

Título

Manual práctico de técnica histológica

Autores

Alex Alexi Florez Sierra

Alejandra Rojas Garcia

Luisa Maria Malagon Becerra

Filiación

Fundación Universitaria de las Ciencias de la Salud

Índice

- 1. Introducción**
- 2. Objetivo**
- 3. Resultados**
- 4. Actividades complementarias**
- 5. Referencias bibliograficas**

1. Introducción

El presente documento pretende realizar una aproximación bibliográfica de las técnicas que se desarrollan en el laboratorio de patología, con el objetivo fundamental de ser una herramienta útil para los estudiantes de la Facultad de Citohistología como parte de su formación profesional, teniendo en cuenta los avances tecnológicos y científicos propios de las temáticas.

Este documento se organizará teniendo en cuenta los fundamentos teóricos de los métodos objetos de estudio, incluyendo procedimientos técnicos acompañados de ilustraciones que evidencien el desarrollo de las técnicas, y resultados de los diferentes métodos expuestos.

2. Objetivo

Definir los conceptos, preparación y usos de la técnica de fijación en los diferentes especímenes para el análisis histopatológico.

3. Resultados

DEFINICIÓN

La fijación consiste en someter el tejido a la acción de sustancias que interrumpen los procesos de degradación que aparecen tras la muerte celular con el fin de preservar la composición del tejido lo más cerca posible de cómo se encontraba en el organismo vivo. Produce un equilibrio en el tejido, deteniendo la degradación y coagulación de las proteínas celulares, lo que permite su posterior estudio en condiciones muy similares a la estructura viva.(1)

De nada sirve realizar un estudio histológico sobre un material con graves defectos de fijación a mayor temperatura ambiente, mayor velocidad de autólisis y putrefacción, ya que la temperatura óptima para la actividad enzimática y bacteriana oscila entre los 37 y 42 grados centígrados. Los tejidos ricos en enzimas digestivas, como el páncreas o que contienen fisiológicamente una gran cantidad de gérmenes, como el intestino, sufren estos fenómenos con mayor intensidad. (1)

El objetivo de la fijación es preservar los componentes celulares y tisulares. En el mejor de los casos, la célula y el tejido se conservan de tal manera que son como fueron durante la vida. Además de preservar los componentes del tejido, es importante que el fijador utilizado inhiba la autopsia. (2)

Los fijadores fijan principalmente proteínas, algunos fijadores actúan como mordientes para determinadas manchas. Este efecto se puede explicar diciendo que el agente de fijación permite o facilita una determinada reacción de coloración. (2)

Los fijadores generalmente tienen un efecto de endurecimiento en los tejidos, aunque este efecto generalmente debe mejorarse mediante la acción de un

alcohol fuerte antes de que los tejidos tengan la consistencia suficiente para permitir cortar en secciones (2)

Otro efecto de la fijación es hacer que las células sean insensibles a las soluciones híper e hipotónicas.(2)

Los fijadores ayudan con la diferenciación óptica de los componentes celulares y tisulares, su índice de refracción aumenta en diferentes grados.(2)

CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DE UN FIJADOR IDEAL

- 1. La capacidad de bloquear inmediatamente la autólisis depende principalmente de su capacidad para producir desnaturalización o floculación de proteínas, paralizando así la actividad enzimática del tejido. (3)**
- 2. efecto microbicida que impide la acción bacteriana desencadenante de la putrefacción. (3)**
- 3. no provocar sobre el tejido retracciones o distorsiones que determinen anomalías en su arquitectura. (3)**
- 4. Inducción de cambios en la textura y composición de los tejidos que favorezcan la inclusión, corte y tinción del material histológico. (3)**
- 5. el volumen necesario de fijador está determinado por el del tejido que se va a fijar. La relación entre el volumen del fijador y la pieza debe ser 20 a 1. (3)**
- 6. el pH del líquido fijador debe aproximarse al pH fisiológico, salvo que su composición deba contener ácidos. (3)**

CLASIFICACION

TIPOS DE FIJADORES

FIJADORES SIMPLES

FIJADORES POR DESHIDRATACION

Eliminan el agua libre ligada a las moléculas proteicas, este cambio proteico es conocido como desnaturalización y provocan grandes cambios en la morfología. Las grasas son insolubles en estos por ello solo hay una disolución parcial. Algunos son: (3)

- Alcohol etílico
- Acetona
- Etanol

FIJADORES POR CAMBIOS EN EL ESTADO COLOIDAL DE LAS PROTEINAS

Son ácidos, tienen una alta velocidad de penetración y un cierto poder decalcificante. La estabilidad de las moléculas es mínima y su máxima disociación en este punto libera el agua, ya que no se mantiene la disociación electrostática que fija los iones de agua a su estructura molecular.(3)

- Acido acético glacial
- Acido tricloroacetico
- Acido cromico

FIJADORES QUE ACTUAN POR FORMACION DE SALES EN LOS TEJIDOS

Poseen una gran velocidad de fijación ya que la formación de sal es instantánea, sin embargo se crea una barrera originada por los proteinatos formados como obstáculo mecánico dificultándola penetración del fijador lo que provoca endurecimiento por lo cual es necesario usarlo en mezclas donde se amortigüe el defecto. (3)

- Cloruro de mercurio
- Dicromato de potasio
- Acido pícrico

FIJADORES POR RETICULARIZACION DE PROTEINAS

Este proceso ocurre cuando estas moléculas se desnaturalizan no por precipitación, sino por una ruptura masiva de los enlaces de hidrógeno en la estructura helicoidal de las moléculas de proteína y la formación de una red reticular a través de la asociación química entre el líquido fijador.(3)

- Formaldehido o formol
- Glutaraldehido
- Tetroxido de osmio

FORMOL: Más comúnmente, se usa formalina al 10%. Es el fijador por excelencia en anatomía patológica, ya que permite una buena conservación de todos los detalles histológicos del tejido y realiza diversas técnicas especiales. Es el fijador más económico, conserva la estructura tisular, tiene una velocidad de penetración media, es un excelente fijador para el tejido adiposo y para los lípidos en general, así como para el tejido nervioso.(4)

El tiempo que tarda la formalina en unirse a las proteínas y fijar el tejido es una variable que depende de la formalina, no del tamaño de la pieza. Las piezas pequeñas toman exactamente la misma cantidad de tiempo que las piezas grandes y la unión de la formalina al tejido disminuye con el tiempo. Por tanto, la resistencia de las piezas en formaldehído más allá de las 72 horas no mejora la fijación. Un aspecto a evitar es el secado del tejido, ya que el secado puede provocar cambios morfológicos, especialmente una mala definición de la cromatina y cambios estructurales, especialmente en los bordes. Por un lado para poder inhibir la unión antígeno-anticuerpo y por otro lado, dado que el tejido seco es más absorbente, para aumentar la unión específica y perturbar la interpretación. (4)

FIJADORES CON PODER DECALCIFICANTE

Son la combinación de diversos fijadores simples en disoluciones complejas, que pretende sumar las ventajas de cada uno, amortiguando sus inconvenientes.(2)

FORMULAS

Según bancroft, el proceso y las cantidades para preparar los fijadores más importantes para el laboratorio de patología son:

B5	
Reactivos	Cantidad
Cloruro de mercurio	12gr
Acetato de sodio	2,5gr
Agua	200ml

Bouin	
Reactivos	Cantidad
Acido pícrico	1500ml
Formaldehido	500ml
Acido Acético	100ml

Zenker	
Reactivos	Cantidad
agua	250 ml
Cloruro de mercurio	12,5gr
Dicromato de potasio	6,3gr
Sulfato de sodio	2,5gr

Acido acético glacial	5ml
-----------------------	-----

Formol bufferado	
Reactivos	Cantidad
Agua	900ml
Formaldehido	100ml
Cloruro de sodio	9gr
Fosfato de sodio dibasico	12gr

En nuestro laboratorio para prácticas de técnica histológica usamos las preparaciones de la siguiente manera:

Tecnica y formulas para cada Fijador

ESPECIAL PARA ORGANOS ENDOCRINOS, TEJIDO EMBRIONARIO, TEJIDO HEMATOPOYETICO, TESTICULO BOVIN

ACIDO PICRICO 1%	750ML
FORMOL BUFFERADO	250ML
A.A.G	5ML

ESPECIAL PARA MEDULA OSEA 85

AGUA	200ML
CLOR. MERCURIO	12
ACETATO DE SODIO	2,5

FIJADORES CON PODER DECALCIFICANTE

ESPECIAL PARA RIÑON ZENKER

AGUA	250ML
CLORURO DE MERCURIO	12,5
DICROMATO DE POTASIO	6,3
SULFATO DE SODIO	2,5
A.A.G	5ML

FOR DESHIDRATACION

ETANOL	70ML
AGUA	30ML

CAMBIOS EN EL ESTADO COLOIDAL DE LAS PROTEINAS:

A.A.G	5ML
AGUA	95ML

FIJADORES SIMPLES

POR FORMACION DE SALES DE LOS TEJIDOS:

ACIDO PICRICO	1GR
AGUA	100ML

POR RETICULARIZACION DE PROTEINAS:

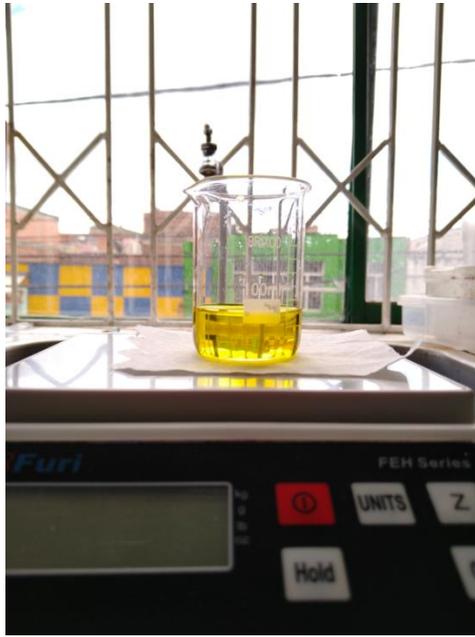
FORMOL	10ML
AGUA	90ML
F.S MONOBASICO	0,4
F.S DIBASICO	0,6

Actividades complementarias.

- 1. Prepare 25 ml de un fijador para tejido hematopoyético**



- 2. Prepare 70 ml de un fijador que funciona por formación de sales**



Referencias

- (1) Herminia Casandra Rodiles Martínez, 2008, Citohistopatología, La Habana, Editorial Ciencias Médicas
- (2) Harry Montgomerie Carleton, 1967, Histological technique, New York; London
- (3) Raimundo Garcia del Moral, 1993, Laboratorio de anatomía patológica, Madrid, Interamericana-McGraw-Hill
- (4) Dios soler, Marcela, 2018, guía de inmunohistoquímica para técnicos, Buenos Aires

