



PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO RUTINARIO DE LOS TEJIDOS

Autores: Carmen Elena Ferrer Magadán¹, Elicel Llanes ², Letania del Carmen Reyes Mesa ³, Madeleyne González Broche⁴, Dania Lastres Pantoja⁵

¹ M.Sc. Bioética Médica, Esp. 1r grado Medicina General Integral y Anatomía Patológica, 2do grado en Histología,

² Lic. Citohistopatología.

³ Esp. 1r grado en Medicina General Integral e Histología,

⁴ Esp. 2do grado en Histología

⁵ Lic. Citohistopatología.

Dpto. Ciencias Morfológicas. Facultad de Ciencias Médicas de Manzanillo, Universidad de Ciencias Médicas de Granma. Cuba.

carmenferrer@infomed.sld.cu.

RESUMEN

Introducción: las técnicas utilizadas por los histólogos son diversas, se refieren al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico, con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través del microscopio.

Objetivo. Describir el procesamiento histológico rutinario en los laboratorios de histología para la observación y diagnóstico de los tejidos.

Desarrollo: se realiza la descripción de los pasos de la técnica de inclusión en parafina, la tinción de los tejidos con el empleo de colorantes de rutina

Conclusiones: La técnica histológica es muy empleada en laboratorios y hospitales. La aplicación correcta de todos los pasos de la técnica, garantizan la calidad de la observación, por tanto, del diagnóstico

Palabras clave: técnica histológica, procesamiento histológico rutinario.



INTRODUCCIÓN

La histología moderna no es sólo una ciencia descriptiva, sino que también incluye muchos aspectos de la biología molecular y celular, que ayudan a describir la organización y función celular, el estudio científico de las estructuras microscópicas de los tejidos y órganos del cuerpo.⁽¹⁻⁵⁾

Las técnicas utilizadas por los histólogos son diversas, se refieren al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico, con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través del microscopio.⁽⁶⁾

Los laboratorios de histología utilizan microscopios ópticos y, con mayor frecuencia, microscopía virtual, que representa métodos para examinar muestras microscópicas en la pantalla de un ordenador o dispositivo móvil.

Como técnicas auxiliares se emplean: • histoquímica y citoquímica, • inmunoquímica y técnicas de hibridación, • autorradiografía, • cultivo de tejido y órganos, • separación de células y orgánulos por centrifugación diferencial, • microscopios y técnicas microscópicas especializadas.^(5,6)

El corte de rutina, inclusión en parafina, teñido con hematoxilina y eosina es la muestra que se utiliza con mayor frecuencia.

Objetivo: Describir el procesamiento histológico rutinario en los laboratorios de histología para la observación y diagnóstico de los tejidos.

DESARROLLO

Pasos de la técnica de inclusión en parafina ^(1,3,5-9)

1. Toma de la muestra.
- 2. Fijación.**
3. Recepción y registro de la muestra.
4. Descripción macroscópica y corte.
- 5. Inclusión de la muestra.**
6. Confección de los bloques.
- 7. Corte histológico – Microtomía.**



8. Tinción de los cortes.

9. Montaje de la preparación histológica.

10. Observación al microscopio y diagnóstico

TOMA DE LA MUESTRA: Recogida del tejido de interés del paciente para su estudio, ya sea una biopsia en la que obtenemos la muestra de un individuo vivo, o un estudio histopatológico donde se realiza un muestreo de varios o todos los órganos después de una necropsia previa.

FIJACIÓN

Consiste en interrumpir los procesos de autólisis y putrefacción que aparecen tras la muerte celular, se utiliza para abolir el metabolismo celular, impedir la degradación enzimática de las células y tejidos destruir microorganismos patógenos tales como bacterias, hongos o virus, de manera que trata de conservar la arquitectura y composición tisular lo más próxima posible a como se encontraba en el organismo vivo dando una imagen estática del tejido.

La fijación se utiliza para: endurecer el tejido como resultado de la formación de enlaces cruzados o de la desnaturalización de moléculas proteicas, lo que aumenta la consistencia del tejido facilitando el corte, mejora la captación de los colorantes (efecto mordiente) y tiene acción antiséptica.

Hay diferentes agentes fijadores pero el más comúnmente utilizado para el procesado histológico es el formaldehído al 10 % (también conocido como formol), que es un tipo de fijador químico que funciona por inmersión de la muestra en la solución fijadora.

La velocidad de fijación de la muestra va a depender del tamaño de la muestra y del tipo de tejido.

En este paso el tejido obtenido se coloca en una sustancia fijadora, generalmente líquida, para evitar los cambios post-mortem y para lograr conservar la forma original del tejido. Uno de los fijadores más usado es el formol al 10% (formaldehído).

En el caso de que se realicen estudios mediante el microscopio electrónico, se emplean otros fijadores como: paraformaldehído, glutaraldehído y tetróxido de osmio.

Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos:

a) **Oxidantes:** el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o "sublimado corrosivo", ácido pícrico, ácido acético.



b) **Reductores:** el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico.

La acción oxidante o reductora de los fijadores le confieren a las células ciertas condiciones que posibilitan una mejor aplicación de las sustancias colorantes, por ejemplo: el alcohol etílico absoluto conserva el glucógeno, el bicloruro de mercurio provoca que las anilinas colorean de manera más brillante a las fibras colágenas, el bicromato de potasio facilita la coloración de las mitocondrias, el ácido acético permite una mejor tinción de los núcleos, el cloruro de calcio conserva e insolubiliza parcialmente a los lípidos.

Recepción y registro de la muestra

Cuando llega la muestra, se le asigna un número interno del laboratorio y se registra.

Descripción macroscópica y corte

El examen macroscópico comienza con la observación y caracterización de los hallazgos anormales.

Se describe exactamente el tipo de material remitido para su estudio, incluyendo sus dimensiones y las lesiones que contiene, así como se especifica su morfología, aspecto, coloración.

Se seleccionan las zonas más significativas de las lesiones halladas sobre las que va a realizarse el estudio microscópico y se realiza el corte en pequeñas porciones (no deben superar los 3 -5 mm de espesor) para posteriormente introducirlo dentro de una casete de plástico y cerrarlo.

La descripción macroscópica es tan importante como la microscópica porque las lesiones macroscópicas de algunas enfermedades son suficientemente distintas en su comportamiento que permiten su diagnóstico presuntivo basado sólo en su observación directa.

INCLUSIÓN

Consiste en dar dureza homogénea al tejido para poder ser cortado posteriormente a una medida de micras mediante el micrótomo y poder ser observado en el microscopio.

La dureza se consigue mediante la inclusión en un medio sólido, como la parafina, que es una sustancia cerosa que a temperatura ambiente es sólida. Hay que tener en cuenta que la parafina es hidrófoba, por lo tanto no se va a mezclar bien con el agua que hay en el tejido ni con el formol (que es una solución acuosa), y hay que eliminarla.



Para conseguirlo se realiza una deshidratación mediante una serie de alcoholes de gradación creciente (50°C, 70°C, 80°C, 95°C y alcohol absoluto) y un posterior aclaramiento, en el que sustituimos el agente deshidratante por una sustancia miscible con la parafina, como es el xileno.

A continuación, ya se puede proceder a la infiltración en parafina de la muestra histopatológica. Todo este proceso se realiza en el procesador automático de tejidos y tiene una duración aproximada de 12 horas.

Inclusión



Lavados

Se debe lavar el tejido para quitar el exceso de fijador (químico).

El exceso de fijador durante el posterior proceso de infiltración, incluso en la microtomía, podría afectar los cortes histológicos, y por ello se debe lavar con agua destilada.

Deshidratación

La deshidratación se realiza empleando diferentes soluciones de alcohol a concentraciones crecientes hasta llegar a alcohol puro.

La técnica de la parafina, para cortar fácilmente.

Deshidratación. Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La misma, debe ser completa, ya que, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida.

Para tal fin se utilizan líquidos deshidratadores en los cuales se sumergen los tejidos: alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el dioxano y el cloroformo.



En el caso de la inclusión en parafina, las muestras se deshidratan en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de alcohol etílico.

- 1) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 2) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 3) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 4) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 5) alcohol etílico al 100 % (absoluto) -----1 hora
- 6) alcohol etílico al 100 % (absoluto)-----1 a 1.5 horas.
- 7) alcohol absoluto (50%) - xilol (50%)-----1 hora
- 8) xilol-----1 hora
- 9) xilol-----1 hora
- 10) Primer baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 11) Segundo baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 12) Tercer baño de parafina-----30 a 60 minutos

Se deben agitar las muestras con cierta frecuencia

Los tiempos indicados son los que se aplicarán a las muestras de tamaño mediano (1 cm² x 0.5 cm. de grosor). Los tiempos pueden disminuirse o incrementarse si las piezas son más pequeñas o más grandes.

La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador muestran un aspecto turbio blanquecino

Aclaramiento

En este paso se sustituye el alcohol por una sustancia que haga de intermediario entre el agua y la parafina que se usará posteriormente para la infiltración. La sustancia comúnmente utilizada es el xilol (xileno) aunque también pueden usarse otros disolventes orgánicos como benceno.

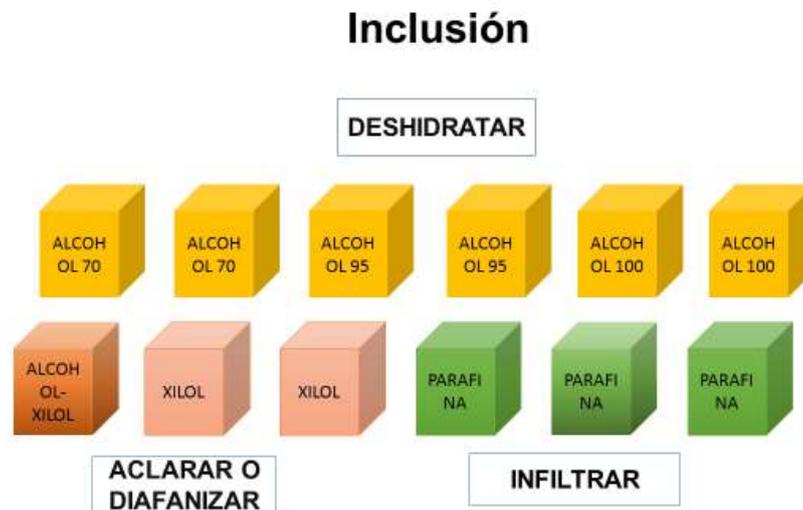
Tras varios baños, se consigue eliminar el alcohol puro y todo el tejido queda impregnado del xilol, el cual habrá entrado hasta lo más profundo del tejido. Durante este proceso el tejido pierde color dando lugar al término de aclaramiento



Infiltración

La muestra se coloca en parafina histológica en estado líquido, lo cual se consigue calentando la parafina por encima de su punto de fusión. Como se ha dicho en el paso anterior el tejido está completamente impregnado de xilol que es un disolvente de la parafina, por lo que tras varios baños con concentración creciente de parafina se consigue embeber todo el tejido en parafina pura.

La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas.



6. Confección de bloques

Consiste en la obtención de un bloque sólido con la muestra histopatológica. Para obtenerlo se utiliza un molde previamente relleno con parafina líquida donde se coloca el tejido de estudio y se cierra con una de las partes del casete para que el bloque tenga un soporte cuando se saque el molde. A continuación se pone en una superficie fría a 4 °C para que el molde se solidifique y ya poder proceder al corte. Es importante colocar la muestra en la orientación adecuada al tipo de corte que se desea realizar



CORTE HISTOLÓGICO – MICROTOMÍA

La microtomía es la técnica mediante la cual se consiguen cortes con medida de micras utilizando un micrótopo, de corte horizontal o vertical.

Se realizan cortes histológicos muy delgados según lo requerido o la costumbre del laboratorio donde se realice la técnica. Los cortes van desde 0,5 micras hasta 8 u 10 micras. Un buen corte histológico debe tener un grosor aproximado medio, de 3-5 micras para que sea fácilmente atravesado por la luz del sol y atravesese los poros celulares.

Una vez realizado el corte se coloca en el baño de flotación (35 – 45 °C) y se recoge con el portaobjetos, se marcan con la fecha, el tipo de tejido y la tinción con que se van a procesar. Los cortes obtenidos se montan sobre portaobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje (pineno o resinas de acrílico) como adhesivo.

El ángulo de corte entre el cuchillo del micrótopo y el bloque ha de estar entre 10° y 15°. Una vez realizado el corte se da un baño de agua destilada, para que la parafina se estire. Luego de preparada la lámina debe ser incluida en la estufa aproximadamente 15-20 min para eliminar el resto de parafina.



TINCIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS:



Tinción de los cortes histológicos Protocolo básico

- Desparafinado
- Rehidratación
- Hematoxilina
- Diferenciación
- Azulado
- Eosina
- Deshidratación
- Aclaramiento
- Montaje



Tinción: proceso por el cual se ponen en evidencia las estructuras celulares y tisulares mediante el uso de colorantes. Su fundamento radica en la propiedad que poseen todos los tejidos para incorporar y fijar sustancias colorantes determinadas.

La mayoría de ellos son acuosos, por lo que es necesario sacar la parafina de la muestra para que pueda entrar el colorante; para ello se ponen los portaobjetos con la muestra en una estufa a 60 °C para que la parafina se derrita, y a continuación se colocan las muestras en una serie de alcoholes de gradiente



decreciente para volver a rehidratar las muestras y puedan ser teñidas con los colorantes hidrosolubles.

Este proceso dura aproximadamente 45 minutos.

Hay muchos tipos de tinciones, pero la que se utiliza de forma rutinaria es la Hematoxilina – Eosina (H & E) porque da una visión en conjunto de las estructuras de un tejido o de la arquitectura de una lesión. Se basa en la afinidad ácido-base de los colorantes con las diferentes estructuras celulares y está constituida por dos colorantes:

- Hematoxilina: es un colorante básico que reacciona con las estructuras de carácter ácido, como por ejemplo los núcleos tiñéndolos de azul purpúreo a negro.
- Eosina es un colorante ácido que reacciona con las estructuras de carácter básico, como por ejemplo el citoplasma y lo tiñe de rosado a rojo.
- Las células, por sí mismas, no poseen coloración. Por tanto, para poder observar la morfología tisular deben "teñirse".
- La tinción más usada o también llamada "de rutina" es la de hematoxilina y eosina (H&E).

Las hematoxilinas se clasifican típicamente según el mordiente utilizado antes de la tinción. Los mordientes refuerzan la carga iónica positiva de la hematina. Esto ayuda a la unión de la hematina al componente de tejido aniónico, que es la cromatina más común. El tipo de mordiente también influye en el color final de los componentes teñidos. El mordiente más común utilizado en la histología de rutina es el sulfato de aluminio y amonio (alum). Este mordiente hace que los núcleos se vean de color rojo, que luego cambia al azul más familiar cuando la muestra se enjuaga posteriormente con una solución débilmente básica.

La hematoxilina de Mayer es una hematoxilina alumínica, una tinción de uso común que puede emplearse para tinciones progresivas y regresivas. Se utiliza a menudo como contratinción nuclear para tinciones especiales e inmunohistoquímica.

Para estas aplicaciones, la solución de Mayer se utiliza para teñir los núcleos y luego teñir de azul sin utilizar un diferenciador. La de Mayer es una tinción a base de agua.



La hematoxilina de Harris es otra hematoxilina alumínica de uso frecuente que puede utilizarse para la tinción progresiva de muestras citológicas, pero también para la tinción progresiva o regresiva en histología. La tinción tiende a proporcionar detalles nucleares claros. Uno de los retos al utilizar Harris es que se diferencia mejor con un ácido suave, en lugar de los diferenciadores a base de ácido clorhídrico más utilizados. Harris es una tinción a base de alcohol. La hematoxilina de Gill es una hematoxilina alumínica. Puede utilizarse como tinción progresiva o regresiva y está disponible en diferentes concentraciones. Debido a que se fabrica con agua y etilenglicol, la autooxidación de la tinción se evita normalmente durante meses, lo que la hace más estable que la hematoxilina de Harris. Sin embargo, la naturaleza de la de Gills hace que pueda producirse tinción extranuclear. La mucina e incluso los adhesivos utilizados en la preparación pueden contaminarse con Gills.

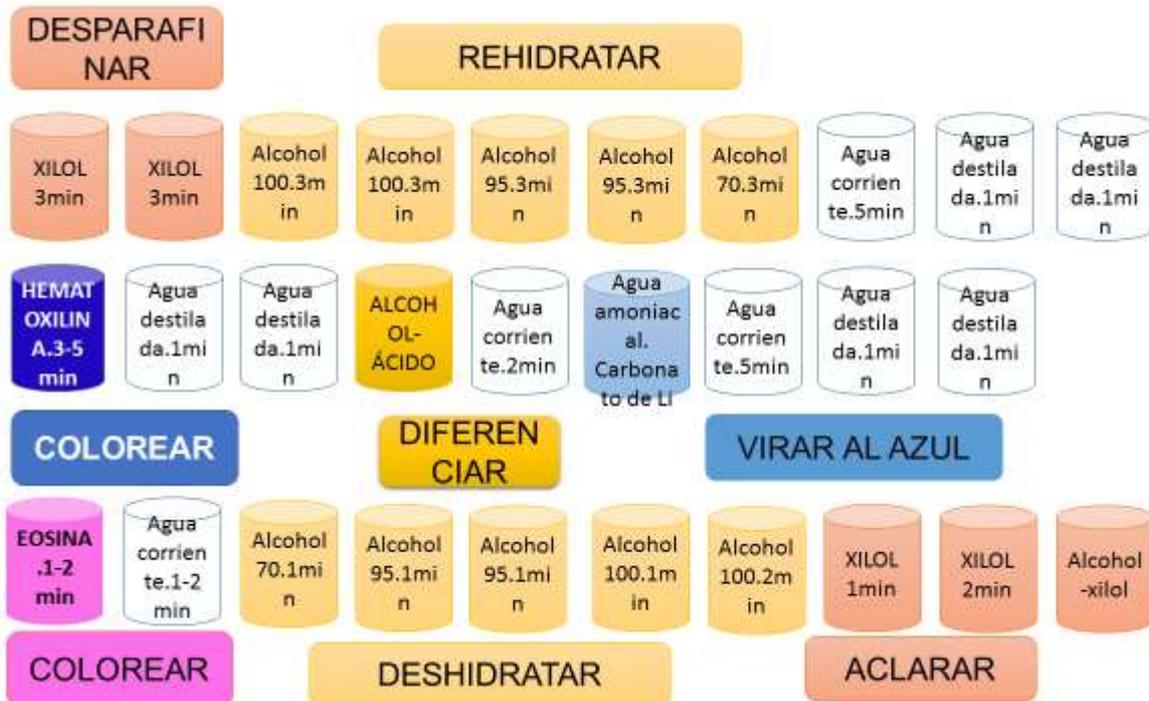
Las hematoxilas que utilizan sales de hierro como mordiente se utilizan normalmente en tinciones especiales. Esto se debe a que pueden mostrar más estructuras tisulares que las hematoxilas alumínicas, como las fibras de mielina y elastina. Uno de las más conocidas es la de Weigert, que se utiliza en la tinción Verhoff-Van Gieson.

La eosina es la contratinción más comúnmente utilizada que distingue entre el citoplasma y los núcleos de las células. Suele ser rosa, con diferentes tonos de rosa para diferentes tipos de fibras de tejido conjuntivo

- La eosina Y es la forma de eosina más utilizada y puede utilizarse tanto en agua como en alcohol. La adición de una pequeña cantidad de ácido acético definirá aún más la tinción de la eosina. La eosina con floxina añadida realzará los rojos observados con la tinción con H&E. Por lo tanto, para aquellos que quieran ver rojos más intensos, se puede añadir floxina.
- La tinción H&E proporciona una imagen completa de la microanatomía de órganos y tejidos. La hematoxilina tiñe con precisión los componentes nucleares, incluidos la heterocromatina y los nucléolos, mientras que la eosina tiñe los componentes citoplasmáticos, como el colágeno y las fibras elásticas, las fibras musculares y los glóbulos rojos. En una H&E de alta calidad, existen diferencias sutiles en los tonos de color producidos por las tinciones,



especialmente la eosina, y esto ayuda a la detección e interpretación de los cambios morfológicos asociados con la enfermedad.



9. Montaje

Montaje



El proceso de montaje tiene como finalidad que las muestras que han sido teñidas puedan ser observadas de manera óptima al microscopio y puedan mantenerse en excelentes condiciones de conservación. Esto se consigue mediante el medio de montaje, que son resinas sintéticas que ponemos entre el



portaobjetos y el cubreobjetos. Este no es miscible en agua con lo que es necesario volver a deshidratar los tejidos (mediante la serie de alcoholes de graduación creciente) y un posterior aclarado con xileno, para poder colocar el medio de montaje, el cubreobjetos y finalmente poder hacer la observación al microscopio.⁽⁶⁻⁹⁾

OBSERVACIÓN



La observación es el objetivo final de la técnica histológica. Se observa la laminilla al microscopio y se busca lo que se necesite ver para llegar a un diagnóstico.

CONCLUSIONES

La técnica histológica es muy empleada en laboratorios y hospitales.

La aplicación correcta de todos los pasos de la técnica, garantizan la calidad de la observación, por tanto, del diagnóstico

Bibliografía consultada

1. Bermejo M.^a José. Anatomía Patológica del Servicio Gallego de Salud. Volumen 2. 1^a Edición. España: Editorial MAD S.L.; 2006.
2. Cabrera Flores Henry Brigadiel Hernández Sequeira. Efraín Alejandro. Estudio Situacional de la cisticercosis bovina en el matadero MACESA, Juigalpa Chontales, en el período de enero-julio de 2008” 2008.Managua(tesis) Nicaragua



Tercer Congreso Virtual de
Ciencias Básicas Biomédicas en Granma.
Manzanillo.



3. César Eduardo Montalvo Arenas. Técnica Histológica. Ago. 2010.
4. Faria R, Belén A, Bascones A. Nuevos métodos de diagnóstico en Periodoncia. Métodos bioquímicos. Av Periodon Implanto! 2001; 13, 1: 29-37
5. García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. 1ª edición. Madrid: S.A. McGraw- Hill / Interamericana de España; 1993
6. Pawlina, Wojciech. Ross. Histología. Texto y Atlas. 7ma ed. Capítulo 1. Técnicas histológicas. P 1-23
7. Soto Bernal, Leonelo Enrique. Cisticercosis subcutánea. EASMERA: Vol. 14, N°1-4. 1986. Universidad del Zulia. Maracaibo. Venezuela.
8. Técnicas histológicas del Dpto. De Histología del ICBP "Victoria de Girón"
<https://especialidades.sld.cu>
9. Técnicas histológicas. Protocolos. Atlas de histología vegetal y animal.2019
<https://mmejias.webs.uvigo.es/6-técnicas/protocolos/p-tinción-pas>