA (ácido etilendiaminotetracético). Aunque se lo llama ácido no actúa como ácido sino que captura iones metálicos, fundamentalmente el calcio. Su acción es muy lenta, pero tiene como beneficio tener poco o ningún efecto sobre otros elementos del tejido, es más, algunas enzimas tisulares se mantienen activas luego de la decalcificación con EDTA. Por ello algunas mezclas son adicionadas con formol.

EL PROCESO DE FIJACIÓN:

Como ya hemos expuesto anteriormente, 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 bufferado, 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 éstos 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 ADECUADA CONSERVACIÓN ANTIGÉNICA SON:

1. EDTA
2. Ácido fórmico
3. Ácido fórmico - clorhídrico
4. Soluciones fijadoras con poder decalcificante que contengan pícrico (Bouin, Bouin Hollande, otras) con ciertas reservas:
 - a) Un máximo recomendable de exposición de no más de 24 horas.
 - b) Solo aplicable para cilindros pequeños con poco hueso compacto.
 - c) Lavar rigurosamente hasta desprendimiento total del color, para cortar la acción del ácido pícrico.

De los decalcificadores y mezclas decalcificantes anteriormente detallados, es sin lugar a dudas el EDTA el de preferencia para la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas. No siempre puede utilizarse, depende de la dureza del tejido y si se conoce, (por los datos e historia clínica del paciente), que serán necesarias técnicas inmunohistoquímicas.

Ex profeso, el ácido nítrico no ha sido mencionado, por la sencilla razón que es el menos indicado para éstas técnicas. No obstante, si requiere ser utilizado, insistimos en las recomendaciones explicitadas anteriormente, posibilitando la viabilidad de demostración antigénica. Su utilización deberá ser consultada a expertos en este tipo de procedimientos.

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 mieloide, 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 buffereado – Decalcificación en EDTA

Fijación en B5 – Decalcificación en EDTA

Fijación en formol buffereado, B5 o Helly - Decalcificación en ácido fórmico-clorhídrico

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 que corresponda a cada fijador, (con el fin de detener la acción fijadora), los pasos subsecuentes de deshidratación, la seguirán fijando, extendiendo un tiempo de fijación excesivo, que puede aumentar la posibilidad de decremento de inmunorreactividad.

Uno de los problemas más comunes con los que solemos enfrentarnos los técnicos que nos especializamos en inmunohistoquímica, es la maldita costumbre de cierta gente (por llamarla de alguna manera), que por diversas circunstancias (todas injustificables), procesa para el demonio (...). Nos expresamos así, de éste modo tan enfático, porque hay principios elementales que se supone deberíamos aprender en nuestros primeros conocimientos de la técnica histológica y que son los siguientes:

- Una vez concluida la deshidratación, debemos colocar las muestras en los agentes intermediarios, que se saturan de alcoholes con el paso del tiempo.
- La renovación de los solventes del procesado debe ser frecuente, de tal manera que ésa saturación no ocurra.
- Si un intermediario o aclarante esta saturado de alcohol es muy probable que se alteren en demasía o directamente se destruyan unas cuantas sustancias dentro de la muestra, además de los antígenos que se pretenden demostrar.
- LOS ALCOHOLES "HIERVEN" A 65°C - 70 °C, AUNQUE NOSOTROS NO NOS DEMOS CUENTA, LAS POBRES BIOMOLÉCULAS SÍ (claro que en sus últimos estertores, pues las hemos mandado a otra vida)...
- Igual o peor estropicio de biomoléculas, ocurre cuando algún lúcido trasnochado pasa directamente de los alcoholes a la parafina, sea porque se equivocó de líquido en el recipiente del procesador, sea porque se olvidó de pasar por los intermediarios o aclarantes, si el procesamiento es manual.
- Desafortunadamente, no es infrecuente que se deje en manos de personal que no está capacitado, estos procedimientos que por ser muy básicos no dejan de ser a la vez muy críticos.
- Es función y responsabilidad del HISTOTÉCNICO preservar una muestra para una correcta observación microscópica. (...)
- Semejantes desaciertos no deben ocurrir, cualquiera puede equivocarse, pero si extremamos las normas básicas de registro y atención, y si cumplimos con las tareas que nos corresponden (ni más ni menos que eso), las probabilidades y variables de error desaparecen.
- 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.
- Las zonas donde han quedado restos de agua, se desprenden sistemáticamente de los portaobjetos, aún de aquellos tratados con adhesivos especiales para las técnicas de inmunohistoquímica. En consecuencia con los lavados permanentes, la acción de enzimas proteolíticas o el sometimiento de los cortes al calor, las zonas desprendidas se pierden en los sucesivos pasos de la técnica y la evaluación de los resultados se torna imposible.

Bibliografía:

- Pearse, A.: Tratado de Histoquímica teórica y aplicada – Editorial Agilar 1960
- Martin D.; Mayer, P.; Rodell, V.: BIOQUÍMICA DE HARPER 9ª edición- Editorial El Manual Moderno – México D.F. 1984
- Molinolo, A.; Fernández Alonso, G.; Meiss, R; Sens, A.: Introducción a las Técnicas de Inmunohistoquímica – Editor E.Herr – Buenos Aires 1983
- García del Moral, R: Laboratorio de Anatomía Patológica. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill - Edición 1993-
- Aldana Marcos, H.: Efectos de la fijación y sistemas de rescate antigénico: Histoinforme Año XIV Vol 1 – Mayo 2003
- Della Speranza V. Concepts in Epitope Retrieval for Immunohistochemistry. Histologic. Vol. XXXIV, No. 2, Nov. 2001.
- Tomasi,V.; Manual teórico práctico del Taller de Inmunohistoquímica aplicada. Sociedad Argentina de Histotecnología -1998
- 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.
- Taylor,C; Cote,R; Inmunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist – Second Edition – W.B.Saunders Company Philadelphia 1994
- Battifora, H.: – Inmunohistochemistry in tumor diagnosis, Congreso Argentino de Patología: Mar del Plata 1992
- 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
- Chaves, C; Elizabaraz, M.: Fijación, decalcificación y procesamiento adecuados para la conservación de antígenos tisulares. 99:100:101.: Cuadernillo de Procedimientos y Técnicas Básicas aplicadas a la Histotecnología. Sociedad Argentina de Histotecnología – San Miguel de Tucumán – Mayo de 2007 –
- Narvaiz, M.: Filamentos intermedios – Curso Anual de Postgrado – Facultad de Medicina de la UBA y Sociedad Argentina de Histotecnología – año 2202
- Sapia, S.: Panel Básico de Inmunomarcación. – Curso Anual de Postgrado – Facultad de Medicina de la UBA y Sociedad Argentina de Histotecnología – año 2202
- Sapia,S.; Pena, E: Histofisiología del tejido linfático y médula ósea. Sociedad Argentina de Histotecnología – 22 de agosto de 2003 -
- Narvaiz, M.: Curso de Inmunohistoquímica – Sociedad Argentina de Histotecnología – Agosto 2006
- 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
- 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

INCLUSIÓN EN PARAFINA. ORIENTACIÓN DE MUESTRAS

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?.



EFECTO TIERRA SECA

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.

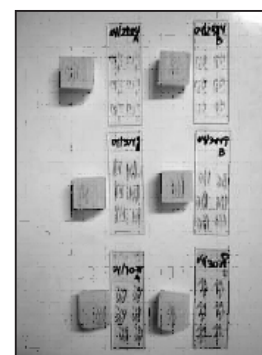
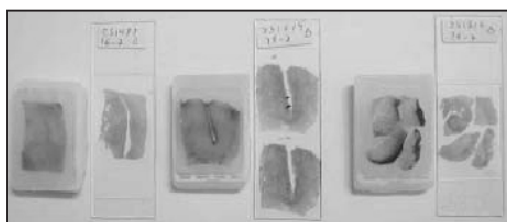
La dureza de la parafina está en función de la plasticidad más que del punto de fusión. El punto de plasticidad está unos pocos grados por debajo del punto de fusión y se define como "la temperatura más baja a la que puede ocurrir una deformación permanente sin fractura".

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 ó 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 o 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.

Ver figura 1 y 2 **PAGINA IMAGENES**

PROCEDIMIENTO DE INCLUSIÓN:

Hay diversas formas de confeccionar un taco o bloque.

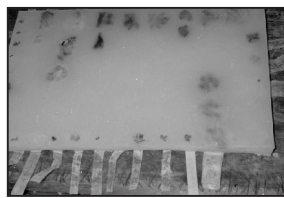
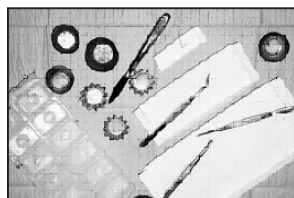
Antiguamente se utilizaban cajas de papel, barras de Leuckhart, moldes llamados “ravioleras”, cubeteras, moldes para tardeletas y todo lo que pudiera adaptarse para este fin.

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 **IMPRESINDIBLE** contar con una lupa para la orientación de biopsias pequeñas.



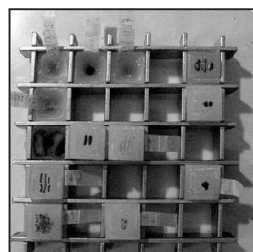
CUBETERA, MECHERO, ESPÁTULA, MOLDES PARA TARDELETAS, PINZAS, JARRO CON PARAFINA, CAJAS DE PAPEL



BIOPSIAS Y PIEZAS, PAN DE PARAFINA, TACOS PEGADOS EN MADERITAS



BARRAS DE LEUCKHART



RAVIOLERA

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 bancha 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 papelititos numerados.



CENTRO DE INCLUSIÓN



DISPENSADOR DE PARAFINA

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, etc.

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 biopsias 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 nervio
- 12.Etc.

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 descripto 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 electrocauterio, 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.

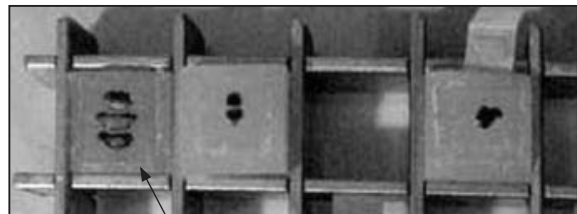
Asimismo la pieza deberá orientarse del tal modo que la parte más blanda del tejido se corte primero y la más dura o firme al final del proceso.

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.



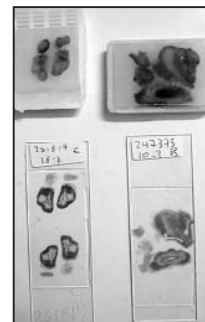
Indicación para
orientación



Margen de parafina para soporte
de corte

ESTRUCTURAS TUBULARES:

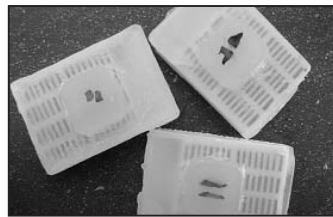
Las estructuras tubulares como los conductos deferentes, venas, arterias ó trompas de Falopio pueden ser incluidas de modo tal que la navaja corte a través de la luz o puede realizarse un corte perpendicular al eje largo del tubo, según se requiera.



SUPERFICIES EPITELIALES:

Los tejidos y superficies epiteliales como piel, intestino, vesícula biliar, vejiga urinaria, cuello uterino, etc., 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.



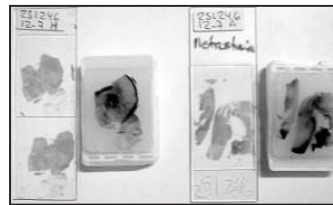
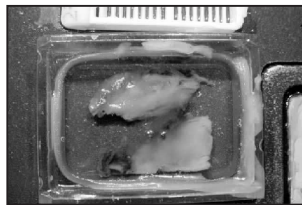
MUESTRAS GRANDES Y COMPACTAS:

Las muestras grandes de útero, próstata, tiroides, hueso, etc. 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.

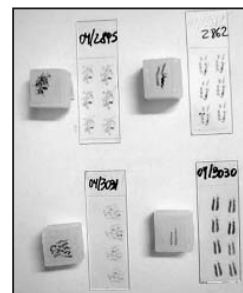
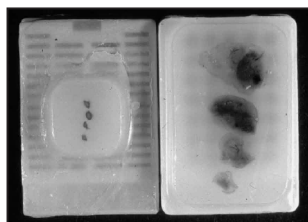


MUESTRAS MÚLTIPLES:

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.

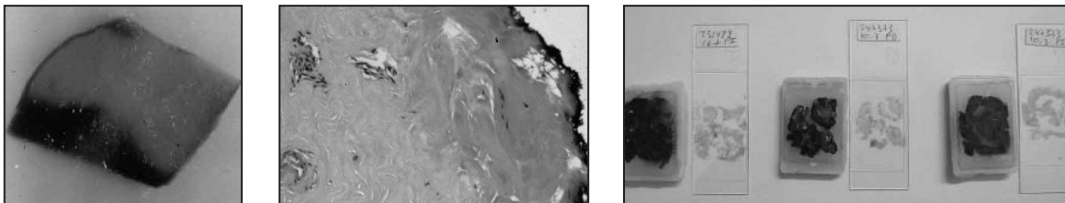


SUPERFICIES TEÑIDAS (TINTA CHINA) Y MÁRGENES:

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.

REFERENCIAS:

- 1- 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.
- 2- Laboratorio de Anatomía Patológica, Raimundo García del Moral
Publicado por: Interamericana de España - Mc Graw - Hill - 1993.

FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS (Técnicas anilínicas, impregnaciones argénticas e histoquímica).

PARTE I

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
 - Criofractura

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).

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**.

Detección de **hidratos de carbono**.

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).

TECNICAS HISTOQUÍMICAS PARA DETECTAR 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 sulfatadas o carboxiladas. Estos compuestos son muy comunes en algunas secreciones glandulares y en la matriz extracelular.

*El cuadro presentado en la **PAGINA IMAGENES** (Cuadro N°1) 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.*

TECNICAS UTILIZADAS PARA DETECTAR ACIDOS 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 ioduro 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 3 **PAGINA IMAGENES***

TECNICAS UTILIZADAS PARA DETECTAR LIPIDOS¹:

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.

*Ver figura 4 y 5 **PAGINA IMAGENES***

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).

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.

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 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 5 años que los huso 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 CRÍOSTATO:

A- SUDAN BLACK EN PROPILENGLICOL

Método:

1. Fijación en formol, formol calcio o en Bouin.

2. Cortes de crióstato 10 µm.

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 (salvo que se acabe.....)
4. Deshidratar los cortes 15' en propilenglicol.
5. 10' con la mezcla sudan propilenglicol.
6. 10' con la mezcla sudan propilenglicol.
7. Diferenciar en 85% de propilenglicol (mezcaldo con Agua)
8. Lavar varias veces con agua destilada.
9. 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. 90' en ácido perfórmico (Acido fórmico 98% 40 ml; H₂O₂ 30% 2ml; H₂SO₄ 0,5 ml).
3. Reactivo de Schiff (El mejor es el de Tomasi) 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. 1 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. 30' 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 son muy pocos los lípidos resistentes al procesamiento en 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 6 **PAGINA IMAGENES**

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 7 **PAGINA IMAGENES**

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.

FUNDAMENTOS BÁSICOS DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS

(Técnicas anilínicas, impregnaciones argénticas e histoquímica).

PARTE II

INTRODUCCION:

Como ya hemos visto podemos detectar en un preparado histológico a través de distintas técnicas, las siguientes estructuras:

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

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 (-NH₂), sulfhidrilo (-SH) y determinados iones metálicos derivados del hierro, cromo, aluminio, molibdeno, etc.

Anilinas modificadas:

- Metilación: ej.: Azul de metileno, cristal violeta, violeta de metilo
- Sulfonización: ej.: Fucsina ácida
- Reducción: Leucoanilinas (leucofucsina de Schiff)

Anilinas fluorescentes:

- Naranja de acridina
- Rodamina
- Rojo Congo
- Fluoresceínas (ej.: 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, etc.).
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 auxocromos catiónicos fuertemente básicos. Por esto se utilizan para colorear estructuras ácidas, por ejemplo los ácidos nucleicos. Colorantes: lacas de hematoxilina, fucsina básica, gallocianina, etc.

Colorantes Ácidos: son producto de la unión de un cromógeno de baja intensidad débilmente básico como grupos auxocromos ácidos que le confieren el carácter ácido al colorante. Tiñen estructuras básicas contenidas en los citoplasmas celulares. Colorantes: eosina, floxina, fucsina ácida, etc.

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: 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 la matriz extracelular y/o células con 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 negro 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 argentícas para detección de fibras nerviosas, astroglia, oligodendroglia, etc.

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.

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 u 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 el citoplasma y proteínas de la matriz extracelular 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 determinados por la unión de varios monosacáridos diferentes como los glicosaminoglicanos o por la unión de numerosos monosacáridos a moléculas diferentes a los hidratos de carbono (mucopolisacáridos, mucoproteínas y mucolípidos).

La técnica de PAS 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 fucsina básica (fucsina 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 **leucofucsina**:

- **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 fucsina básica) detectando los carbohidratos o biomoléculas asociadas a ellos **y proporciona un color rojo fucsia o magenta característico (Fucsina 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, etc.
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 ceroides 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. *Ver figura 8 PAGINA IMAGENES*

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 estos 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.

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.

Estas 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. *Ver figura 9*
PAGINA IMAGENES

DEMOSTRACIÓN DE MUCOPOLISACÁRIDOS ÁCIDOS:

Los mucopolisacáridos ácidos (MPSA) son polisacáridos que contienen grupos ácidos carboxílicos o sulfatados. Esta composición los diferencia de los mucopolisacáridos neutros (MPSN) co grupos hidroxilo en posición 1-2 glicol expuestos 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 sustancia básica, se liga a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando lugar a la formación de un compuesto salino, 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 ésta 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. *Ver figura 10* **PAGINA IMAGENES**

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
- **Microorganismos GRAM (+):** Azules - azul negriscos
- **Microorganismos GRAM (-):** Rojos
- **Bacilos ácido alcohol resistentes (B.A.A.R.):**
- **Bacilos Giemsa (+):** *Helicobacter pylori*
- **Hongos:** Técnica de **Grocott** con metenamina plata – PAS

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 apetencia mayor de lo común por el colorante 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: compuesta 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 metacarmático). *Ver figura 11 PAGINA IMAGENES*

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 y 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.

Ver figura 12 PAGINA IMAGENES

FUNDAMENTOS TÉCNICOS DE LOS TRICRÓMICOS

Los tricrómicos se basan en la utilización de diversas anilinas y se aplican fundamentalmente a la demostración de fibras del tejido conjuntivo, tejido muscular y 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 picrico, ponceau de xilidina, escarlata de Biebrich, etc.), mientras que los colorantes del conjuntivo son derivados del anillo trifenilmetano en solución coloidal y partículas groseras (fucsina ácida, azul de anilina, verde luz SF).

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 éstas 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 hematoxilas férricas.

Tricrómicos más utilizados

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

Ver figura 13 **PAGINA IMAGENES**

COLORACIONES PARA FIBRAS ELÁSTICAS

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

Están compuestas por un núcleo central de naturaleza proteica: la elastina, rodeado por un componente microfibrilar periférico: elastomucina (compuesto por numerosas proteínas como glicoproteínas microfibrilares asociadas, fibrilina, fibulina, etc.). 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 groseros 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

La técnica de impregnación argéntica de Gomori para la identificación de fibras reticulares es un tipo de impregnación argéntica en dos tiempos. Definamos primero éstos procedimientos:

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, etc., 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: la plata amoniacal, soluble en agua.



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. 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. Luego de la impregnación se utiliza como agente reductor el formol. Puede contrastarse suplementariamente con una impregnación de cloruro de oro al 2 por mil. *Ver figura 14 PAGINA IMAGENES*

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
- MANUAL DE PATOLOGIA 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/>

TEORÍA DE LAS TINCIONES HISTOLÓGICAS.

Objetivos:

- Indicar para qué sirven los colorantes en histopatología.
- Comprender qué es un colorante y por qué posee color
- Entender cuáles son las propiedades físicoquímicas de los colorantes.
- Comprender las diferentes teorías que explican el porqué de las tinciones histológicas más comunes (H-E, azul alcian, sudán, etc)
- Comprender los mecanismos y la utilidad de las técnicas argénticas.

1- ¿Para qué sirven los colorantes?

Necesitamos de los colorantes para ver con claridad los diferentes componentes en los tejidos. Recordemos que salvo raras excepciones como los eritrocitos y los melanocitos, las células y la matriz extracelular no tienen color. Además, los colorantes nos permiten diferenciar los componentes celulares (núcleo, citoplasma, gránulos secretorios, etc.) y de la matriz extracelular (colágeno, elásticas, amiloide, etc.) en secciones histológicas. Muchos de ellos son fundamentales para detectar alteraciones patológicas.

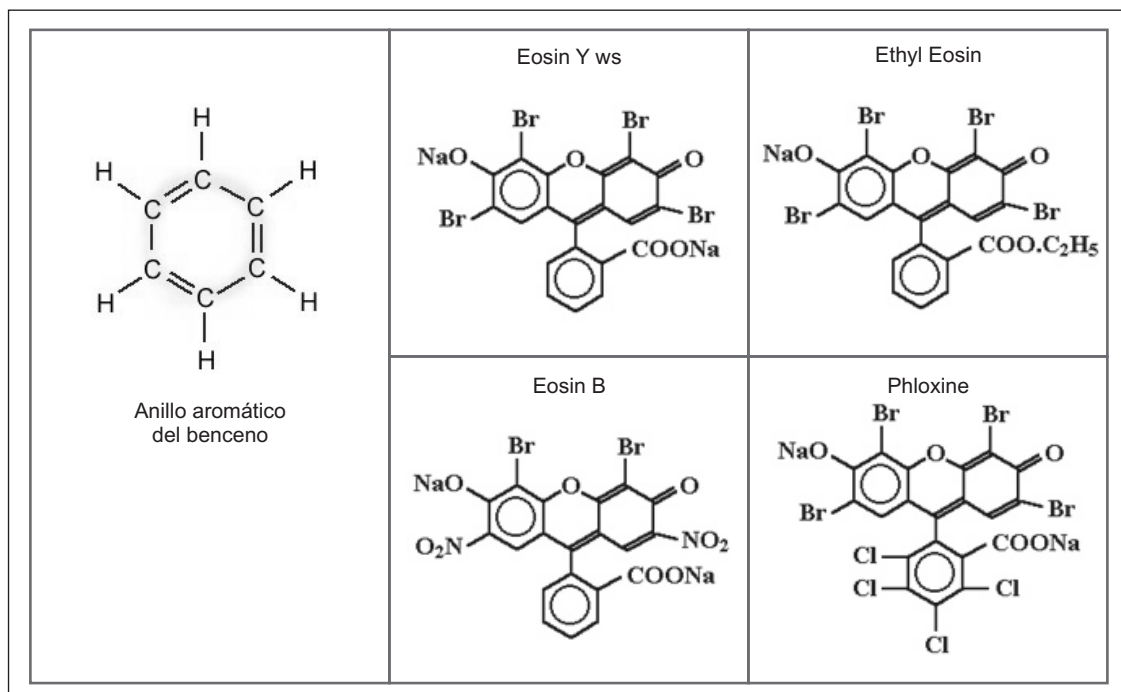
2- ¿Qué es un colorante? Propiedades físicoquímicas de los colorantes.

Los colorantes generalmente son moléculas orgánicas. Como tienen nombres simpáticos (verde luz, rojo congo, violeta cristal, etc), muchas veces el histotécnico no los ve como complejas moléculas químicas. Sin embargo, lo son y cumplen las mismas propiedades y reacciones que ellas. **Incluyendo: toxicidad, mutagénesis, carcinogénesis. Por lo tanto, siempre se debe averiguar las características físico-químicas de los colorantes.**

Los colorantes en general son moléculas:

- Orgánicas aromáticas
- Con color
- Ionizadas
- Anfipáticas

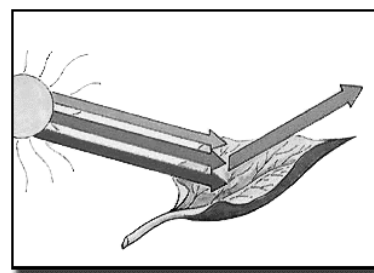
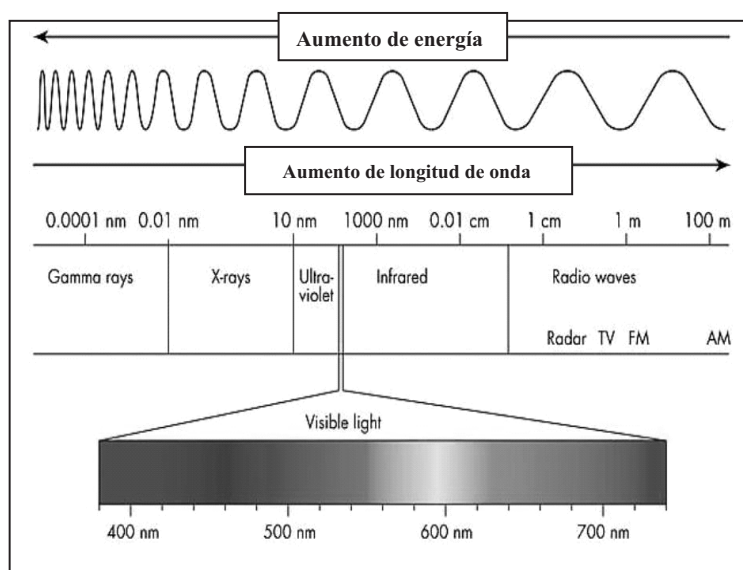
Presentan moléculas orgánicas aromáticas, las que son cíclicas y planas. Los grupos aromáticos se relacionan con el benceno (Fig. 1) y son siempre no polares.



Cada átomo del anillo de una molécula aromática debe tener un orbital p perpendicular al plano del anillo. Los electrones llamados π del orbital p determinan el color (Fig. 2).



Percibimos el color por la absorción de luz de ciertas longitudes de onda, vemos el color complementario que es reflejado.



Longitud de onda nm	Color	Color complementario
400-424	Violeta	Verde amarillento
424-491	Azul	Amarillo
491-570	Verde	Rojo
570-585	Amarillo	Azul
585-647	Anaranjado	Azul verdoso
647-700	rojo	verde

El color de los colorantes se debe a la presencia de un cromóforo. El cromóforo (término antiguo) es un grupo insaturado (doble enlace) que absorbe luz y refleja luz visible. Los electrones π de los cromóforos son débiles para absorber el UV.

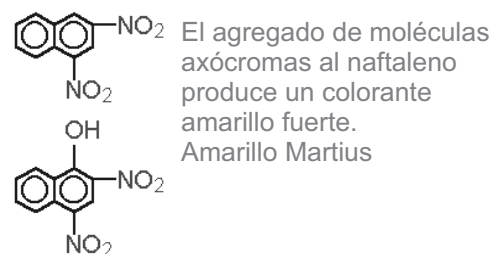
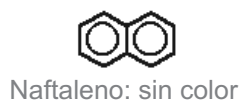
Los cromóforos son configuraciones atómicas que contienen electrones delocalizados. En general están representados por N, C, O y S, los que se unen por uniones dobles alternadas. La interacción entre las uniones dobles causa la delocalización de los electrones.

Ejemplos de enlaces covalentes de los cromóforos

- - C = C -
- - C = N -
- - C = O -
- - N = N -
- - NO₂
- - Quinoid rings

Se observó también que la presencia de otros grupos químicos intensificaba el color. Estos grupos se llamaron auxóchromos. Son moléculas unidas en forma covalente a los colorantes para modificar la intensidad del color. Estas moléculas agregan electrones π a la órbita p.

- -NH₃
 - -COOH
 - -HSO₃
 - -OH
- Ejemplo de moléculas auxóchromas



Además los colorantes pueden poseer:

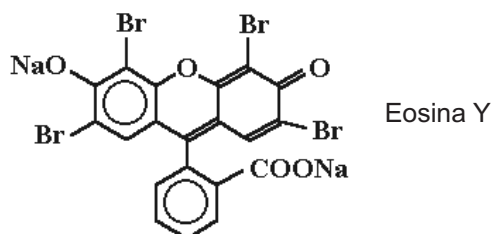
Grupos cargados que no afectan el color (pero hacen más soluble la molécula) (Ej: -SO₃⁻). Esto es fundamental ya que la mayor parte de la molécula colorante es nopolar. Por lo tanto poseen partes hidrofílicas e hidrofóbicas (son anfipáticos).

La mayoría de las moléculas colorantes son

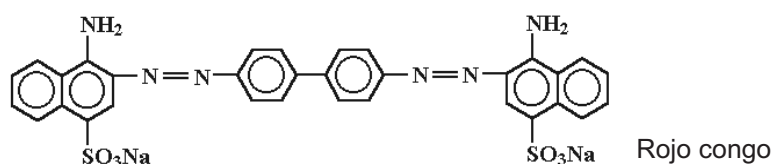
- Ionizadas
- Anfipáticas

Colorantes aniónicos (ácidos):

Poseen cargas negativas, generalmente grupos carboxilos (COO⁻) o sulfatos (SO₃⁻). En general son muy solubles en agua y poco en etanol. La presencia de regiones no polares (anillos aromáticos) hace que también puedan disolverse en alcohol.

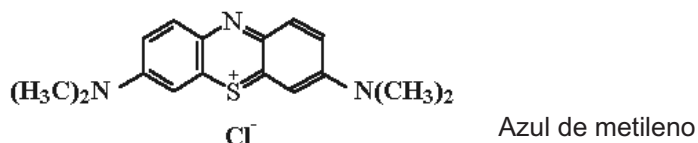


Las moléculas con regiones no polares muy grandes y con pocos grupos polares, pueden formar micelas de 3 a 40 moléculas en agua Ej. el rojo congo.

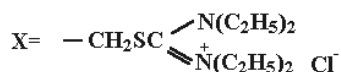
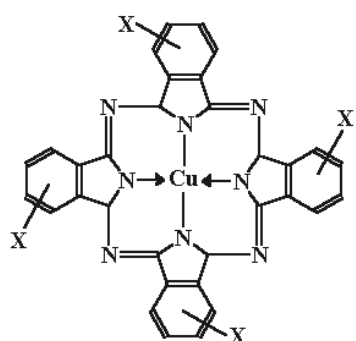


Colorantes catiónicos (básicos):

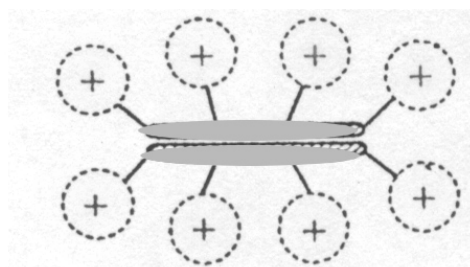
Pueden poseer su carga + formando parte del anillo, en forma delocalizada, disminuyendo la interacción iónica entre el solvente y el colorante. Por lo tanto, son menos solubles en agua y más en etanol. Hay también polivalentes con cargas puntuales y delocalizadas como el verde de metilo.



El azul alcián posee 4 cargas que son puntuales. En el agua el anillo no polar se une con otro anillo de otra molécula de alcián dando micelas de dos moléculas con 8 cargas positivas.



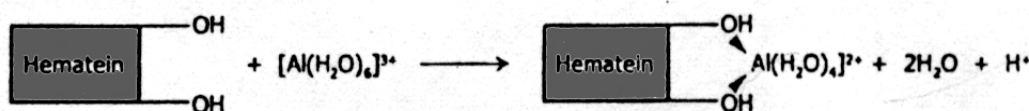
azul alcian



Micelas diméricas de azul alcian

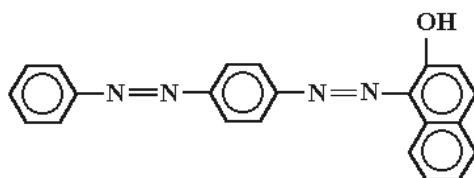
Otros colorantes catiónicos se llaman lacas catiónicas o colorantes quelantes

Son complejos entre colorantes y metales. La mayoría son ácidos débiles o no poseen carga. La combinación con metales muy cargados forma complejos que actúan como colorantes catiónicos. Poseen cargas puntuales por lo tanto son polares se disuelven en agua y no en alcohol. Las lacas para teñir deben competir con cargas + de las proteínas nucleares. La Hematoxilina, se oxida y forma hemateína. La hemateína se puede unir al Al^{3+} (figura 4) o al Fe^{2+} . Se convierte en una molécula polar muy soluble en agua e insoluble en alcohol (muy útil para hacer el preparado definitivo).



Colorantes r

Los más utilizados se denominan lisocromos o colorantes de grasas (lípidos).



Sudán

3- ¿Por qué se une un colorante a una macromolécula de un tejido? Teoría de las tinciones histológicas.

La mayor parte de las tinciones se deben a consecuencias directas de:

- propiedades biológicas (físico-químicas) de las macromoléculas tisulares
- propiedades biológicas (físico-químicas) del colorante
- propiedades biológicas (físico-químicas) e interacción con el solvente

Necesitamos comprender primero los elementos que participan en una coloración

a- Propiedades físico-químicas de las macromoléculas tisulares.

Una de las características más importantes en una macromolécula es su forma tridimensional, esta forma va a estar dada por las uniones e interacciones entre las moléculas de la misma sustancia, como así también por la interacción con otras macromoléculas vecinas.

Las más importantes están determinadas por las uniones inter e intramoleculares. Las que determinan su forma tridimensional.

Dentro de las moléculas tenemos uniones iónicas (intercambio de electrones) y uniones covalentes (se comparten electrones).

En las uniones iónicas un átomo cede electrones al otro átomo. Se forman iones: aniones y cationes que se atraen mutuamente. Son muy fuertes.

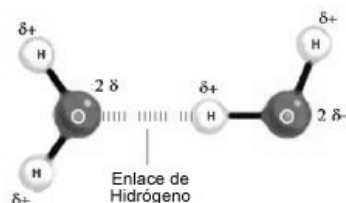
Las uniones covalentes se hallan presentes en las moléculas orgánicas y son muy fuertes. Se caracterizan por

mostrar polaridad, la que es causada por que los electrones están desigualmente compartidos. Uno de los átomos de la unión es más electronegativo (poder de atracción de electrones) que el otro. Por lo tanto uno de los polos atraerá más a los electrones que el otro. Una de los polos de la unión es relativamente más negativo y el otro polo es relativamente más positivo (ojo que la molécula como un todo es eléctricamente neutra). Las moléculas polares se llaman dipolos. Algunas moléculas comparten los electrones en forma casi igual lo que determina que sean NO polares.

Otro tipo de uniones y fuerzas moleculares de atracción:

Interacciones dipolo-dipolo.

Puentes de hidrógeno. En el puente de hidrógeno un átomo de H es unido en forma covalente a un átomo fuertemente electronegativo (O, N) (figura 5) pero también es electrostáticamente atraído por otro átomo también muy electronegativo. Este átomo puede estar en la misma molécula (intramolecular) o en otra vecina (intermolecular). es claro que las moléculas se unen a través de interacciones dipolo-dipolo. Son fundamentales en la formación del agua, para la forma tridimensional de las proteínas y los ácidos nucleicos.



Otras uniones dipolo-dipolo, donde el polo relativamente positivo de un dipolo atrae suavemente el polo relativamente negativo de otra molécula. sin las Fuerzas de van der Waals: son atracciones entre moléculas nopolares que presentan dipolos que se atraen entre sí. En otras palabras dos átomos interactúan debido a la influencia de sus electrones. Ciertas moléculas no polares forman dipolos transitorios, generando fuerzas atractivas o repulsivas. Cada átomo tiene un "radio de van der Waals" correspondiente a la distancia en que las fuerzas atractivas son máximas. A distancias mayores se pierde la fuerza atractiva, y a distancias menores predominan las fuerza repulsivas.



Interacciones hidrofóbicas.

Si una macromolécula posee partes (Ej. residuos de aminoácidos) muy polares (hidrofílicas) y otras no polares (hidrofóbicas), en el agua (molécula muy polar) los grupos no polares tenderán a unirse entre sí rechazando al agua, formando una estructura asociada levemente donde las moléculas de agua se desplazan a la superficie de la estructura. (Ej. agregados o micelas). Las interacciones hidrofóbicas no son verdaderas uniones y son importantes en la estabilización de las estructuras de los ácidos nucleicos y proteínas y pueden ser intramoleculares (asociación entre grupos no polares de la misma molécula) o intermoleculares (asociación entre grupos no polares de diferentes moléculas).

Las tinciones en general ocurren en medios acuosos.

En el agua (medio fundamental para la vida y solvente más común en las tinciones histológicas) las uniones covalentes son muy fuertes (800 KJ/mol), mientras que las iónicas 6-40 KJ/mol, y los puentes de hidrógeno (20 KJ/mol) son menos fuertes. Las uniones dipolo-dipolo tipo van der Waals (4 KJ/mol) y las interacciones nopolares (0,5-1 KJ/mol) son muy suaves. Las iónicas fuera del agua son muy fuertes llegando a 400-800 KJ/mol. Lo que indica que el agua produce un enmascaramiento de las cargas, disminuyendo la atracción entre las moléculas.

Los colorantes como vimos también son macromoléculas e interaccionan entre sí, con el solvente o con macromoléculas tisulares a través de las uniones e interacciones dadas.

En la unión de un colorante a una macromolécula tisular raras veces participa la unión iónica. En general se unen a través de los otros tipos de unión no covalentes. Estas interacciones son más débiles por lo tanto no es difícil diferenciar un corte teñido.

Comencemos a memorizar que la mayor parte de las coloraciones se deben a puentes de hidrógeno, atracción de residuos no polares e interacciones hidrofóbicas. Las cargas de las moléculas sirven para atraer las sustancias y permiten el contacto íntimo entre las moléculas, lo que posibilita el desarrollo de las otras uniones más débiles. Por supuesto las cargas iguales previenen el contacto, repelen las moléculas entre sí.

La principal función de las cargas en las macromoléculas y en los colorantes es hacerlas solubles y permitir el acercamiento pero no la unión entre macromoléculas de carga diferentes.

b- El solvente:

Si consideramos que un colorante está disuelto en un solvente, existe una interacción entre ambas sustancias. Si el mismo solvente se halla sobre el tejido a teñir también presenta una interacción entre el solvente y el tejido. Por lo tanto **para que ocurra la coloración estas interacciones deben ser cambiadas por una nueva unión interacción entre el colorante y el tejido.**

C= colorante; S= solvente, T= macromolécula tisular.

S+C -----> S-C (colorante disuelto en el solvente)
S+T -----> S-T (sección histológica con el solvente)

Coloración: S-C + S-T -----> C-T (tejido teñido) + S-S (solvente libre)

El solvente es una parte fundamental del sistema de tinción. La mayor parte de las tinciones utilizan como solvente el agua, la que aumenta la posibilidad de formación de uniones ión-dipolo, dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno. Al ser polar no disuelve moléculas no polares. Si realizamos coloraciones con solventes no polares, el agua del tejido se aferra aun más a las macromoléculas dificultando su interacción con los colorantes. Muchas moléculas contienen grupos polares y no polares su solubilidad dependerá del balance entre ambos. Recordemos que la mayor parte de las moléculas tisulares y de los colorantes son anfipáticas.

c- Colorantes:

Resumamos las características físico-químicas de los colorantes:

- El color lo da el cromóforo. Parte no polar de la molécula.
- Para aumentar la intensidad del color poseen auxóchromos.
- Poseen grupos cargados que no afectan el color (pero hacen más soluble la molécula). Esto es fundamental ya que la mayor parte de la molécula colorante es no polar. Por lo tanto algunos colorantes poseen partes hidrofílicas e hidrofóbicas (son anfipáticos).
- Otros colorantes son neutros, no polares, no se disuelven en agua.

Pero ¿Qué hace selectivo a un colorante por una macromolécula tisular?

- La geometría del colorante y de las macromoléculas.
- La posición de los grupos funcionales en ambas moléculas
- La carga (+,-, o neutra) de ambas moléculas.

También son fundamentales:

- El solvente
- Condiciones de la tinción (pH, temperatura, tiempo).

Recordemos:

La fuerza de unión total de un colorante a un tejido en general es baja ya que la mayoría de los colorantes pueden ser extraídos de una sección coloreada.

d- Macromoléculas

La mayoría de las macromoléculas poseen un eje de donde parten grupos reactivos, las propiedades de los grupos son iguales en el tejido y en el portaobjetos. Estas propiedades determinan su forma tridimensional y sus interacciones. Los grupos pueden ser no polares (algunos aminoácidos, ácidos grasos, colesterol, partes aromáticas de los ácidos nucleicos). otros grupos son polares como los fosfatos de los ácidos nucleicos, los sulfatos de los hidratos de carbono, los carboxilos de las proteínas e hidratos de carbono, etc. Todos estos grupos se hallan cargados a pH fisiológicos y pueden formar uniones ión – dipolos con el agua

Diferenciar: extraer el exceso de colorante de una sección histológica.

dándole solubilidad.

Las cargas netas de las proteínas varían según el pH.

La forma tridimensional de las macromoléculas en el agua depende de la interacción entre los grupos polares y no polares. Por ejemplo las proteínas globulares poseen un 30-50% de aminoácidos no polares. Lo que fuerza a que las partes cargadas queden hacia afuera haciendo la proteína soluble, además la repulsión o atracción entre estas cargas le dan al forma tridimensional.

Muchas proteínas como el colágeno y la elastina no poseen formas estables, necesitan asociarse a lípidos u otras proteínas para estabilizarse.

El tratamiento de los tejidos con calor, parafina y alcoholes no altera demasiado a las proteínas, la mayor parte de las estructuras secundarias persisten. El citoplasma es un precipitado lleno de reacciones cruzadas. La elastina y el colágeno como no poseen estructuras terciarias complejas son poco afectados por la preparación de las muestras.

Pasos de la coloración:

- 1- Difusión del colorante en la sección hasta llegar a la vecindad del componente.
- 2- Unión del colorante por intercambio de uniones intermoleculares.

Las uniones pueden ser:

- **Intercambio de iones y atracción de cargas.**
- **Puentes de hidrógeno**
- **Atracción no polar**
- **La combinación de las tres produce las interacciones hidrofóbicas.**

Ejemplos de tinción:

- **Intercambio de iones y atracción de cargas (tinción de ácidos nucleicos y glicoconjugados ácidos).**

Ocurren como única forma de unión en el caso de que las macromoléculas sean polianiones con campos eléctricos muy fuertes, la atracción mutua es tan fuerte que mantiene el colorante en el lugar. Se puede considerar unión iónica.

Ej. Tinción de ADN y ARN con la hematoxilina de Mayer.

La hematoxilina de Mayer utiliza el ión Al^{+++} , al aumentar la concentración del ión disminuye la repulsión de cargas, lo que permite penetrar el ión colorante en tejidos que poseen cargas opuestas. Pasos:

- Unión iónica del aluminio-hemateína a los fosfatos del ADN, gracias a reducción de la interacción ADN-histonas.
- Unión entre la hemateína no polar y las bases no polares del ADN
- Unión mediante puentes de hidrógeno con los ácidos nucleicos.

Tinción de glicoconjugados ácidos con azul alcian

Como vimos anteriormente el azul alcian es una molécula que en solución forma dímeros con 8 cargas positivas. Estas moléculas bastante grandes son atraídas por polianiones tisulares presentes en glicoconjugados ácidos. Se comprueba su unión iónica por el agregado de Cl_2Mg , al aumentar la concentración de Mg^{++} compite con el alcian con los polianiones y disminuye la coloración. Esta técnica de coloración se llama "concentración electrolítica crítica" y se utilizan diferentes concentraciones de Cl_2Mg . Por ejemplo, en una concentración 0,1 M se tiñen todos los polianiones a 1,1 M solo se mantienen los muy negativos como los muy sulfatados.

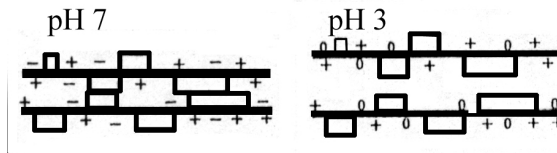
El alcian a tiempos normales no tiñe los ácidos nucleicos ya que la molécula es repelida fuertemente por las cargas positivas de las histonas.

- **Puentes de hidrógeno**

Son importantes en la tinción de proteínas fibrosas como la elastina, el colágeno y el amiloide. La tinción es similar al teñido de telas de nylon, seda y rayón.

Ej. tinción de colágeno. El colágeno es poco afectado por la fijación y procesamiento de la muestra. Se cree que los residuos no polares quedan en el interior de la fibra y los cargados en el exterior. En las tinciones que se realizan a bajos pH, los grupos carboxilos del colágeno pierden la carga, produciéndose una repulsión de

cargas positivas que se mantienen en este pH. Esta hidratación aumenta la distancia entre las moléculas de tropocolágeno, exponiendo residuos no polares que antes eran internos al agua (Fig. 6). Todos estos cambios del colágeno permiten que pueda teñirse las fibras mediante diferentes colorantes y uniones. Por uniones no polares, por uniones iónicas y por puentes de hidrógeno. No hay interacciones hidrofóbicas, por lo tanto la fuerza de la tinción es menor y es fácilmente reversible. Cualquier colorante que tenga varios grupos cargados aniónicos, grupos para permitir puentes de hidrógeno y sistemas aromáticos grandes puede teñir el colágeno.

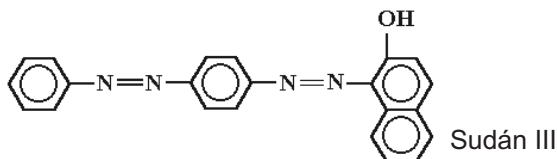


- Atracción de residuos no polares (Ej. tinción de lípidos, fibras elásticas y ácidos nucleicos)

Ej. tinción de lípidos (mielina, tejido adiposo, degeneración grasa) con colorantes neutros:

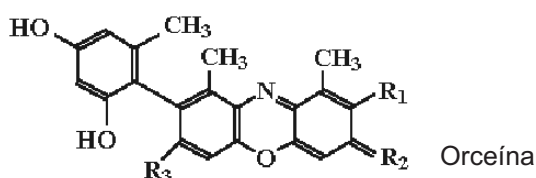
Se utilizan colorantes llamados Lisocromos o colorantes de grasas (lípidos). Ej. sudán o oil red.

En general no son ionizables por lo tanto son no polares (neutros) e insolubles en agua. Son solubles en solventes no polares (xilol, bencol). También son solubles en etanol (menos polar). Se preparan en soluciones de alcohol 70%, la presencia de agua en el alcohol hace que el colorante no polar, busque un lugar más no polar para disolverse. Si hay lípidos (no polares) en la muestra por interacción hidrofóbica el colorante tiñe los mismos. En otras palabras tiñen por solubilidad preferencial. Se utilizan fundamentalmente en cortes de crióstato para teñir las grasas.



Ej. Tinción de fibras elásticas. Las fibras elásticas poseen pocos aminoácidos cargados. El 90% de sus residuos son no polares. Los péptidos forman puentes de hidrógeno inter e intramoleculares además de uniones covalentes. La tinción se debe a atracción no polar y a puentes de hidrógeno entre los grupos polares del colorante y los péptidos de la elastina.

Se tiñen con orceína que posee un anillo aromático no polar y numerosos hidroxilos (-OH) los que pueden formar puentes de hidrógeno con la elastina. El colorante orceína posee muy pocos residuos con carga por lo que son insolubles en agua. Se disuelven en alcohol 70%, el que además hincha las fibras exponiendo aun más los grupos no polares de la elastina.

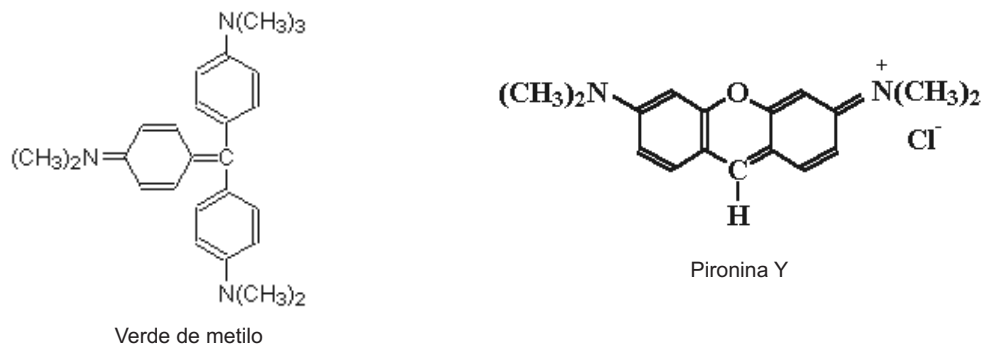


Ej. Tinción de ácidos nucleicos por atracción no polar.

El ADN y el ARN se tiñen con colorantes catiónicos.

Hay dos formas de tinción (por intercalación y por interacciones hidrofóbicas)

La Intercalación se logra por uniones no polares. Los colorantes catiónicos deben intercambiarse con los contraiones que rodean los grupos fosfatos del ADN. De esta forma son atraídos hacia la región no polar de la molécula de ADN. Si la molécula colorante es pequeña puede intercalarse entre las bases no polares del ADN por unión no polar. Es más, a pH ácidos el ADN abre un poco la doble hélice haciendo más fácil la coloración. Destaquemos que aunque la unión final del colorante no se debe a uniones iónicas, la carga del colorante le permitió acercarse a la molécula y poder establecer una unión más débil con la región no polar. Ej: verde de metilo y pironina Y. Observe en la figura el pequeño tamaño de estas moléculas colorantes.

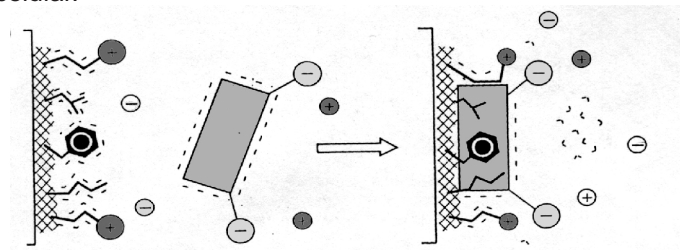


- **Interacciones hidrofóbicas (Ej. tinción de proteínas globulares del citoplasma y ácidos nucleicos).**

Ocurren cuando los residuos no polares se hallan expuestos a la fase acuosa, por repulsión de cargas. Esta repulsión ocurre a pH específicos.

- Carga neta alta y exposición de residuos no polares (Fig. 7)
- Deben estar cerca las cargas y los residuos para permitir unión hidrofóbica.
- El colorante y el tejido deben poseer cargas opuestas
- El solvente es agua

Sirven para teñir proteínas citoplasma y ácidos nucleicos. La tinción es más resistente que las de las proteínas fibrosas de la matriz extracelular.



En general se utilizan colorantes ácidos a pH ácidos, ejemplos de colorantes de proteínas citoplasmáticas: Naranja G (trícromico de Masson), fucsina ácida, ácido pícrico. Ejemplos de colorantes para ácidos nucleicos: Pironina Y, azul de toluidina, naranja de acridina.

Estas tinciones pueden diferenciarse mediante el uso de detergentes, lo que indica claramente la importancia de la unión no polar.

En el caso de los ARN (fundamentalmente los ribosomales y de transferencia) en general se asocian a proteínas y se cree que su tinción se debe a interacciones hidrofóbicas. Pero como veremos la presencia de fosfatos negativos que podrían exponerse externamente posibilitarían una unión de tipo iónica, con la aparición de metacromasia.

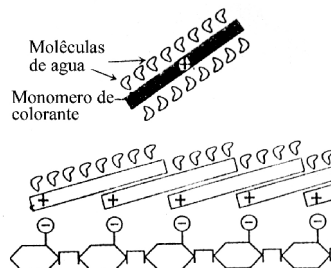
Metacromasia

Cuando un componente de un tejido se tiñe de un color cuyo espectro de absorción es muy diferente al del colorante original diluido en solución se habla de reacción metacromática. Existen numerosos colorantes que producen metacromasia, los más utilizados son: azul de toluidina, azul de metileno, violeta de cresilo, azur A, etc.

Recordemos que en soluciones acuosas la interacción ión-ión es muy débil para unir el colorante a la macromolécula sólo por atracción de cargas. Pero esta atracción de cargas acerca el colorante a la macromolécula en donde comenzará el intercambio de contraiones y el colorante se acerca disminuyendo la repulsión entre las moléculas con cargas positivas del colorante (Fig. 8). Debido a la elevada presencia y cercanía de las cargas negativas de los polianiones, las porciones no polares de los colorantes interactúan entre sí (atracción no polar), liberan el agua y se agregan formando polímeros de colorante. Estas interacciones no polares entre las moléculas de colorante involucran a los electrones del anillo aromático. En soluciones acuosas del colorante esto no ocurre ya que las moléculas se repelen por sus cargas y no se agregan (de allí el color diferente entre el líquido colorante y la tinción).

En general se observa una caída del máximo de absorción del colorante hacia longitudes de onda más cortas. Por Ej. el Azul de toluidina vira de azul a púrpura, la safranina de naranja -rojizo a naranja - amarillo, la pironina de rojo a naranja.

Los polímeros se formarían por nuevas uniones intermoleculares entre moléculas adyacentes del colorante. Los grupos reactivos del tejido actuarían como centros de orientación debido a la gran proximidad de sus grupos aniónicos. Cuanto más cerca estén los carboxilos o sulfatos de un carbohidrato que actuaría en la coloración como un polianión más fuerte y resistente al posterior tratamiento con alcohol, para la preparación definitiva, será la metacromasia.



Resumen:

La selectividad de un colorante hacia una macromolécula dependerá de:

- Geometría
- Posición de los grupos funcionales
- Tamaño de la molécula
- Carga (+, - o neutra)
- Tipo de carga (delocalizada o puntual)
- Propiedades del solvente
- Condiciones de la tinción
- Propiedades de la macromolécula a teñir

COLORACIONES ESPECIALES.

Impregnaciones argénticas:

Algunas macromoléculas como el colágeno III o fibras reticulares (reticulina) no se pueden observar en la H-E o en un tricrómico. Sin embargo, son excelentemente demostradas por impregnaciones argénticas. Las técnicas argénticas pueden ser utilizadas también con otras macromoléculas y presentan varias ventajas.

- Son estables y no se desvanecen con el tiempo
- El depósito de plata en general es oscuro y da un buen contraste para fotografía y procesamiento de imágenes.
- Son métodos muy sensibles que detectan sustancias que son difíciles de detectar con coloraciones normales.

Pero también sufren de desventajas:

- Son caprichosas (a veces funciona y otras no)
- Se utilizan soluciones alcalinas que despegan los cortes del portaobjetos
- A veces producen fondo inespecífico (background)
- Tiñen todo lo que toma contacto con las soluciones de plata (dedos, manos, delantales, anteojos)
- Algunas soluciones son explosivas
- Las soluciones de plata son costosas

La reacción inicial con plata es el depósito de átomos submicroscópicos de plata en sitios reactivos (se cree que podrían ser sólo dos átomos). Estos sitios actúan como sitios catalizadores dando más átomos de plata se depositan gracias a la acción reductora del revelador (Ej. Formol) Cuando el precipitado de más plata sobre los sitios inductores se realiza por la acción de un revelador a esta reacción se llama reacción argirófila. Si el precipitado ocurre espontáneamente sin el agregado de un revelador externo se denomina reacción argentafin. Aunque estos términos son anticuados aun aparecen en la bibliografía y por lo tanto se ampliará su discusión. Además de estas reacciones, la plata puede ser intercambiada con iones celulares incoloros, dando lugar a un precipitado visible (reacciones de intercambio iónico).

REACCION ARGENTAFIN

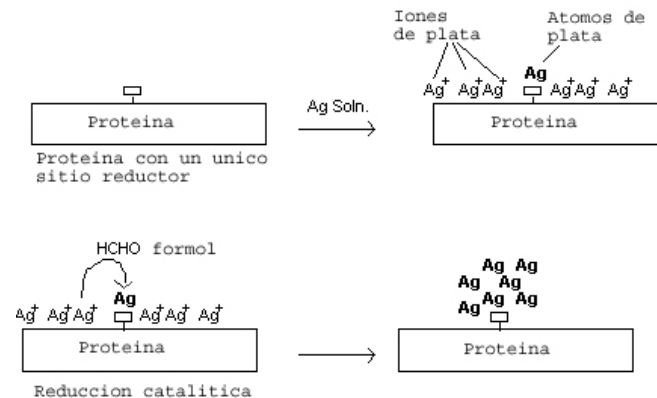
Ocurre cuando algunas células contienen grupos reductores que si son lo suficientemente fuertes y si están en

suficiente cantidad determinan un depósito visible al óptico de plata sin necesidad de un revelador externo. Ejemplo son las células enteroendocrinas (células argentafines). La reacción se debe a la presencia de serotonina (5-HT).

REACCION ARGIROFILA

Los grupos tisulares absorben la plata (Fig. 9). La plata es fundamentalmente absorbida como ion pero pequeñas cantidades son reducidas a átomos de plata, este depósito de átomos de plata es demasiado pequeño para ser observable al MO. Por lo tanto el depósito de plata es incrementado mediante el uso de agentes reductores externos (Ej. formol) los que reducen los iones absorbidos. La reducción es aumentada gracias a la acción catalítica de los átomos de plata.

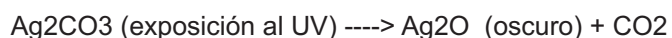
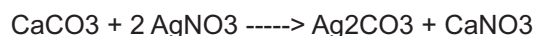
Ejemplos tinciones de fibras reticulares, lipofucsina, etc.



REACCIONES DE INTERCAMBIO IONICO

Se utilizan en la técnica de von Kosa para detectar focos de mineralización.

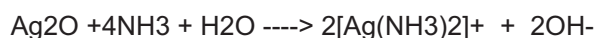
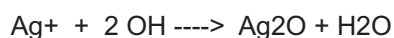
La sección es tratada con soluciones de plata (nitrato de plata) en los lugares donde hay fosfatos y carbonatos (ejemplos huesos mineralizados) se forma un precipitado de plata insoluble. El precipitado incoloro se oscurece con la exposición del preparado a la luz UV o a soluciones con hidroquinona.



Existen varias soluciones de plata, las que se eligen según la técnica y reacción necesaria o familiar.

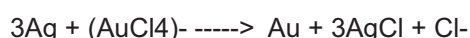
Ej. Nitrato de plata (para la técnica de von Kosa),

Se produce precipitando la plata con una solución de hidróxido, luego se redisuelve el precipitado en una mínima cantidad de hidróxido de amonio. Esta solución, aunque muy sensible, es muy alcalina y explosiva.



Existen otras soluciones como: el carbonato de plata amoniacal o la hexamina argéntica las que se utilizan para la detección de fibras reticulares, axones, neurofibrillas, etc.

Las impregnaciones argénticas a veces producen depósitos (precipitados) no específicos debido a la presencia de contaminantes (en el solvente o en el preparado). Los precipitados más pequeños pueden limpiarse con cloruro de oro (cloraurato de sodio). A este paso se lo denomina virado ya que hay un cambio del color del precipitado.



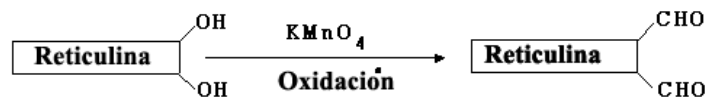
Como vemos en la reacción 3 átomos de plata son reemplazados por un átomo de oro. Para precipitados pequeños produce una reducción del tamaño y por lo tanto del fondo inespecífico, los depósitos más grandes en general específicos cambian su color de negro a marrón cálido (virado del color). Este paso es costoso y si se ha realizado correctamente la técnica innecesario.

Antes de terminar estas técnicas en general se tratan los preparados con hiposulfito. Este es un fijador fotográfico que disuelve el exceso de iones de plata evitando el posterior depósito y formación de fondo inespecífico (algunos autores indican que es un paso innecesario).

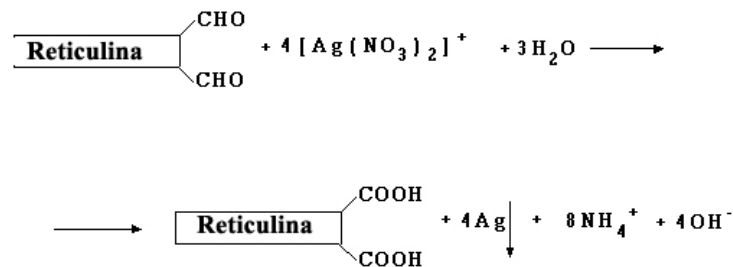
Impregnación argéntica de fibras reticulares (reticulina)

Existen muchas técnicas, aquí se describe la de Laidlaw.

- a- Los hidroxilos (-OH) de los hidratos de carbono presentes posiblemente en glicoproteínas asociadas al colágeno III de las fibras reticulares son oxidados a aldehídos con permanganato de potasio.



- b- Las soluciones de plata oxidan los aldehídos a ácidos y en el proceso se reducen también los iones de plata precipitando como átomos en el sitio de reacción.



Bibliografía:

- Geneser F. Histología. Panamericana. Buenos Aires. 2000.
- Prento P. A contribution to the theory of biological staining based on the principles for structural organization of biological macromolecules. Biotechnic & Histochemistry 2001, 76(3): 137-161.
- Silver impregnation: <http://www.sci.port.ac.uk/~cookdj/biomed/hchem/silver.doc>
- Stains File: <http://stainsfile.info/>



Luis
Marsan

Deán Funes 427 (C1214AAC)
Cap. Fed. Bs.As.- Argentina
Tel.:(54) 011 4931-6439 L.Rot
www.luismarsan.com.ar



LEICA TP1020

Procesador automático de tejidos
para los laboratorios de histología

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA ASP300

Procesador de tejidos automático
inteligente. Máximo rendimiento y diseño
ergonómico

Leica
MICROSYSTEMS



Desde 1996 estamos al servicio de la venta,
asesoramiento y mantenimiento de equipos
en el área de la histopatología.

Somos representantes en
Argentina de:

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA CM1850

El criostato con desinfección UVC
para la histología de rutina y la
patología clínica

Deán Funes 427 (C1214AAC). Cap. Fed. Bs.As. Argentina.
Tel.: (54)011-4931-6439 L. Rot.
www.luismarsan.com.ar - e-mail: lmarsan@speedy.com.ar

2.

CITOLOGÍA

LA CITOLOGÍA EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA
(pag. Nº 53 - 69)
Ct. Lilian B. Pisilli

BIOSEGURIDAD EN CITOLOGÍA
(pag. Nº 70 - 76)
Ct. Sandra M. Noya Lamas

APARATO RESPIRATORIO: CITOPREPARACIÓN.
(pag. Nº 77 - 82)
Ct. Ht. Patricia A. Aragón



Luis Marsan

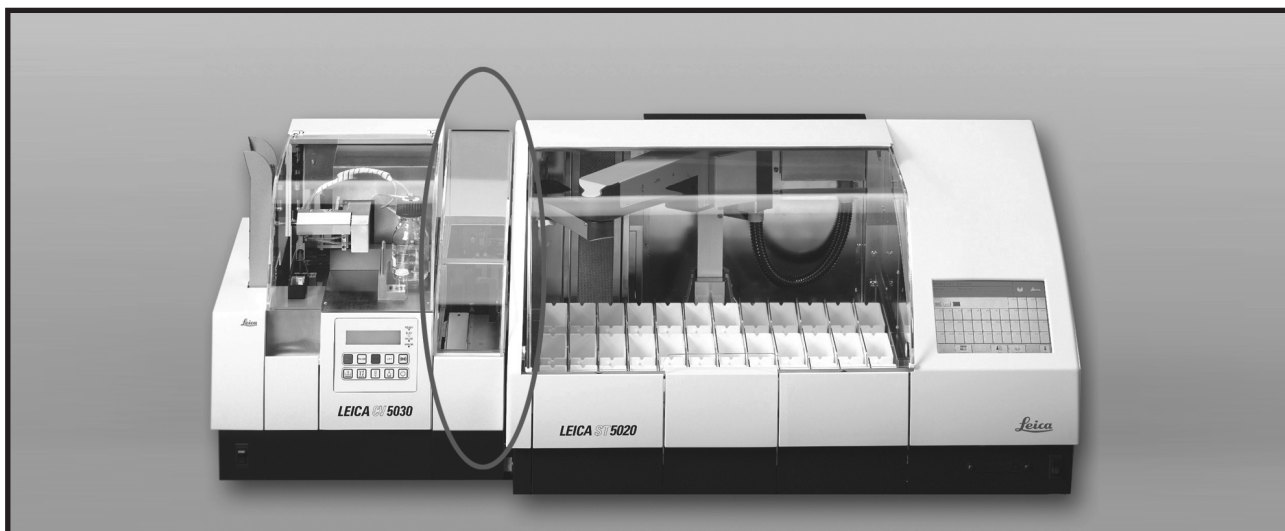
Deán Funes 427 (C1214AAC)
Cap. Fed. Bs.As.- Argentina
Tel.:(54) 011 4931-6439 L.Rot
www.luismarsan.com.ar



LEICA ST5020

Leica ST5020 - Centro de tinción
automático

Leica
MICROSYSTEMS



LEICA TS5025

Leica ST5020 - Centro de tinción
automático y Leica CV5030 - Montador
de cubreportas de cristal

Leica
MICROSYSTEMS

www.luismarsan.com.ar

LA CITOLOGÍA EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA

Introducción:

El estudio citológico consiste en:

1º poder reconocer como provenientes de un tejido u órgano las células que se disponen en forma aislada o en grupos, separadas de su patrón arquitectural original, en un extendido, impronta, cepillado, citocentrifugado, etc.

2º detectar las alteraciones que presenten y clasificarlas según la lesión que constituyan.

Digamos que la observación y descripción en forma experimental de las células halladas en líquidos y otras muestras, se remonta a la época en que se construyeron los primeros microscopios, pero es a partir de 1925 e impulsada por el Dr. George Papanicolaou, cuando la citopatología adquiere el carácter de ciencia aplicada. En los últimos quince años el desarrollo de esta ciencia se ha beneficiado con la incorporación de instrumentos de fibra óptica para el estudio de lesiones en los tractos respiratorio, digestivo y urinario abordando, también, el aparato ginecológico.

La punción con aguja fina, por su parte, ha explorado poco a poco, primero los órganos superficiales, accediendo luego a través de la guía ecográfica o de la tomografía computada a zonas más profundas.

La lógica indica que los laboratorios que se encuentren mejor equipados y capacitados estarán en condiciones de recibir gran variedad de muestras, necesitando implementar distintos métodos de procesamiento cuando, por ser derivadas de lugares alejados, sean remitidas de modo no convencional.

Debemos recordar, sin embargo, que si bien el citodiagnóstico nos permite identificar la mayor parte de las lesiones, sobre todo las de origen tumoral o pre – neoplásicas, permitiendo un muestreo más amplio, rápido y económico que el de la biopsia, la calidad final del diagnóstico va a depender tanto de cómo sea cuidada la muestra durante su obtención y remisión, como del conocimiento que se ha puesto en su procesamiento e interpretación.

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 QUE SE COMETEN EN LA ELECCIÓN DE LOS MÉTODOS DE PROCESAMIENTO, GRAVITAN DIRECTAMENTE EN LA CALIDAD DE LAS PREPARACIONES Y DEL DIAGNÓSTICO.**

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 indicación precisa de lo que esperamos confirmar o descartar, con la elección de la aguja o el fijador ideal para lo que necesitamos demostrar, 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.

Condiciones clave para asegurar el éxito

Numerosas pueden ser las razones por las que una muestra no se plasme satisfactoriamente en un preparado haciendo su interpretación dificultosa.

Encontramos causales de error en muestras mal preservadas, hemáticas o con escasa celularidad, por una elección inadecuada de procesamiento, por problemas en la fijación o coloración, etc.

La lista podría ser extensa y las responsabilidades compartidas.

Por el contrario, cuando se establece un canal de comunicación con el equipo de trabajo puntualizando claramente los objetivos y metas fijados, el trabajo se desarrolla con consignas claras y las desinformaciones desaparecen.

De todos modos es preciso destacar que, así como se presentan en ateneos de discusión los casos de difícil resolución a los fines de brindar al paciente lo mejor que la medicina puede ofrecerle y se escucha la opinión de todos los que tienen experiencia en el tema, ante dudas con respecto a qué técnica de procesamiento o coloración se adecuará mejor a tal o cuál material, el técnico DEBE recurrir a la opinión de otros técnicos, quizá con más experiencia en éste tipo de materiales o, simplemente, con más experiencia.

SIEMPRE hay que arbitrar los medios para que el laboratorio reditúe los mejores resultados al menor costo: esto se logra haciendo las cosas bien desde el principio, no teniendo que rehacer estudios ni, lo que es peor, conformarse con preparaciones de escasa calidad técnica.

Alcances del estudio citológico:

La citología es una poderosa herramienta que podemos utilizar en el diagnóstico de procesos:

BENIGNOS	MALIGNOS
INFLAMATORIOS	CARCINOMAS PRIMARIOS
REACTIVOS	CARCINOMAS METASTÁSICOS
INFECCIOSOS	LINFOMAS
VIRALES	SARCOMAS
ETC.	ETC.

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, pero no hay límites en el campo de acción de la citología.

Obtención, preservado y remisión de muestras:

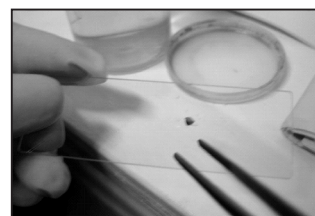
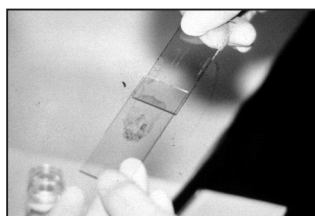
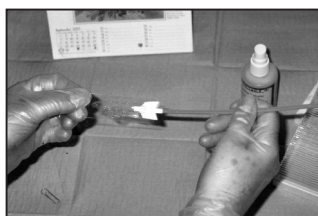
El laboratorio de citología puede procesar muestras obtenidas:

- Por raspado
- Por hisopado
- Por cepillado
- Por impronta
- Por punción con aguja fina

De lesiones 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 preparación son:

- Preparaciones delgadas
- Rápidamente fijadas y/o secadas al aire



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

Ver figura 15 y 15Bis **PAGINA IMAGENES**

- 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, durante estudios con visualización endoscópica o con o sin guía de imágenes y 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 etílico
- Formol neutro

Líquidos serosos
con agregado de alcohol



Cepillado
endocervical en formol

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
- En presencia de lesión o como resultado del sangrado por la maniobra del estudio suelen tener un tinte rosado o ser francamente hemáticos
- Las células que se encuentran suspendidas en líquidos tienen menos adhesividad que las que se reciben inmersas en líquidos orgánicos
- Requieren de un tratamiento más cuidadoso

... y tienen en particular:

- Las muestras en fresco deben** remitirse rápidamente al laboratorio, manteniéndose en la heladera hasta su procesamiento a los fines de garantizar la preservación de la morfología celular
- En las muestras fijadas** se dificulta la adhesión del material al portaobjeto ya que, por efecto del fijador, se produce la precipitación de proteínas y la condensación de la cromatina. 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

Para realizar el correcto estudio e interpretación de materiales citológicos debemos contar con la mayor cantidad posible de datos acerca del paciente:

- Edad y sexo.
- Si la muestra es ginecológica consignar el dato de la última menstruación.
- Tiempo de evolución de la enfermedad actual.
- Antecedentes clínicos y quirúrgicos (si los hubiere).
- Datos radiológicos y/o de laboratorio.
- Tratamientos instituidos (medicación, radio o quimioterapia, etc.).
- Sospecha clínica.

Y todo dato de interés que pueda orientar el diagnóstico.

Todas las muestras deben hallarse perfectamente identificadas.

Es **IMPORTANTE** que los datos incluyan el **método de fijación utilizado** a los fines de realizar a cada material el tratamiento correspondiente: debemos tener en cuenta que, macroscópicamente, no se observa diferencia entre un preparado secado al aire y otro que fue sumergido en alcohol y luego retirado de él.

ALGUNAS CONSIDERACIONES

-Orina de micción espontánea

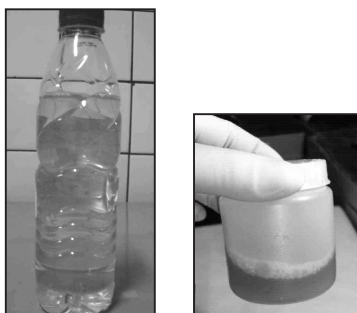
Es importante que los pacientes observen las siguientes indicaciones para realizar el estudio seriado de orina:

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.

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

Distintos tipos de
orina de micción
espontánea



-Líquidos serosos

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

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.



Distintos aspectos
macroscópicos en
líquidos serosos

-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

Los mejores resultados se obtienen de la centrifugación y posterior citocentrifugación del material. En el caso de materiales muy escasos, utilizar citocentrifugación directa, diluyendo una gota de líquido en solución salina.



De acuerdo a la cantidad de líquido remitido, elegir el método de procesamiento

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.



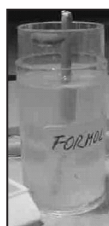
Muestras líquidas - materiales fijados

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



Muestras fijadas en formol o alcohol

Procesamiento:

Las muestras líquidas, 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.

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.

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 gr. -Agua destilada 1 lt. - Utilizar fría y conservar en la heladera -Fijador celular (Fluka 81210) -Polietilenglicol 50 gr. -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 manoseo 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 contruidos 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.



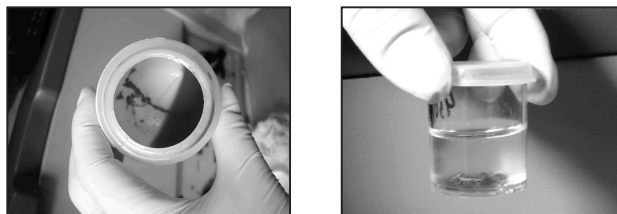
Elementos de trabajo

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 ó coágulos rojizos de fibrina y sangre.

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

Esta redecilla 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.



Obtención de material para incluir en parafina

Muestras directas usando centrífuga

Materiales en fresco

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.

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 el examen intra procedimiento del material.

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

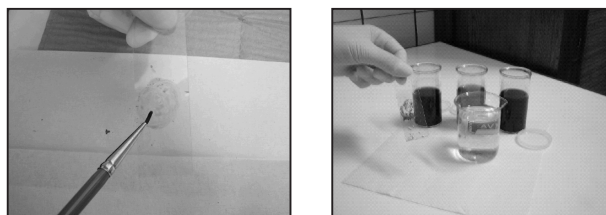
En 15 segundos estamos en condiciones de saber cual es la concentración y el tipo celular de la muestra que vamos a estudiar y, de acuerdo a esas características, es el momento en que decidimos que tipo de muestreo realizar.

En este sentido es fundamental que las muestras citológicas sean preparadas por citotécnicos que puedan evaluar 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. *Ver figura 16 PAGINA IMAGENES*



Evaluación con Tinción 15" intra procesamiento

Preparación de extendidos

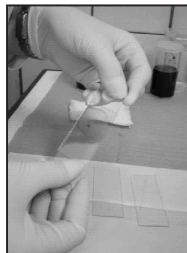
Podemos realizar las preparaciones de las siguientes formas:

- 1 a. Tomar con un pincel de cerda blanda una porción de sedimento y practicar un círculo pequeño en el centro del portaobjeto ó.
- 1 b. Colocar una gota de sedimento en el centro del portaobjeto y realizar con otro, un extendido corto y delgado ó.
- 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.



1 a



1 b



1 c

Utilización de la citocentrífuga

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

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

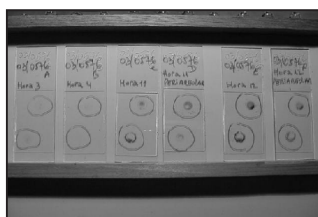
Solamente exceptuamos esta regla en presencia de muestras de muy escaso volumen.

El costo de este equipo se amortiza rápidamente dado que:

- Su función es concentrar la celularidad y adherirla al portaobjeto: de este modo necesitamos menos preparados por caso.
- Evita la dispersión del material.
- Los materiales así procesados son óptimos para ser utilizados en coloraciones histoquímicas y marcaciones inmunohistoquímicas.
- Es el único modo de asegurarnos la obtención del mejor sedimento por concentración del mismo.
- Ahorro de tiempo del técnico para procesar y realizar el screening.

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, rehidratar y fijar.

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, rehidratar y fijar.

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 lisar los hematíes ni tampoco realizar técnicas inmunohistoquímicas

Fijadores - Fijación

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 ó 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 de fijación

1. **fijación en alcohol 96°:** 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.



Nótese el material desprendido en el fondo del frasco donde se han fijado extendidos

Otros medios de preservación o prefijación

Existen otras alternativas de elección en tratamientos de prefijación.

Deseo aclarar que no tengo experiencia al respecto, transcribo la información que me cedieron.

- Alcohol 70°
- Solución de Saccomanno

Solución de Saccomanno

Su uso está indicado para preservar las muestras de los fenómenos de autólisis provocados por el desarrollo microbiano, prevenir a las células del colapso y protegerlas de la desecación por exposición al aire.

Ideal para prefijar muestras que no serán procesadas en el día.

La solución puede ser preparada en el laboratorio o adquirida en el mercado.

Solución stock de Polietilenglicol o Carbowax:

El Polietilenglicol o Carbowax es sólido a temperatura ambiente, con un punto de fusión entre 43 y 46° C.

Derretir Polietilenglicol o Carbowax a una temperatura de entre 50 – 100° C en estufa.

Colocar 500 ml. de agua destilada o de alcohol 50% en una probeta graduada de 1 lt.

Agregar 500 ml. de Polietilenglicol o Carbowax derretido.

Agitar.

La mezcla no solidifica y puede ser almacenada en una botella cerrada.

1 lt. de fijador de Saccomanno se prepara mezclando:

Agua destilada 434 cc.

Alcohol 95 – 96° 526 cc.

Solución stock de Polietilenglicol o Carbowax al 50% 40 cc.

Nunca usar alcohol absoluto en la preparación de fijador de Saccomanno

Procedimiento:

Recomendado para prefijar esputos, orinas y demás líquidos.

Duplicar el volumen de la muestra.

Mezclar por agitación enérgica.

Los extendidos realizados con materiales pretratados con Saccomanno se dejan secar al aire.

Antes de la coloración, eliminar el fijador sumergiendo en alcohol 96°.

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 demuestra 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°
- Colorear

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

Consideraciones:

Dado que el fondo presente en una muestra puede sugerir la presencia de algunas lesiones, es de buena práctica **NO** rehidratar la totalidad de los preparados.

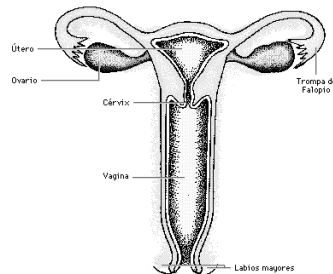
Causas de poca preservación

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.

**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



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.

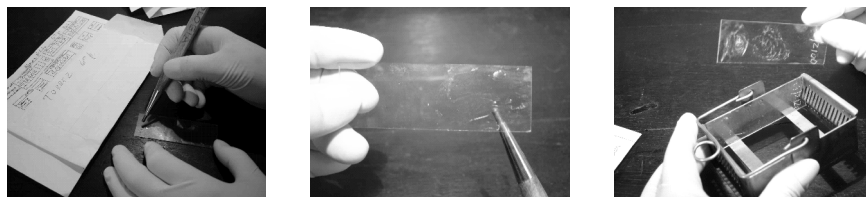
- Si por alguna razón no logramos fijar inmediatamente la preparación lo conveniente será secar al aire y luego rehidratar el preparado.
- **NUNCA FIJAREMOS UN PREPARADO QUE SE HA DESECADO**



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.

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 a menudo 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.

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. Ver figura 17, 18 y 19 **PAGINA IMAGENES**

Preparación de colorantes - Ventajas:

Hay laboratorios que preparan las soluciones colorantes de uso habitual.

No está de más tener en cuenta esta posibilidad, sobre todo en hospitales, donde puede suceder que, eventualmente, los insumos no se reciban en tiempo y forma.

Para comenzar es esencial tener al alcance de la mano protocolos de preparación probados y en uso en alguna institución o laboratorio, contar con la referencia de la persona que los utiliza para evacuar alguna duda y seguir al pie de la letra las instrucciones e indicaciones, sin variar las cantidades ni reemplazar ningún elemento.

Esta posibilidad nos da la ventaja de contar siempre con las drogas base que tienen un tiempo de vencimiento más lejano que el de las soluciones ya preparadas.

Rendimiento:

Coloreando alrededor de 750 preparados por semana, estas soluciones tienen un tiempo de uso aproximado de 4 – 5 meses.

Deben ser filtradas cada 15 días. Los alcoholes que acompañan a esta coloración también se reemplazan cada 15 días.

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 (SO ₄) ₃ 18 H ₂ O)		
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:
 - a. Alrededor de la gota debe formarse una aureola violácea con un centro bordó intenso.
 - b. 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.
 - c. 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:

Preparar una solución madre acuosa:

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

EA 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 amarillenta (eosin Y)

Agua destilada..... 100 ml.
 Eosina amarillenta..... 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.

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.

Tiene como 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

Tiene como desventajas

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

Ver figura 20 y 21 **PAGINA IMAGENES**

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.

Ver figura 22 y 23 **PAGINA IMAGENES**

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, líquido con agregado de fijadores)
- Etc.

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:

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.

El citotecnólogo juega un rol fundamental en el logro de estos resultados ya que tiene las competencias para administrar a cada material el tratamiento adecuado y puede desempeñar las demás funciones asignadas con total idoneidad, lo que lo hace imprescindible en el equipo de trabajo.

Es tarea del patólogo apoyar las estrategias para aumentar al máximo la calidad de todas las tareas técnicas, incluidas la obtención de las muestras y su procesamiento.

Referencias:

1. Koss L. : Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases (vol.2) 4th Edition
2. 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
3. Chan J, Kung I; Rehidratation of air dried smear with normal saline Am. J. Clin. Pathol. 89:30, 1988
4. Erozan Y., Bonfiglio T.: Fine needle Aspiration of Subcutaneous Organs and Masses – Ed. Lippincott – Raven 1997
5. Koss L. et al: Biopsia por aspiración – Interpretación citológica y bases histológicas – Editorial Panamericana 1988.
6. Leong AS: Immunostaining of cytologic specimens. Am J Clin Pathol 1996; 105:139-140
7. Viguer García – Moreno JM, García del Moral R: Laboratorio y atlas de citología Editorial Interamericana · Mc Graw – Hill, 1995
8. 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
9. Curso "Gestión de la Calidad en los Laboratorios de Histo y citotecnología- Gestión enfocada a los procesos y competencias" 24 de abril al 27 de Noviembre de 2004 – Sociedad Argentina de Histotecnología
10. Biopur: www.biopur.com.ar

BIOSEGURIDAD Y MANEJO DE MATERIAL

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.

Por lo tanto la bioseguridad en el Laboratorio, deberá enfocarse también sobre la posibilidad de contaminación infectocontagiosa de material biológico

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.
- Si no es posible contar con sistemas de ventilación general y/o localizada (campanas), trabajar en ambientes ventilados.
- 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 procesamiento 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.
- 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:

Riesgo psicológico:

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.

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, etc.

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.

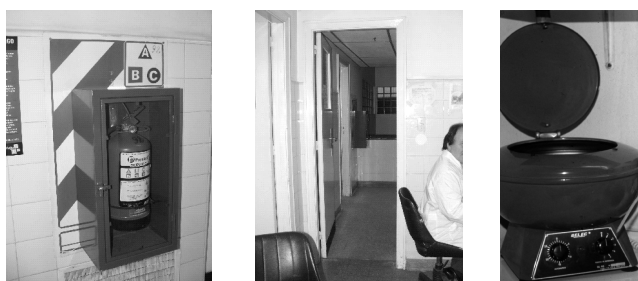
Para ello debemos tener en cuenta:

- 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 éste 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. Periódicamente, debe verificarse el funcionamiento de los aparatos y las instalaciones eléctricas. Observar el buen funcionamiento de los cierres de las centrifugas. 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.



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.

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.

Controles de salud:

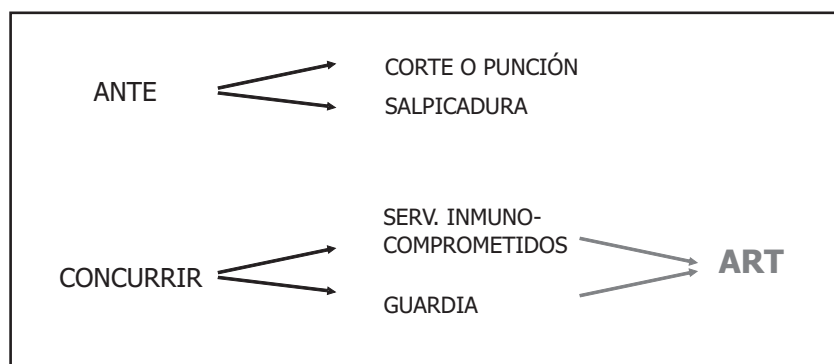
De acuerdo a la ley 154/99, en su artículo 7, el personal realizará exámenes preocupacionales y médicos periódicos, como mínimo una vez al año, debiendo incluir placa de tórax, PPD, análisis de sangre y orina, y examen clínico.

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.

- 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 reglamente 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 cantidad 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 procesado 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 procesado de muestras no fijadas:

- Permite un mayor agrupamiento del material celular en el momento del procesado.
- 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 éstos 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.

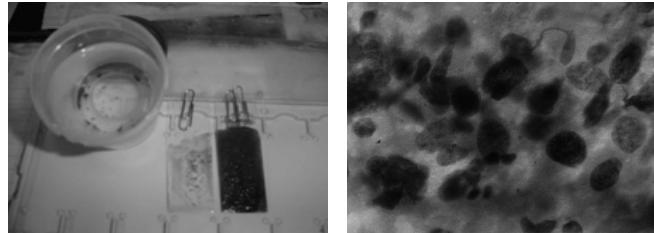
Inconvenientes debidos a una incorrecta extensión del material:

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?

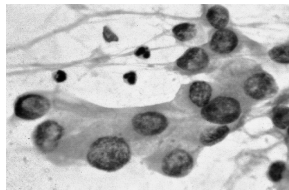
Se procede a rasparlo con el lomo del un bisturí o con una pinza de punta curva y posteriormente el material obtenido se remite para su inclusión en parafina.

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.



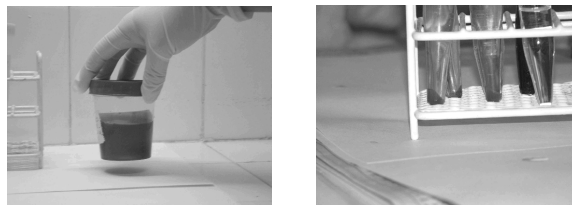
PAAF Ganglio

¿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 éste 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 éste 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 o 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.

Otro método de fijación que empleamos 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 cromatínico, 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 éste 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 éste caudal.

Conclusión:

El propósito de esta charla es incentivar al personal de una institución o laboratorio que esté afectado al manejo de los residuos patogénicos 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

Aparato Respiratorio: Citopreparación

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
- Fibrobroncoscopía
 - Lavado bronquial
 - Cepillado bronquial
 - Lavado bronquioloalveolar (BAL)

Estudio de esputo seriado

Anteriormente a la implementación de la fibrobroncoscopía 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, etc.)

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 ó de madera (bajalengua ó 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- Sin 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 mucosecretantes.
- 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.

Ver figura 24, 25, 26 y 27 **PAGINA IMAGENES**

Otros hallazgos:

Asbestosis, enfermedad producida por inhalación de fibras de asbesto (amianto). Conocida como fibrosis pulmonar ó neumonitis intersticial idiopática por exposición al asbesto. Ver figura 28 **PAGINA IMAGENES**

- 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 compuestos 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 radioscopía o broncoscopía.

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:**

b. 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.

c. **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.

Ver figura 29 y 30 **PAGINA IMAGENES**

Cepillado bronquial

El estudio de fibrobroncoscopía permite la identificación y la localización precisa de anormalidades 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

1. Los extendidos que se reciben, deben estar fijados en alcohol ó con fijador celular y se colorean con técnica de Papanicolaou.
2. 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 más 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 trofozoítos o esporozoítos, que miden de 0,5 a 1 micrón de diámetro. Podemos identificar uno ó más trofozoítos 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 trofozoítos. Es claramente una ventaja poder utilizar procedimientos no invasivos si comparamos el BAL con la biopsia de pulmón a cielo abierto.

Ver figura 31 y 32 **PAGINA IMAGENES**

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 bronquial.

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%.

Ver figura 33 **PAGINA IMAGENES**

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.

Ver figura 34 y 35 **PAGINA IMAGENES**

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.

Ver figura 36 y 37 **PAGINA IMAGENES**

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.

Ver figura 38 **PAGINA IMAGENES**

Patrón celular normal	
Células cilíndricas	< 3 %
Linfocitos	8 - 10 %
Polimorfonucleares	2 - 5 %
Macrófagos	80 - 90 %

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) ó 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. *Ver figura 38 PAGINA IMAGENES*

Referencias:

- Koss, volumen 2 – General Cytology – 19. The Respiratory Tract in the Absence of Cancer Third Edition Copyright 1979.
- Wikipedia en español – <http://www.brujula.net>.
- Cuaderno de Citopatología 3. Aparato respiratorio: I Ernesto García Ureta – ediciones Díaz Santos S.A 2003
- MonoPrep 2 – Distribuidor: Tecnolab. S.A.

FIGURA 1 Alta temperatura

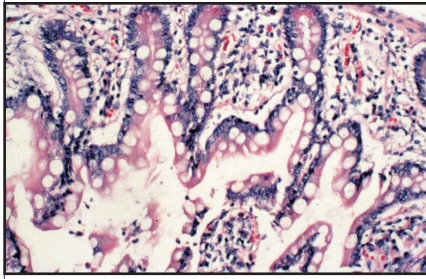


FIGURA 2 Temperatura adecuada

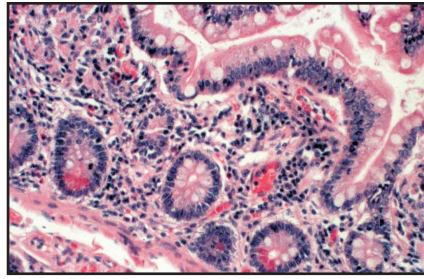
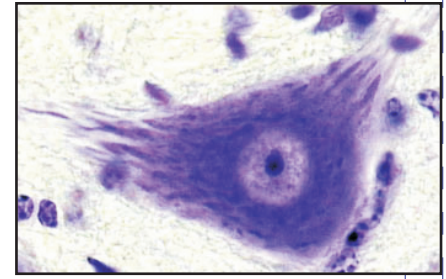


FIGURA 3



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 (grumos 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 4 Lípidos en cortes parafinados

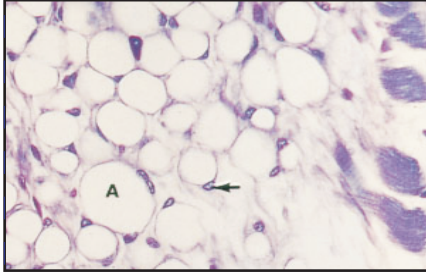


FIGURA 5 Lípidos cortes criostato (Oil red 0)

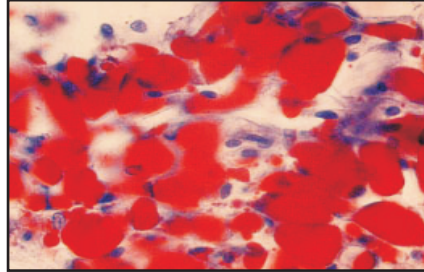


FIGURA 6 Klüver-Barrera (Luxol Fast Blue Violeta de Cresilo)

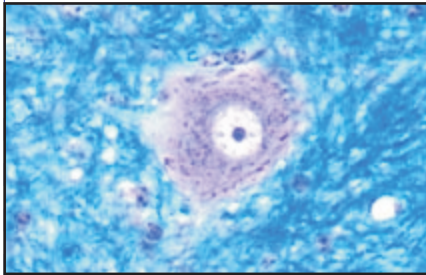


FIGURA 7 Alvéolos de pulmón humano mostrando la presencia de siderófagos o células de la insuficiencia cardíaca, que aparecen en la congestión pulmonar crónica por la incorporación de hemosiderina. Reacción de azul de Turnbull para detectar hierro. H-E. 600x

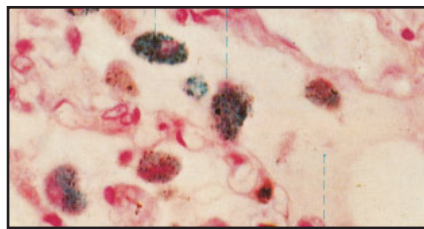
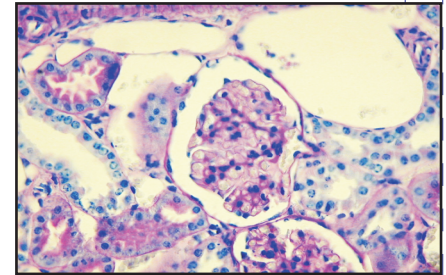


FIGURA 8 Técnica de PAS



Cuadro N°1

	Técnica de H-E. El polo apical aparece como vacío. Nada nos dice sobre la naturaleza química del producto de secreción.		Técnica de PAS con hematoxilina. Mediante esta técnica comprobamos la presencia de hidratos de carbono en el material a secretar. La flecha azul señala la membrana basal.		Técnica de azul alcian con hematoxilina. Mediante esta técnica comprobamos que el material secretorio contiene hidratos de carbono sulfatados o carboxilados.
--	--	--	---	--	--

FIGURA9 Técnica de JONES

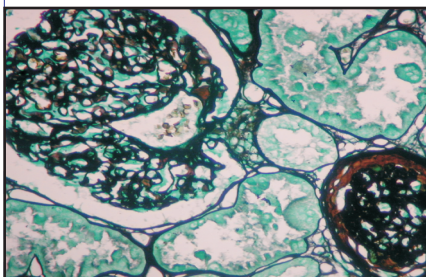


FIGURA10 Técnica Azul Alcian ph 2.5

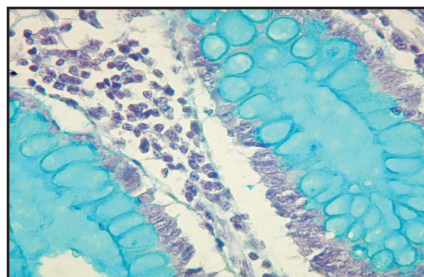


FIGURA11 Técnica de Ziehl Neelsen

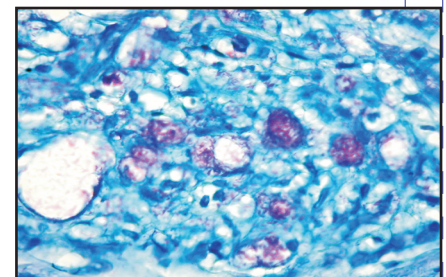


FIGURA 12 Técnica de Grocott

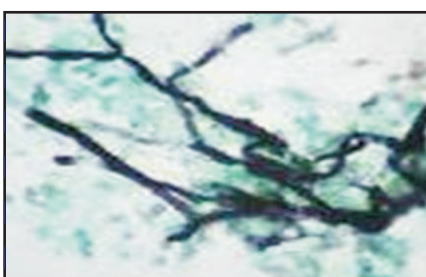


FIGURA 13 Tricrómico de Masson

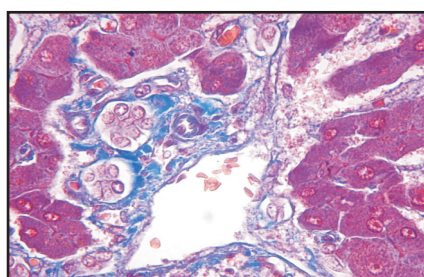


FIGURA 14 Técnica de Reticulo

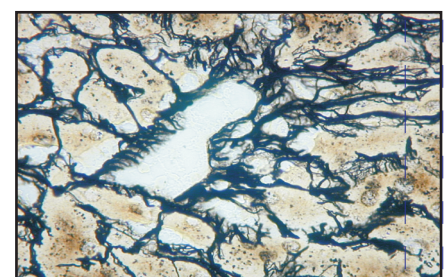


FIGURA 15 Importancia de la fijación en citología

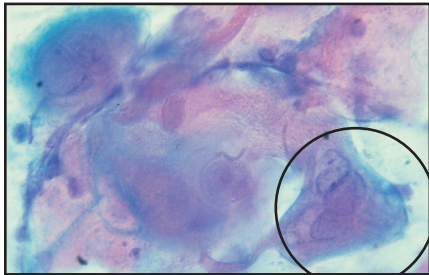


FIGURA 15Bis Importancia de la fijación en citología

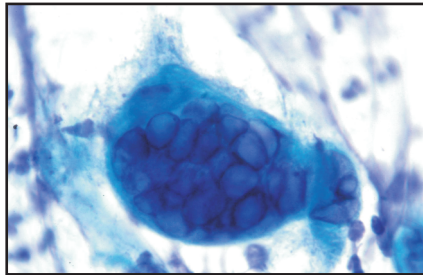


FIGURA 16 Citología Tinción 15

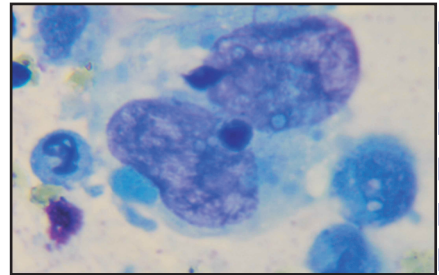


FIGURA 17 Coloración con técnica de Papanicolaou

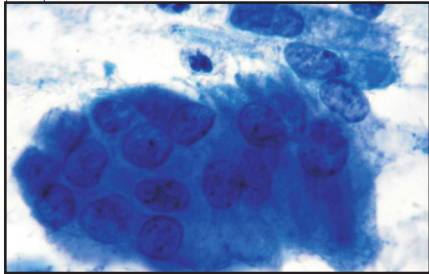


IMAGEN 18 Coloración con técnica de Papanicolaou

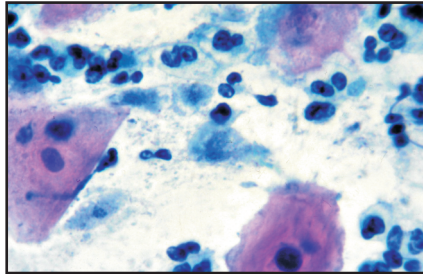


FIGURA 19 Coloración con técnica de Papanicolaou

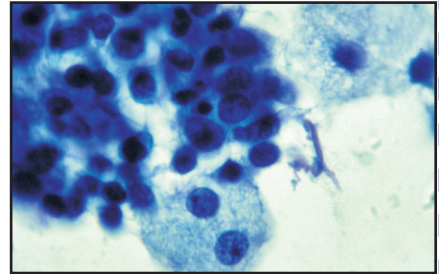


FIGURA 20

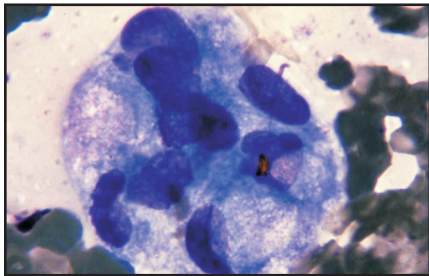


FIGURA 21

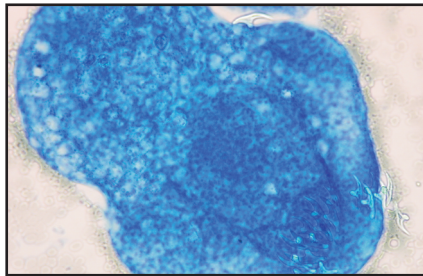


FIGURA 22

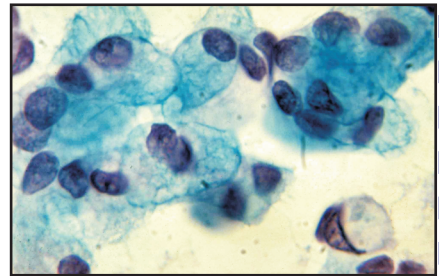


IMAGEN 23 Técnica de PAS y azul alcian en carcinoma mucinoso de pulmon

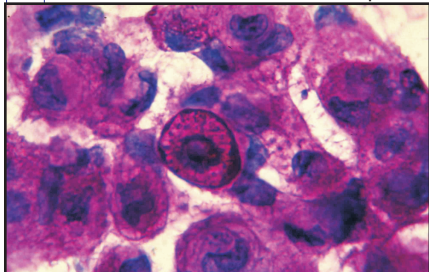
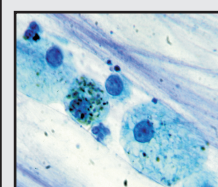
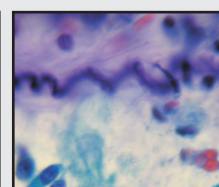


FIGURA 24



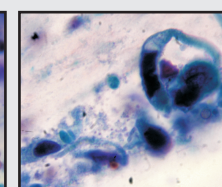
Macrófagos con depósitos de carbón

FIGURA 25



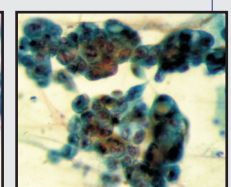
Espiral de Curshman

FIGURA 26



Carcinoma escamoso

FIGURA 27



Adenocarcinoma

IMAGEN 28 Asbestosis

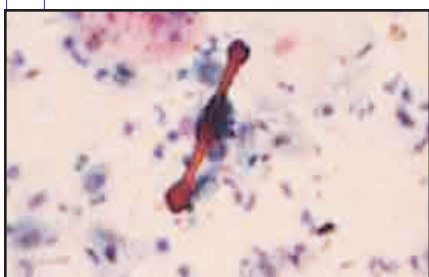


FIGURA 29

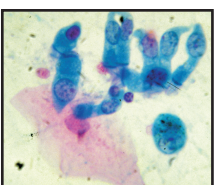


FIGURA 30

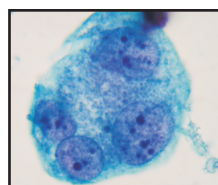
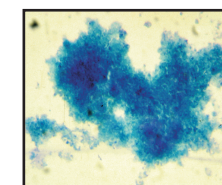
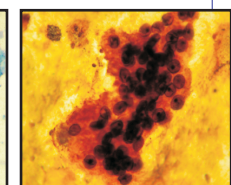


FIGURA 31



Papanicolaou

FIGURA 32



Grocot

FIGURA 33

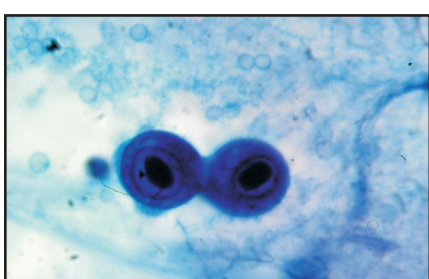


FIGURA 34

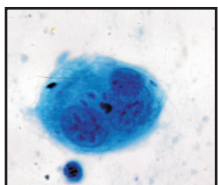


FIGURA 35

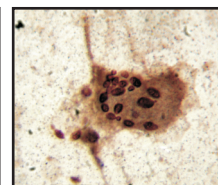


FIGURA 36

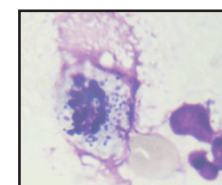


FIGURA 37

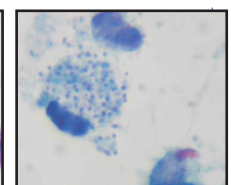


FIGURA 38

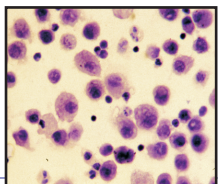


FIGURA 39

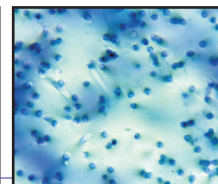


FIGURA 40

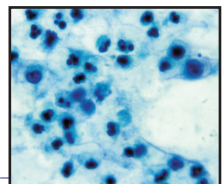


FIGURA39: ABSCESO: CON CAPA DE CELULOSA

FIGURA 40: ABSCESO: SIN CAPA DE CELULOSA