

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS
EN EL VALLE DE SULA
ESCUELA UNIVERSITARIA DE CIENCIAS DE LA SALUD

TECNICAS HISTOLOGICAS



Anatomía Microscópica
Código : AI122

Dr. Raúl Arita

Técnicas Histológicas

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

Métodos de Examen

- Examen Mediato o post- Morten

Requiere de la muerte celular y supone seguir una serie de pasos, la técnica histológica.

- Examen inmediato o in vivo

En fresco: animales unicelulares y células libres

Etapas del examen mediato

Técnica de la parafina :

- 1.- Obtención de la muestra
- 2.- Fijación
- 3.- Deshidratación y aclaramiento
- 4.- Inclusión en parafina y formación de bloques
- 5.- Obtención de cortes
- 6.- Coloración y montaje

Obtención de la muestra

- Muerte del animal
- Extracción del órgano
- Reducción a piezas



Extracción del órgano



Nos dirigimos directamente a los órganos que nos interesan estudiar. Descomponen : páncreas y porción inferior del tubo digestivo

Reducción a piezas



Métodos de obtención de la muestra

Biopsia. Consiste en la extracción de pequeños fragmentos de tejido de un organismo vivo.

Biopsia incisional

Se realiza seccionando con instrumentos cortantes como el bisturí.

Biopsia por punch

Se lleva a cabo con el punch, que es un instrumento filoso con forma de sacabocados.

Biopsia por punción

Se elabora con agujas de biopsia y, recientemente, también con agujas del tipo intramuscular (microbiopsia).

Biopsia endoscópica

Se hace a través de endoscopios, instrumentos flexibles que permiten la observación de algunas cavidades internas del organismo.

Resección quirúrgica. Consiste en la extirpación de órganos completos o de grandes partes de los mismos a través de un procedimiento quirúrgico.

Autopsia o necropsia. Es el examen de los órganos luego de la muerte, generalmente con el objetivo de determinar las causas de la misma.

Fijación

La fijación es el proceso de preservación (lo más cercano a su estado original en vivo) estructural y química de las células y materiales extracelulares; es decir, sin ser desplazadas en el espacio, las proteínas estructurales y los otros constituyentes del tejido deben volverse insolubles a los reactivos a los que posteriormente serán expuestos.



Cualidades de un buen fijador

- Actuar con rapidez, matando y fijando las células antes de que aparezcan los fenómenos post mortem (autólisis, desintegración)
- Poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta hasta en las capas profundas de la pieza a fijar
- Conservar, en lo posible, los detalles estructurales que presentaban in vivo
- Permitir o favorecer el empleo de los procedimientos necesarios para su observación ulterior (ejecución de cortes, coloración)
- Impedir la desaparición de los elementos solubles durante la fijación o después de ella
- No provocar o impedir la producción de estructuras artificiales
- No retraer excesivamente los tejidos ni volverlos friables o quebradizos.

Clasificación de los fijadores

Clasificación de los fijadores:



Deshidratación

La deshidratación es el proceso que tiene por finalidad la eliminación completa del agua de la muestra tisular, para que se pueda embeber (empapar) adecuadamente el tejido en aquellos medios de inclusión que no sean hidrosolubles.

El método clásico de deshidratación es la sustitución de agua por alcohol, pero puede realizarse utilizando cualquier reactivo capaz de absorber el agua de los tejidos. Las condiciones esenciales de

un buen agente deshidratante son dos:

1. No debe alterar la estructura tisular.
2. Debe poder mezclarse con el reactivo intermediario o agente aclarante.

Proceso de Deshidratación

El proceso de deshidratación suele realizarse mediante el empleo de alcohol etílico y en el suelen intervenir los parámetros siguientes:

- Graduación de los alcoholes: en la práctica la operación de deshidratación se realiza empleando una serie de alcoholes de gradación ascendente (50, 70, 80, 95, absoluto). Esto se hace así porque la acción brusca de un alcohol de mayor gradación sobre el tejido provocaría una marcada retracción de éste. El empleo de series más o menos largas de alcoholes de distinta gradación, así como la decisión de iniciar el proceso en un alcohol de gradación media o menor, van a estar en función de la experiencia del personal, de la fragilidad de los tejidos y del tipo de fijador utilizado, ya que los fijadores con base alcohólica realizan cierta deshidratación durante el proceso de fijación.

-

Proceso de Deshidratación

- Volumen y número de baños de deshidratación: no es necesario o preciso que el volumen de alcohol sea demasiado alto, por lo general suele recomendarse un volumen del baño 10 veces mayor al de la muestra que se va a deshidratar; es decir, multiplicar el número de baños: sucesivos y múltiples a fin de que:
 1. 1. Al permanecer menos tiempo en cada baño, haya menor riesgo de endurecimiento excesivo del tejido.
 2. 2. Sea menor el índice de saturación de agua en alcohol, lo que posibilita la reutilización del baño de alcohol.
 3. 3. Se controle mejor el grado de deshidratación de la pieza.
 4. 4. Haya menos riesgo de alteración tisular producida por un
 5. cambio brusco en la fuerza de estación del agua.
 6. Duración de la deshidratación

Agentes deshidratantes

Agentes deshidratantes	
Alcohol etílico	Es el de uso más común; excelente deshidratante, aunque tiene el inconveniente de que es muy inamable y su precio es superior al del alcohol metílico. Para economizar se puede utilizar alcohol etílico desnaturalizado con metanol, que también se denomina etanol para uso industrial.
Alcohol metílico	A veces se usa como sustituto del anterior. Es muy inamable y tóxico.
Acetona	Deshidratante muy volátil y con una acción rápida. Si el tratamiento de los tejidos es rápido, aumenta extraordinariamente su fragilidad.
Alcohol butílico o butanato	Deshidratante lento, miscible con la parafina; por tanto, permite prescindir de los agentes aclarantes.
Dioxan	Miscible con parafina, muy tóxico en espacios pequeños.
Alcohol isopropílico	No puede utilizarse en la inclusión en celoidina.
Tetrahidrofurano	No se usa. Agente de acción rápida que no causa excesiva retracción.



Aclaramiento

Su finalidad no es hacer transparente el tejido, aunque en algunas ocasiones puede ocurrir. Se trata de un proceso por el cual se consigue la sustitución del agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión que va a utilizarse. Con ello, se pretende que toda la pieza histopatológica se halle embebida, empapada en un agente químico líquido en el que pueda disolverse el medio de inclusión y, de este modo, penetrar en el tejido.



Agentes Aclarantes

Existen varios y su elección dependerá de su rapidez para eliminar el deshidratante.

- ❑ Dependerá también de la escasez de acciones nocivas sobre los tejidos y las células, de la adecuación del agente deshidratante y del medio de infiltración; de la facilidad de su eliminación de su toxicidad, peligrosidad, y de su coste.
- ❑ También se denominan líquidos intermediarios y se manejan mediante la realización de baños sucesivos de duración variable en función de las características del agente y del volumen de la pieza.
- ❑ En ocasiones se recomienda utilizar antes de los baños del aclarante diversas mezclas de agente deshidratante con aclarante en diferentes proporciones.
- ❑ El volumen del agente aclarante ha de ser el mismo que el del deshidratante y el proceso se puede acelerar con una suave agitación, ya manualmente, ya eléctrica.

Agentes Aclarantes

❖ **Xileno o xilol**

Ventajas

1. Agente aclarante más rápido
2. No disuelve la celoidina
3. Endurece poco los tejidos
4. Se elimina fácilmente del medio de inclusión
5. Es fácil apreciar el punto óptimo de dosificación.

Inconvenientes

1. Tóxico
 2. Sólo aclara desde alcohol absoluto
 3. Tiende a volver blanquecino el tejido
 4. Endurece si actúa mucho tiempo.
- * Interés práctico: Aclara especímenes con un grosor aproximado de unos 5 mm entre 1 h o media hora. Es el que se utiliza rutinariamente.

Agentes Aclarantes

❖ Toluol o tolueno

Ventajas

1. Rápido, pero menos que el Xilol
2. Endurece menos que el Xilol y no blanquea los tejidos
3. Puede conservar una muestra más de 12h sin alteración evidente.

Inconvenientes

1. Es tóxico
 2. Sólo se aclara desde alcohol absoluto.
- **Interés práctico:** Cuando no hay xilol, se usa toluol. El tiempo de aclaración varía entre 1 y 2 h.

Agentes Aclarantes

❖ Benceno

Ventajas

1. Es relativamente rápido
2. Endurece muy rápido y no blanquea
3. Causa retracción mínima
4. Se elimina fácilmente.

Inconvenientes

1. Muy tóxico
2. Altamente in amable.

❖ Cloroformo

Ventajas

1. Es muy tolerante
2. No afecta al tejido
3. Va bien para piezas delicadas
4. Es de acción lenta; p. ej., piel, muestras descalcificadas.

Inconvenientes

1. El tejido tiende a flotar en la superficie y hay que poner peso en la pieza
2. La difícil eliminación de parafina provoca deterioro del bloque
3. Olor desagradable.

Inclusión

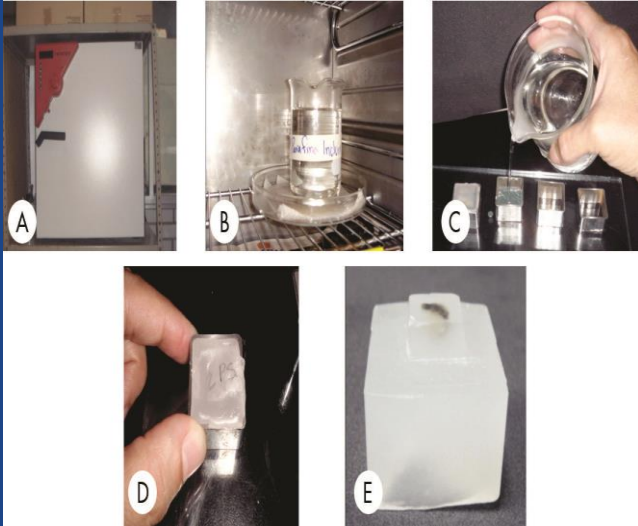
Para la obtención de cortes finos es un requisito indispensable que el tejido haya sido previamente endurecido hasta un cierto punto: cuanto mayor sea su firmeza, tanto más delgado resultará el corte histológico.

Con el fin de endurecer los tejidos existen dos métodos principales: la congelación o la inclusión.

- La inclusión permite obtener cortes finos y homogéneos, por lo que las piezas a cortar deberán tener una determinada consistencia y uniformidad. El medio de inclusión debe ser líquido que posteriormente se solidifique de manera homogénea y debe, asimismo, penetrar en todos los espacios libres de los tejidos.
- Algunos medios de inclusión son solubles en agua, otros no; caso en el que ha de ser reemplazado por el solvente apropiado al medio de inclusión que se utilice. Con excepción de tejidos congelados en los que se realizan los cortes de forma directa utilizando un criostato, la mayor parte de las muestras para estudio histopatológica se incluyen en parafina y requieren de un paso previo de deshidratación.

Pasos para la inclusión

Inclusión de muestra en bloques de parafina.



A. La inclusión en parafina se lleva a cabo calentándola por encima de su punto de fusión para que esté en estado líquido y pueda infiltrarse en el interior de la muestra. Existen parafinas con diferente punto de fusión y dureza.

B. Su elección depende de la consistencia del tejido y de la temperatura ambiente del laboratorio.

C. Una vez infiltradas las muestras, se confeccionan bloques con moldes adecuados.

D y E Al enfriarse, la parafina se solidifica y el bloque adquiere una dureza adecuada para ser cortado con el micrótopo de parafina



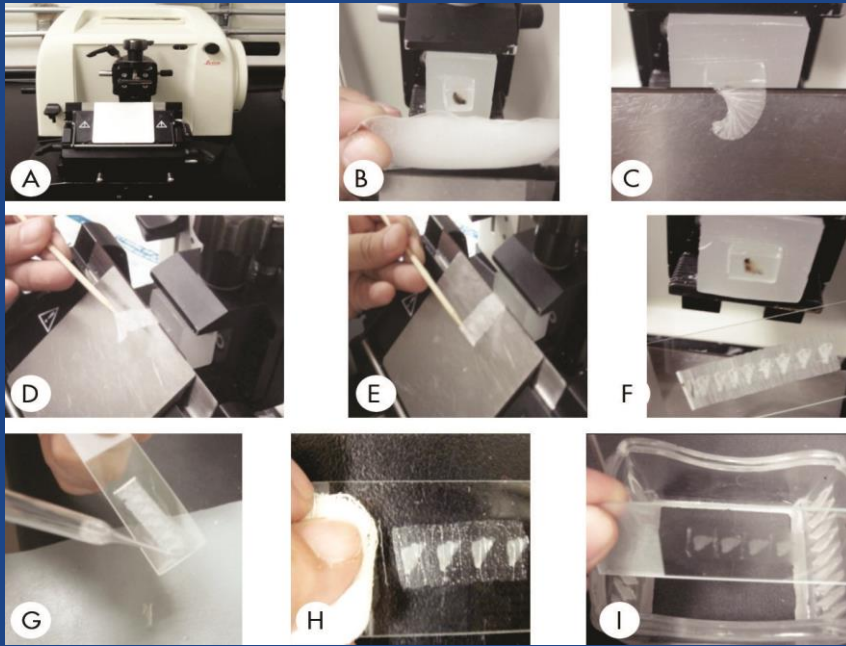
Obtención de los cortes

Los tejidos deben cortarse en laminas delgadas para posibilitar su observación con el microscopio; esto exige experiencia y paciencia, ya que se debe tener en cuenta que cortes demasiado nos facilitarían el desprendimiento de los tejidos en los múltiples lavados; en tanto que los de mayor grosor originarán superposición celular, dificultades en la desparafinación y disminución en el número de muestras.

Los instrumentos utilizados para la obtención de cortes son los **micrótomos** que constan, básicamente, de una navaja muy afilada que seccionará el bloque con la muestra y un mecanismo de avance automático regulable de unos pocos micrones.

Pasos para los cortes

Cortes en micrótopo de tejido incluido en parafina.



- A) Micrótopo,
- B y C) Los tejidos deben cortarse en laminas delgadas.
- D, E y F) Los cortes pueden recogerse con facilidad de manera seriada,
- G y H) Uso de Ruyter para extender y pegar los cortes en una sola laminilla,
- I) Las laminillas se van colocando en una canastilla para su almacenamiento.

Coloración y Montaje

La tinción histológica es un proceso utilizado para promover de color a los componentes de un tejido; para ello, existen múltiples métodos, unos generales, otros específicos, que permiten poner de manifiesto tanto la topografía tisular, como tipos celulares concretos, determinados organelos o estructuras intracelulares.

La **tinción histológica** también se diferencia entre física y química. **En una tinción física**, el colorante se disuelve en el sustrato; por ejemplo, el sudán III se disuelve en las grasas y se emplea para demostrar gotas lipídicas; por su parte,

en una tinción química, el colorante interacciona químicamente con el sustrato a través de fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, enlaces covalentes o enlaces electrostáticos.

En una tinción directa, el colorante interacciona en ese tenor con el sustrato; **en una indirecta**, se hace interaccionar con el sustrato,

Tipos de Colorantes

Tres clases de colorantes :

- ✓ Para diferenciar componentes ácidos y bases.
- ✓ Especializados que diferencian componentes fibrosos de la matriz extracelular.
- ✓ Sales metálicas



1. Esparafinización
2. Eliminar xilol
3. Hidratación
4. Coloración
5. Lavado
6. Disminuir coloración
7. Alcalinizar
8. Coloración
9. Lavado
10. Limpieza portaobjeto

Montaje

- ✓ Las preparaciones permanentes se montan con medios disueltos aplicados sobre la preparación y que endurecen por evaporación del disolvente. En tanto, las preparaciones histológicas y citológicas deben deshidratarse completamente antes del montaje.
- ✓ Como última etapa debe usarse xileno o un sustituto de éste, lo que asegura que el tejido se transparente y al poner el medio de montaje se extienda perfectamente bien, pues la mayor parte de los medios de montaje están diluidos en xilol.
- ✓ El montaje tiene lugar goteando aproximadamente 0.5 mL de un medio con una varilla de vidrio sobre portaobjetos en posición horizontal, para rellenar el espacio intermedio entre portaobjetos y cubreobjetos. Así que quede asegurada una distribución homogénea sobre la preparación, se coloca encima un cubreobjetos limpio, de manera que no queden burbujas de aire incluidas.
- ✓ A continuación se deja la preparación en posición horizontal hasta que después de cerca de 20 o 30 minutos esté seca y se pueda observar al microscopio.

Artificios de Técnicas

- Son todas las alteraciones que se producen en los preparados histológicos por defectos o fallas en una o más de las etapas de la técnica.
- Defectos de fijación, deshidratación, inclusión, pueden causar desgarros y retracciones.
- Si la acidez del formol no fue neutralizada, pueden aparecer gránulos coloreados por interacción del ácido fórmico con la hemoglobina.
- Durante el corte pueden aparecer desgarros por melladuras en la cuchilla.
- Si el corte no es cuidadosamente extendido pueden aparecer pliegues o
- arrugas.
- Defectos en la coloración son inherentes a la calidad y preparación de los
- colorantes así como insuficiente coloración.

Biopsia

Es el procedimiento en el que se realiza una extracción o extirpación de una pequeña porción de tejidos para examinarla microscópicamente y establecer un diagnóstico

Incisional : Se corta o se extirpa quirúrgicamente solo un trozo, masa o un tumor de tejido. (cerebro, hígado, pulmón , Riñón).

Excisional : Extirpación completa de un órgano o un tumor, bajo anestesia general o local. (exeresis)

Por aguja fina (PAAF) : Es la biopsia obtenida mediante la punción con una aguja de escaso calibre

Requisitos para obtener una buena muestra

- ✓ Técnica quirúrgica
- ✓ Fijación
- ✓ Envío al Laboratorio (ficha, exámenes)

Indicaciones de la Biopsia

- ✓ Para establecer un diagnóstico específico
- ✓ Conocer el grado de extensión o diseminación del proceso
- ✓ Para determinar un tratamiento, establecer un pronóstico y grado de malignidad
- ✓ Para valorar los resultados de un tratamiento

Métodos de Obtención para tejidos

- Insicional (bisturíes)
- Por sacabocados (biotomo)
- Curetaje (curetas)
- Trepanación (Trefina)
- Punción biopsia
- Punch, Trocar

Para una técnica quirúrgica adecuada se requiere:

Tamaño suficiente de la muestra

Orientación del corte en forma de cuña abarcando tejido sano y enfermo

Lavado suave

Frascos separados: Numero de muestras

Volumen muestra-fijador

Autopsia

Conjunto de procedimientos operatorios que tienen por objeto facilitar la exteriorización y examen de los órganos y tejidos que integran el organismo animal

Métodos

***MORGAGNI** : examen y disección insitu de las vísceras.

***ROKITANSKY** : extracción de los órganos cadavéricos incisión longitudinal

***GOHN'**: anterior modificado, extracción de los órganos, formando bloques

LUTELLE : se realiza una gran incisión oval de la cara anterior del tórax y abdomen

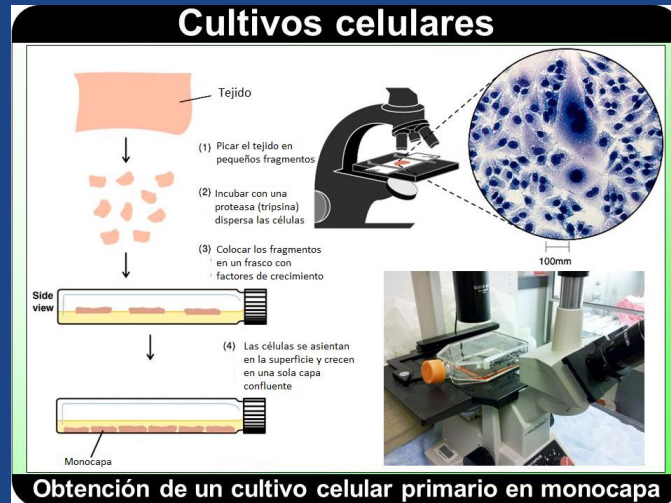
***VIRCHOW** : mezcla de todos los anteriores , reconocimiento global de todas las vísceras in situ y su análisis por separado. Es el más universalizado; incisión longitudinal en forma de Y.

✦ Citología Vaginal ✦

Es una prueba que consiste en una toma de una muestra de las células epiteliales que recubren el cuello del útero , las cuales se analizan mediante un estudio con microscopio y así poder observar precozmente cambios de las formas de la célula.

Metodos de estudio tisular

- ❖ Cultivo celular
- ❖ Histoquímica enzimática-
Inmunohistoquimicos
- ❖ Hibridación



Cultivos de Células y Tejidos

- Proceso en el cual tejidos y células vivos pueden ser mantenidos fuera del organismo.
- El crecimiento celular se da en soluciones complejas (sales, aminoácidos, vitaminas) a las cuales se les agregan suero o factores de crecimiento.
- Permite la observación del comportamiento celular bajo un microscopio de contraste de fase.

Los cultivos celulares son ampliamente utilizados para estudiar:
Cambios moleculares que ocurren en el cáncer
Analizar infecciones
Análisis genético de rutina o cromosómicos

Henrietta Lacks:
Paciente cuyas células de cáncer cervical fueron utilizadas para establecer una de las primeras líneas celulares, llamada células HeLa, todavía utilizadas en la investigación de estructura y función celular

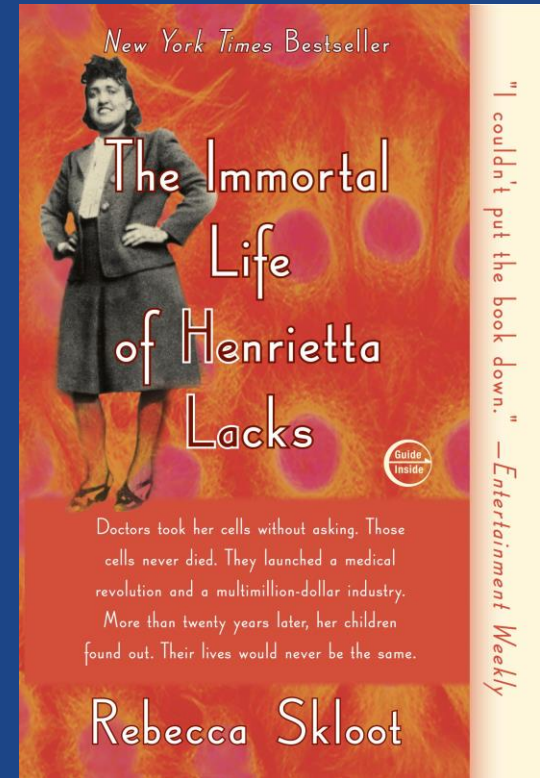
Aplicación Médica

Los cultivos celulares son ampliamente utilizados para estudiar:

- ✓ Cambios moleculares que ocurren en el cáncer
- ✓ Analizar infecciones
- ✓ Análisis genético de rutina o cromosómicos

Henrietta Lacks:

Paciente cuyas células de cáncer cervical fueron utilizadas para establecer una de las primeras líneas celulares, llamada células HeLa, todavía utilizadas en la investigación de estructura y función celular



Histoquímica Enzimática

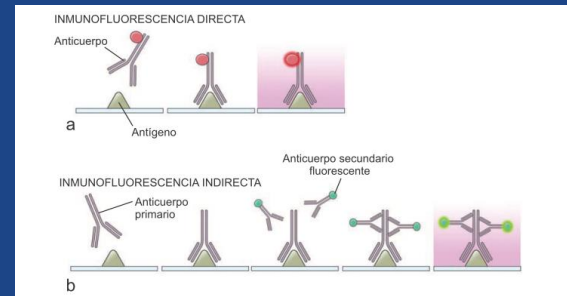
- Método que permite localizar estructuras celulares utilizando la actividad de enzimas específicas con un sustrato presente en esas estructuras.

- Tejidos no fijados o poco fijados
- Cortados con criostato

- Ejemplo: fosfatasas, deshidrogenasas, peroxidasas.

Inmunohistoquímica

- Permite localizar proteínas específicas mediante el uso de anticuerpos marcados.
- Se basa en la interacción de anticuerpos marcados contra antígenos específicos





GRACIAS