

1. ESTUDIO SOBRE EL GLUCÓGENO

RECEPCIÓN: En fresco porque vamos a fijar con un fijador diferente al habitual.

FIJACIÓN: El glucógeno se disuelve en agua por lo que usaremos fijadores con poca concentración de agua como es el etanol al 80%.

El lavado postfijación se hará con otro reactivo diferente al agua destilada.

DECALCIFICACIÓN: Se realizará si viene indicado en el informe que hay presencia de calcificaciones en el tejido, y siempre que no se sospeche una enfermedad metabólica ósea.

INCLUSIÓN: Deshidrataremos con baños sucesivos en alcoholes de graduación creciente, aclararemos con baños sucesivos en xilol, e infiltraremos en baños sucesivos en parafina caliente. Al final dejamos enfriar.

CONFECCIÓN DE BLOQUES: Utilizaremos en mismo medio de infiltración que hemos usado en la inclusión. En este caso parafina.

CORTE: Lo realizaremos con el microtomo tipo Minot. Haremos dos cortes seriados para posteriores controles. Después del corte no introduciremos los cortes en el baño de agua caliente porque sino se disuelve el glucógeno, por lo que los estiraremos sobre el portaobjetos con unas gotas de alcohol.

TINCIÓN: Para teñir el glucógeno podemos utilizar la técnica del Carmín de Best o la técnica del PAS. En este caso nos centraremos en el PAS.

Comenzaremos la desparafinación en la estufa (37° toda la noche o 60° durante 10 minutos) y la finalizaremos con 3 baños sucesivos en xilol. Es necesario colodionar los portas antes de rehidratar, excepto en la preparación control que la teñiremos de forma habitual sin colodionar, y añadiéndole el Pas-diastasa para eliminar el glucógeno. De esta manera lo que salga teñido solo en la problema será el glucógeno, y lo que salga en las dos serán los falsos positivos.

MONTAJE: Se realiza de la forma habitual.

2. DESCARTAR UNA INFECCIÓN BACTERIANA

RECEPCIÓN: En fresco o en formol. Si viene ya fijada en formol, hay que comprobar que lo han hecho adecuadamente y con volumen 1/20.

FIJACIÓN: Hay que hacer una fijación histológica por métodos químicos como es el formol porque lo que nos interesa es estudiar la morfología celular. El lavado postfijación se hará con agua destilada.

DECALCIFICACIÓN: Se realizará si lo requiere el informe y si no se sospecha ninguna enfermedad metabólica ósea.

INCLUSIÓN: Deshidrataremos con alcoholes en graduación creciente, aclararemos con baños sucesivos en xilol e infiltraremos con parafina caliente. Luego se deja enfriar.

CONFECCIÓN DE BLOQUES: Se realiza en la estación de parafina.

CORTE: Con el microtomo tipo Minot. Realizaremos un corte que será la preparación problema. Luego

cogeremos del archivo una muestra en la que sepamos seguro que se encuentra la bacteria que busco y haré un corte que será la preparación control.

TINCIÓN: Utilizaremos la técnica de Gram.

Es probable que nos aparezcan falsos negativos, por lo que, teñimos la preparación problema y la control a la vez. Si en la control me sale positivo me fiare del resultado de la problema.

MONTAJE: Se realiza de forma habitual.

3. ESTUDIO PROTEICO

RECEPCIÓN: En fresco o en formol.

Si viene fijada comprobaremos que en volumen sea el correcto (1/20).

EXAMEN MACROSCÓPICO: Se hace en la sala de estudio macroscópico y la hace el patólogo.

FIJACIÓN: La realizamos por métodos químicos usando formol. No importa que las proteínas se desnaturalicen ya que posteriormente este problema se solucionara con el desbloqueo que provocan los alcoholes, en la etapa de la inclusión.

Hacer un lavado posfijación.

DECALCIFICACIÓN: Lo haremos en el caso de sospecha de presencia de calcio y cuando no haya sospecha de enfermedad metabólica ósea.

Luego haremos un lavado postdecalcificación.

INCLUSIÓN: tres etapas:

- Deshidratación: alcoholes de graduación creciente (las proteínas se desbloquearan)
- Aclaramiento: con xilol
- Impregnación: con parafina y se deja enfriar.

CONFECCION DE BLOQUES: Usamos el mismo medio de inclusión que el usado en la etapa anterior. Se hace en la estación de parafina.

CORTE: Uso de microtomo tipo minot. Dos cortes seriados.

TINCIÓN: Primero desparafinamos en la estufa a 37°C toda la noche o a 60°C 10 minutos. Luego continuamos la desparafinacion con xilol e hidratamos con alcoholes en graduación decreciente.

Luego una digestión enzimática, de este modo la enzima baja la estructura de modo que será más accesible para la coloración.

Posteriormente, tratamos la muestra con etanol al 70%, para desbloquear las proteínas.

Incubación a 37° con la solución de ninhidrina, entre 6-24 horas.

Lavamos en agua corriente.

Teñimos los grupos carboxilo con el reactivo de Schiff.

El contrastado con la hematoxilina es opcional

Lavamos con agua corriente, deshidratamos, aclaramos y montamos.

Problemas en la tinción :

- Falsos positivos, por grupos carbonilo no correspondientes a las proteínas, haremos controles negativos saltandonos la primera etapa y el resto de la tinción la teñimos junto al corte problema. Lo que nos salga teñido en la problema y no en la controles serán las proteínas.

MONTAJE: De la forma habitual.

4. UN ANÁLISIS DE LAS GRASAS

RECEPCIÓN: Puede llegar en fresco o fijada en formol. Si viene fijada en formol comprobaremos el volumen 1/20.

FIJACIÓN: Puede hacerse por métodos químicos como el formol, o por métodos físicos como la congelación.

DECALCIFICACIÓN: Se realizará si el órgano presenta calcificaciones o si el informe lo requiere. Nunca la haremos si se sospecha una enfermedad metabólica osea.

INCLUSIÓN: Si hemos congelado en la fijación, no incluiremos porque ya tenemos la dureza y homogeneidad necesarias. Si hemos fijado en formol, la inclusión se hará con reactivos bajos en alcohol ya que este disuelve las grasas.

El medio de infiltración será en gelatina o polietilenglicol.

CONFECCIÓN DE BLOQUES: Si hemos congelado ya tendremos un bloque. Sino se realiza con el mismo medio utilizado en la inclusión. En este caso gelatina o polietilenglicol.

CORTE: Si el tejido está congelado se hace con el criotomo o criostato. Y si el tejido está incluido en gelatina se cortará con el microtomo de deslizamiento.

TINCIÓN: Para teñir grasa utilizamos la técnicas de los Sudanes.

Los colorantes siempre van en disolución alcohólica de muy baja concentración o bien en una mezcla de alcohol/agua.

Como son coloraciones progresivas se controlará mucho el tiempo.(a más tiempo de exposición mayor tiempo es la intensidad de coloración).

Dado que el principal problema de esta técnica es la evaporación de parte del disolvente, lo cual provoca la precipitación del colorante; se tendrán en cuenta estos pasos para intentar evitar dichos falsos positivos:

- Filtraremos antes de teñir.
- Almacenaremos el reactivo en un lugar fresco y este deberá estar cerrado herméticamente (ya que el colorante precipita rápidamente).
- Teñiremos los cortes flotantes antes de pescarlos del agua (así no se evapora el colorante).
- No prolongaremos la tinción más de diez minutos porque pueden formarse precipitados.

- Agitaremos con cierta frecuencia durante la coloración, para que si ha precipitado algo de colorante este se vuelva a disolver.

MONTAJE: De la misma forma que siempre.

5. ESTUDIO PARA DETERMINAR LA CANTIDAD DE ADN

RECEPCIÓN: en fresco, ya que se va a hacer una fijación diferente a la rutinaria.

FIJACIÓN: La haremos por métodos físicos (congelación) ya que queremos hacer un estudio sobre la composición biomolecular, concretamente la cantidad de ADN presente en la muestra.

DECALCIFICACIÓN: En el caso en el que se nos indicara en la hoja de petición que hay un exceso de sales de calcio y no se sospeche de enfermedad metabólica ósea.

INCLUSIÓN: No haría falta hacerla ya que el tejido está congelado, ya tenemos la dureza y homogeneidad que se busca en esta etapa.

CONFECCIÓN DE BLOQUES: Tampoco es necesario hacerlo, por la misma explicación que en la inclusión, el tejido esta congelado.

CORTE : Se realiza con el criotomo o criostato (se harán dos cortes: un corte problema y uno control negativo)

TINCIÓN : Se realiza con la técnica de Feulgen, la cual tiñe el ADN y no el ARN (por la disposición de carboxilos). En esta técnica lo que se hace es primero una hidrólisis ácida con HCL en la que se modifica la estructura del ADN del tal forma que se consigue que aparezcan los grupos carboxilos para poder ser teñidos. Luego se usa el reactivo de Schiff, el cual marca los grupos carboxilo. Indirectamente, localizamos el ADN.

Cuidados :

- Nos pueden salir falsos positivos, ya que el reactivo de Schiff puede teñir otros O2 no correspondientes a los del ADN. Haremos un control negativo, no haciendo la primera etapa (en el corte control), si el ADN no tiene grupos carboxilos que se puedan teñir, cuando hagamos la reacción con el reactivo de Schiff (haremos a la vez el corte problema con el control). Todo lo que nos salga en el corte control serán los falsos positivos.
- Tendremos que tener cuidado en no pasarnos con la hidrólisis (control del tiempo), para que no haya falsos negativos.
- Si hay sospecha de que hayan podido salir falsos negativos haremos controles positivos, usando muestras del archivo donde sepamos con seguridad que hay ADN.
- Cuidado con el envejecimiento del reactivo de Schiff, hay que renovarlo con frecuencia.