

## Tema 5: Fijadores (Procesado de Tejidos)

- Introducción:

Una vez que una pieza histológica ha llegado al servicio de Anatomía Patológica comienza su estudio microscópico de biopsias y piezas quirúrgicas, comprende un conjunto de métodos estructurados que configuran un sistema de actuación constante para cada muestra de forma que los resultados puedan ser reproducidos por diferentes patólogos.

Aunque el técnico en anatomía patológica no esta obligado a participar en el examen microscópico, es conveniente conocer algunos aspectos del proceso, previamente a éste estudio microscópico el técnico ha realizado las siguientes tareas que son: comprobar el volante, poner el número de entrada y registrar la muestra.

Los objetivos del examen microscópico son:

- Describir exactamente el tipo de material remitido para el estudio, por eso la pieza se pesa, mide, describe lesiones que contiene, morfología, aspecto, coloración y en casos de piezas quirúrgicas, sus relaciones con estructuras vecinas.
- seleccionar las áreas donde se hará el estudio microscópico, a esto se le llama tallado o muestreo del material y lo hace generalmente el patólogo ayudado por el técnico.

Todo esto se graba, nosotros pondremos el numero de orden en el cassette tantas como indique el patólogo. El patólogo cortara los trocos necesarios y los meterá en su cassette correspondiente, El resto de la pieza se guarda en el bote de procedencias, si es un aparato, con el fijador correspondiente. Se guarda hasta que quede emitido el informe o los protocolos del hospital. Si piden fotos se hacen. Los trozos tallados deben tener como mucho 0.5 cm. de lado.

Se limpia y se pasa a una pieza.

El tallado se realiza al principio o al final de la mañana.

- Funcionamientos del proceso de fijación tisular.

En anatomía patológica el primero objetivo consiste en observar la estructura tisular. Lo más parecido posible a como nos lo encontramos en el organismo, pero al no poder estudiarla dentro de este organismo sino separarla de él. El órgano de estudio ha comenzado ya su proceso de descomposición por lo que para un mejor estudio de este órgano ha de ser fijado después de su extirpación con el fin de que se conserve lo mas veraz posible de esta manera se observarán tanto el buen funcionamiento y estructura del órgano como la patología de esta.

Los fijadores además de conservar intacta la estructura durante un espacio de tiempo más o menos largo, paralizan todos los procesos orgánicos.

La fijación ideal se realiza entre 0°C y 4°C porque aunque el frío retarda la acción del fijador al contraer la pieza, también paraliza la autolisis del tejido que será mas o menos rápida dependiendo por ejemplo los tejidos ricos en enzimas digestivas como el páncreas o aquellos que tienen gran cantidad de gérmenes sufran la autolisis con mayor intensidad.

- Principios generales de la fijación.

Los principios generales:

- No existe un método universal de fijación, por lo que un agente fijador para un tejido no tiene porque ser adecuado para otro.
- No todos los fijadores conservan indefinidamente el tejido, porque fijación no equivale a conservación tisular.
- Un defecto en la fijación nunca puede ser corregido.
- Es inútil realizar un estudio histológico sobre un material con grandes defectos de fijación.
- Clases de fijadores según su mecanismo de acción
- **Físicos:**
- Congelación: Se utiliza como método para la fijación el enfriamiento por congelación del tejido es el método de elección para realizar estudios morfológicos o funcionales en los que se requiere conservar intacta la estructura antigénica del tejido o su contenido enzimático. La clave para una correcta fijación por congelación del tejido es que su realización sea instantánea porque un enfriamiento lento provoca la formación de microcristales titulares de hielo que pueden agregarse con el paso del tiempo produciendo roturas titulares que dificulten el diagnóstico—

El procedimiento idóneo para fijar tejidos por congelación consiste en utilizar ISOPENTANO a menos de  $-50^{\circ}\text{C}$  como agente de congelación y realizar una fragmentación suficiente de la muestra que se vaya a congelar.

Normalmente se preparan bloques de no más de 3 cm. cuadrados de superficie y 3 mm de espesor de modo que el proceso de congelación instantánea no requiera más de 10 segundos. El mantenimiento continuo de isopentano debe realizarse en un congelador programado a  $-70^{\circ}\text{C}$  para que quede compensado la subida inmediata de la temperatura que se produce al extraer el líquido del congelador.

Al enfriar tanto no actúan bacterias ni enzimas y el tejido se endurece para cortar estos tejidos utilizamos el microtomo de congelación o un aparato mas evolucionado o criostato el cual tiene como ventajas que la temperatura se mantiene mas baja y se pueden realizar cortes mas finos entre 2 y 15 micras.

- Criodeseccación o filiación: Consiste en someter al tejido a dos procesos el primero es la fijación instantánea por congelación en Nitrógeno líquido y el segundo desecación por sublimación directa del agua confiada a vapor en una bomba de vacío es un proceso complicado y costoso pero tiene una ventaja muy importante y es que al eliminar totalmente el agua tisular, paraliza la autólisis y produce una conservación indefinida, además evita que se produzcan enlaces químicos entre el tejido y el fijador, conservando así la estructura antigénica tisular.
- Criosustitución: es la sustitución lenta y progresiva del agua congelada de un tejido por un líquido fijador que en ocasiones puede actuar simultáneamente como medio de inclusión. Tras la congelación instantánea del tejido con nitrógeno líquido o isopentano a  $-50^{\circ}\text{C}$  se coloca el tejido congelado en el medio de sustitución, este medio está formado por una mezcla de alcohol etílico, acetona y propilén- glicol. Enfriado a  $-40^{\circ}\text{C}$ , el intercambio del agua tisular por el líquido de sustitución, se realiza dentro de un congelador y debe procurarse que la temperatura no disminuya del punto de congelación del líquido de sustitución.
- **Químicos:**
- Características fundamentales de un líquido fijador: Los fijadores por métodos químicos son normalmente químicos y deben poseer unas características que son las siguientes:
- Deben tener la capacidad de bloquear de inmediato la autólisis, paralizando la actividad enzimática del tejido.
- Poseer un efecto microbicida, que impide la acción bacteriana responsable de la putrefacción.
- Son capaz de no provocar sobre el tejido retracciones o distorsiones que generen anomalías en su estructura.
- Sea capaz de inducir cambios en la textura y composición tisular que favorezcan la inclusión, el corte y la coloración del material histológico (favorecer la coloración posterior es decir tienen carácter mordiente)

De todas estas características la más importante es la capacidad de bloquear la autólisis de inmediato y se va a relacionar con dos cualidades del agente fijador:

- Velocidad de penetración: y se refiere a la rapidez con lo que un fijador se difunde en el interior de un tejido de manera que el tamaño de una pieza que se pretende fijar ha de ser proporcional a la velocidad de penetración del agente fijador que se va a utilizar.
- La velocidad de fijación: se refiere al tiempo que cada fijador tarda en estabilizar los componentes químicos de los tejidos. La velocidad de fijación de un agente químico no siempre es proporcional a su velocidad de penetración.
- Reglas generales en el empleo del líquido fijador:
- Para evitar la autólisis, las piezas deben tallarse lo antes posible y no deben ser muy gruesas ya que en este caso el fijador tardaría mucho en penetrar en el centro de la pieza por lo que es preferible que al tallarlo se hagan cortes con un grosor máximo de 5 mm. ó 0.5cm.

Si se va a fijar un órgano en bloque para preservar la arquitectura del órgano se deben realizar incisiones, cortes, sobre su superficie y apertura de sus cavidades internas con el fin de que el líquido fijador alcance lo más rápidamente posible el interior del tejido. Para conseguir una buena fijación de órganos huecos éstos deben ser rellenados con líquido fijador y atados en sus extremos.

- El volumen del fijador respecto al de la pieza, es un punto muy importante para la fijación, lo ideal es 1–20 como mínimo.
- En la fijación con líquido que pierden eficacia al utilizarlos hay que ser mucho más cuidadoso. Este es el caso del Formol que debe ser renovado cada cierto tiempo en una misma fijación, ya que pierde eficacia también hay que ser precavidos en el resto de los fijadores porque generalmente todos los fijadores son volátiles, por lo que nunca será empleado el mismo fijador mas de una vez.
- Para lograr una fijación correcta el líquido tendrá que estar en contacto con todas las paredes del tejido, es por eso que no es conveniente meter en un mismo frasco varias piezas porque podrían pagarse unas a otras y evitar la penetración del fijador.

Si en una misma biopsia se presentan varios fragmentos nunca deben pegarse al ser sumergidos ni deben fijarse diferentes órganos en un mismo recipiente

- Los tejidos que flotan como por ejemplo grasa o tejido pulmonar no deben quedarse en la superficie por lo que deben envolverse en papel de filtro o gasa pesen vallan hacia el fondo y así estén rodeados del fijador.
- Cada fijador tiene un tiempo de fijación que va a depender de su capacidad de penetración y del tipo de tejido. Si este tiempo de fijación se prolonga se produce en endurecimientos en distintas estructuras del tejido. Solo se permitirá la permanencia de un tejido: en un fijador, si además al tener esta propiedad es un líquido conservante porque sino se corre el peligro de que bacterias aerobias descompongan el tejido.
- Durante la fijación se producen accidentes que modifican el estado de la pieza, los más importantes son la Hinchazón y la retracción de los tejidos así como la alteración en el color. Si por ejemplo: el ácido acético produce hinchazón debido a que deshace los enlaces formando moléculas de agua que son absorbidas por la pieza. Otros como el ácido crómico, alcohol y acetona, realizan el efecto contrario porque el fijador absorbe el agua del tejido por eso es importante que la presión osmótica del líquido fijador sea equivalente a la del tejido y que la de su pH se aproxime al pH fisiológico salvo que nos interese que su composición sea ácida. Este último caso nos interesa para descalcificar.
- Cada fijador tiene características negativas y positivas por tanto ninguno es el mejor y para cada tipo de tejido será conveniente usar uno u otro. Los fijadores puros no suelen usarse porque serán buenos fijadores de algunas estructuras pero estropearán otras. Por ello lo que más se usan serán las mezclas de varios fijadores que permiten un campo de trabajo más amplio.
- Líquidos fijadores simples: Dependiendo del mecanismo de actuación sobre los tejidos podemos clasificar los líquidos fijos simples en 4 apartados:
- *Fijadores por deshidratación tisular:* Alcohol etílico y acetona. Son sustancias altamente higroscópicas es

decir absorben agua actúan eliminando tanto el agua libre como el agua ligada a las proteínas de forma que estas ultimas precipitan y disminuyen su solubilidad. Este cambio proteico es conocido con el nombre de desnaturalización y provoca importantes alteraciones en la organización y estructura celular y tisular, por tanto estos agentes fijadores inducen grandes cambios en la morfología orgánica sobre todo si se emplean como agentes fijadores aislados. Alguno de ellos como por ejemplo la acetona, altera poco la estructura antigénica tisular y ello se debe a que estos fenomenitos inducidos son reversibles en parte tras la rehidratación. El fundamente molecular de la acción deshidratante de los alcoholes y la acetona, está en la competición que establecen con las proteínas por las moléculas de agua cuando se encuentra en soluciones concentrada, los principales agentes fijadores por deshidratación son alcoholes metílico y etílico, acetona y cloroformo.

Los únicos que se utilizan como fijadores simples son el alcohol etílico y la acetona.

El alcohol metílico se emplea exclusivamente para la fijación de extensiones hematológicas.

**Alcohol etílico:** líquido claro, transparente o incoloro, volátil, inflamable y de olor agradable. En el comercio se puede encontrar puro en cuyo caso tiene fuertes gravámenes tributarios para evitar su utilización clandestina para evitar la fabricación de bebidas alcohólicas, o bien lo tenemos desnaturalizado diluido al 90 o 70 %. Como fijador único utilizaremos alcohol a unas concentraciones entre el 70 y 90% y se obtiene cogiendo de 70–90 ml de alcohol puro y se lleva hasta 100 con agua destilada. La fijación mas potente va a corresponder a las soluciones más concentradas pero a altas concentraciones la capa externa del tejido se endurece en exceso, lo que impide la penetración del fijador a la parte interna de la pieza.

El tiempo de fijación correspondiente a una pieza de 5mm de espesor es dos a cuatro horas renovando unas 3 veces el líquido.

Es un fijador que preserva el glucógeno y la actividad de ciertas enzimas titulares, fija los pigmentos y se emplea en las extensiones citológicas. Como altera escasamente la estructura antigénica de los tejidos es un buen agente fijador para inmunohistoquímica. Entre las ventajas del alcohol están:

- Fijan y deshidratan al mismo tiempo
- Posee una gran velocidad de penetración
- Precipita muy rápidamente las proteínas y el glucógeno lo que unido a la anterior propiedad aporta extraordinariamente el tiempo de fijación es un notable agente bactericida y por tanto un buen conservante.

Entre sus inconvenientes tenemos los siguientes:

- Fijan y deshidratan al mismo tiempo: es incompatible con muchos fijadores:  $KCr_2$  o el  $OsO_3$  lo que limita su participación en muchas mezclas fijadoras.
- No fija adecuadamente la cromatina porque disuelve los ácidos nucleicos y además disuelve parcialmente los lípidos.
- Endurece y contrae excesivamente los tejidos.
- A medida que realiza la fijación se va diluyendo al incorporar el agua que extrae de los tejidos por lo cual pierde actividad progresivamente
- Prepara mas la tinción porque carece de efecto mordiente
- Puede dar origen a fenómenos de desplazamiento de sustancias.

**Acetona:** es un líquido transparente, inflamable, muy volátil y de olor dulzor. Des hidrata rápidamente y considerable el tejido por lo que es poco utilizable. El tiempo de fijación nunca excederá de dos horas y en piezas delgadas son recomendables 20 minutos. Su uso como fijador está prácticamente limitado a los métodos hitoquímicos e inmunohistoquímicos porque conserva muy bien la estructura antigénica y la actividad enzimática, a veces también se utiliza en microscopia electrónica para la fijación del material que se

va a incluir en resinas acrílicas. Se emplea generalmente sin diluir a 4°C, entre sus inconvenientes mas notables provocan una gran contracción tisular y por tanto grandes artefactos que suelen hacer inútil su empleo en el microscopio óptico convencional otro de sus inconvenientes es que debido a su rapidez de acción y a su capacidad de endurecimiento es imprescindible controlar el tiempo de fijación.

- *Fijadores que actúan por cambios en el estado coloidal de las proteínas:* Las proteínas son moléculas anfóteras (pueden comportarse como ácidos o bases, según el pH) cuyo punto isoeléctrico se encuentra entorno a un pH de 5.8. en este punto la estabilidad de las moléculas es mínima y su disociación máxima. Ésta escasa estabilidad molecular se debe a que las proteínas en este punto se desprende del agua líquida o endógena. Por este motivo las proteínas precipitan en presencia de determinadas ácidos que disminuyen el pH de la disolución hasta alcanzar el punto isoeléctrico.

Todos los fijadores de este grupo son de carácter ácido y se emplean formando parte de mezclas fijadores. Poseen además una gran velocidad d penetración en los tejidos y algún poder de descalcificación.

**Ácido acético:** Líquido transparente y fuerte olor avinagrado. Sus vapores son muy inflamables en estado puro se denomina: ác. Acético glacial. Cuando la temperatura ambiente disminuye o aumenta, disminuye por debajo de los 10°C tiende a solidificarse en forma de agujas cristalizadas muy cáusticas. Se utiliza diluido en concentraciones entre el 1 y 5 % formando parte de mezclas fijadores o de soluciones decalcificantes. Entre las ventajas que tiene es el fijador ideal para núcleo proteínas y ácido nucleicos y otra es precipitar proteínas sin sustraer el agua de los tejidos porque no es giroscópico y produce cierto edema intersticial que compensa la excesiva refracción pausado por otros agentes fijadores. Entre los inconvenientes es mal fijador de citoplasma y membranas celular y destruye mitocondrias.

**Ácido tricloroacético:** Son cristales incoloros cáusticos, solubles en agua en solución al 5 % fija los nervios de 8 a 20 horas. Nunca se lavan el tejido después de usar éste ácido porque el edema que produce es excesivo y de lugar a muchos artefactos. Al 2.5 % se usa mezclado con otras sustancias.

**Ácido sulfosalicílico:** Se usa al 5% es buen fijador porque permite casi todas las coloraciones endurece óptimamente los tejidos pero no los contrae después hay que lavar el tejido con agua pero la fijación debe hacerse en la oscuridad de 6 a 24 horas.

**Ácido crómico:** Se emplea en disoluciones al 2% formando parte de mezclas fijadoras, se utiliza bastante en microscopia electrónica entre las ventajas que tiene:

–Excelente fijador estructural y actúa como mordiente en tinciones que emplean colorantes básicos, entre los colorantes que tiene es que incompatible con fijadores habituales como el formol y alcohol.

–Escasa velocidad de penetración en trozos pequeños tarde varios días en penetrar en la pieza

–Impregna de coloración verdosa los tejidos por lo que hay que lavarlos abundantemente en agua destilada tras el uso de ese ácido, los tejidos quedan excesivamente blandos.

- *Fijadores por formación de sales con los tejidos:* En estos casos el fijador es un catión metálico fundamentalmente cromo o mercurio o un derivado orgánico como el ácido pícrico que son susceptibles de formar con los tejidos sales denominados protenatos metálicos o picratos por lo general todos los agentes d este grupo poseen gran velocidad de penetración y fijación porque la formación de la sel, se produce instantáneamente.

Se origina un efecto barrera al actuar los proteinatos formados superficie como dos mecanismos obstaculizando penetración fijador además se produce sobre el tejido precipitación metálica lo que provoca un notable endurecimiento que obliga a emplearlo en mezclas fijadoras que amortigüen este efecto.

**Cloruro de mercurio o sublimado:** es un polvo cristalino blanco y venenoso y hay que usarlo bajo campana se usa en soluciones del 5–6%. El efecto fijador se consigue por la combinación de los iones de Mercurio con los grupos ácidos de las proteínas especialmente con los de carácter carboxílico, hidroxílico, sulfidrilo y con los residuos fosfóricos de las nucleoproteínas.

Ventajas: entre sus ventajas tenemos que es un excelente fijador de los caracteres morfológicos celulares por lo que es el de elección para patologías hematopoyéticas y renales, donde el diagnóstico se apoya normalmente en la observación de finos detalles nucleares y citoplasmáticos.

Es un excelente mordiente por lo que produce intensa y brillante coloración nuclear y citoplasmática.

Inconvenientes: No es un buen bactericida por lo que no es un buen líquido conservante tiene escasa capacidad de penetración por lo que requiere fraccionamiento cuidadoso del tejido. Otro de los inconvenientes es que si se prolonga demasiado tiempo de actuación contrae y endurece los tejidos hasta dificultar el corte en el microtomo, por eso nunca deben sobrepasarse las 4 horas de fijación. Tras haber cumplido esta y común paso previo a la inclusión, los tejidos pueden conservarse indefinidamente en alcohol etílico al 70%. Otro de los inconvenientes es que de origen a precipitados metálicos de color pardo sobre los tejidos lo cual dificulta su observación al microscopio estos precipitados pueden eliminarse mediante tratamiento del tejido previo a la coloración con soluciones alcohólicas yodales semejantes al LUGOL yodadas.

**Dicromato Potásico:** es un polvo amarillento que reacciona con las proteínas para formar cromatos, se utiliza en disolución acuosa al 1–2%, fija las proteínas por lo que las mitocondrias quedan perfectamente conservadas y da un aspecto homogéneo al núcleo después de la fijación del dicromato deben lavarse abundantemente con agua.

Ventajas: es que tiene un fuerte efecto mordiente excelente fijador para lapidar complejos para mielina, mitocondrias y aparato de Golgi que los contienen en abundancia. Su utilización es indispensable para técnicas de impregnación argéntica de las células del sistema nervioso central.

Inconvenientes: el primero de ellos es incompatible con alcohol y formol, posee baja velocidad de penetración y endurece escasamente los tejidos lo que puede dificultar el corte en el microtomo. Otro: provoca artefactos titulares como la aparición de vacuolas citoplasmáticas, retracciones y cambios en la morfología nuclear. Otro: disuelve la cromatina por lo que es necesario en estos casos asociarlo con ácido acético dentro de mezclas fijadoras.

Los tejidos han de ser lavados después de fijados en una solución salina o tamponada para evitar el depósito de pigmento verde que puede producirse en el curso de la inclusión o coloración posterior.

**Ácido Pírico:** En el comercio se encuentra en forma de agujas cristalizadas de color amarillo muy tóxicas de carácter explosivo.

Actúa coagulando las proteínas a través de la formación de picratos que las confieren gran aptitud por colorantes ácidos. Se utiliza en solución saturada al 2%, es un excelente fijador estructural que conserva adecuadamente la composición proteica de los tejidos. Controlando adecuadamente el tiempo de fijación produce una óptima contracción de los tejidos que favorece su procesamiento histológico.

Aunque tiene penetración algo lenta posee buena velocidad de fijación no disuelve el glicógeno ni los lípidos es el fijador de elección para estas sustancias.

Posee una leve acción decalcificante por lo cual puede emplearse como fijador para las muestras de tejido óseo.

Se maneja fácilmente en soluciones debido a la gran estabilidad que tiene.

Inconvenientes: en estado puro el ácido pícrico es explosivo si se somete a calor hay que mantenerlo alejado de fuentes de calor, tampoco deben dejarse evaporar sus disoluciones para evitar la formación de precipitados. Si se prolonga el efecto de fijación que es de 4–18 horas dependiendo de tamaño pieza aparecen inconvenientes por una excesiva retracción tisular. Sobre todo si la pieza ha sido inadecuadamente lavada en agua y luego deshidratada.

Tiñe los tejidos de color amarillo y si no se elimina completamente antes de la inclusión en parafina provoca un continuo deterioro de la estructura tisular que pueda hacer imposible su estudio histopatológico algunas semanas después del procesamiento.

La eliminación se realiza mediante lavados sucesivos en alcohol etílico al 70–80% o en una solución saturada de  $\text{LiCO}_4$  en alcohol de 70 es incompatible en la inclusión en celoidina.

**Acetato de uranilo:** Es una sal soluble en agua, cristalizado de color amarillo, se descompone con la luz, no endurece los tejidos, se usa en soluciones al 2–3% normalmente mezclado con  $\text{OsO}_3$  y después de la fijación hay que lavar el tejido abundantemente con agua.

- *Fijadores que actúan por reticularización de las proteínas:* El proceso que denominamos reticularización de las proteínas sobreviene cuando la desnaturalización de éstas moléculas se produce no por precipitación, sino porque el agente que provoca el fenómeno induce la rotura masiva de los puentes de Hidrógeno determinantes de la estructura helicoidal de las moléculas proteicas, con la formación posterior de una malla reticular polipeptídica por asociación química entre los grupos activos desmascarados por el líquido fijador.

Entre los principales fijadores tenemos:

**Formaldehído o formol:** Es gaseoso en estado puro, se vuelve líquido a  $21^\circ\text{C}$ , es tóxico y con un olor característico. Se disuelve fácilmente en agua y en éste estado en concentraciones entre 35–40% y estabilizado con metanol se denomina formalina pura o formol con la acción del frío la formalina pura tiende a precipitar y esta situación suele ser reversible añadiendo unas gotas de  $\text{NaOH}$  y concentrando la mezcla. Como agente fijador el formaldehído se emplea a una concentración del 4% pero como se parte de una solución de formalina ésta concentración se obtiene diluyendo una parte de ésta de la formalina en 9 de agua en formación salina o tampón.

Ventajas: Es el fijador mas barato que existe por lo tanto es de elección para los trabajos de rutina en Anatomía patológica.

- ◊ Es un buen fijador único que determina una moderada conversión de la estructura tisular.
- ◊ Por ser buen desinfectante y no endurecer excesivamente los tejidos, es un medio óptimo para conservar y almacenar biopsias y piezas quirúrgicas.
- ◊ Provoca escasa retracción tisular
- ◊ Posee una velocidad de penetración intermedia entre la de los alcoholes y la del sublimado
- ◊ Tiene aproximadamente una velocidad de un milímetro por hora apenas altera la coloración tisular, por eso es el agente de elección para fijar grandes piezas quirúrgicas.
- ◊ Es excelente fijador para el tejido adiposo y para lípidos en general y se emplea como agente de elección para fijar el tejido nervioso y en general antes de cualquier impregnación argéntica.

- ◇ El proceso de fijación puede ser acelerado o retrasado sin graves inconvenientes modificando la temperatura, así a temperatura ambiente se consigue un fijador completa a partir de las 36 horas. A 35° entre 12 y 24 horas y a 55°C en solo 3 horas. Por este motivo la formalina es un fijador de elección cuando se emplean hornos de microondas en técnicas de histotecnología.
- ◇ Es compatible con la mayor parte de las tinciones que se utilizan rutinariamente en Anatomía patológica.

Inconvenientes: Produce abundantes vapores de carácter irritante sobre la conjuntiva y mucosa nasal.

- ◇ Por acción de la luz y del oxígeno atmosférico se transforma progresivamente en ácido fórmico y ésta sustancia tiene la propiedad de disolver rápidamente la cromatina nuclear por eso con el paso de l tiempo los núcleos celulares adoptan un aspecto fantasma para evitar este inconveniente el formol debe guardarse en frascos opacos o emplearse en forma de solución neutra o tamponado.
- ◇ Se incorpora progresivamente al tejido con lo cual se consumen durante el proceso de fijación por lo que debe encontrarse en exceso
- ◇ Es debido a que se incorpora al tejido y que tiene baja presión osmótica provoca la incorporación de agua a los espacios intratisulares por lo que el peso y el volumen del tejido una vez fijado se aumenta de manera notable. Este efecto se puede prevenir utilizando formol salino o tamponado.
- ◇ Posee una relativa capacidad de fijación sobre las proteínas, los pigmentos que contienen hierro y los derivados de la bilirrubina, a éstos últimos les da una coloración verdosa.
- ◇ Tras la utilización prolongada de formalina debido a que se convierte en ácido fórmico confiere a las piezas un tinte grisáceo y en tejidos que tienen mucha sangre da origen a un pigmento formólico que es negro o pardo oscuro que precipita en aglomeraciones irregulares sobre estructuras preexistentes. Este pigmento se puede eliminar sumergiendo los cortes en alcohol absoluto saturado con ácido pícrico compuesta por 10, 12 gramos de pícrico en alcohol etílico al 95–100% durante 5 minutos. O bien podemos sumergirlo en alcohol amoniacal que es el de 1 a 5 partes de hidróxido amónico en 95 a 99 de alcohol etílico al 70%. En este caso se tratan los cortes durante 15 minutos, seguidos de dos baños de agua destilada y después otro de alcohol al 70% de 5 minutos de duración cada uno.

- *Soluciones fijadoras simples que contienen formol:* hay 4 tipos:

**Formol salino:** Se utiliza para prevenir el efecto osmótico que provoca el empleo de disoluciones de formaldehído en agua destilada y se prepara disolviendo 9 gramos de cloruro sódico en 1000 mililitros de formalina al 10%.

**Formalina neutra:** Se prepara añadiendo a la solución de formalina al 10% una pequeña cantidad de carbonato cálcico insoluble que queda depositado en el fondo del recipiente neutraliza esta sal el exceso de ácido fórmico que se produce y aunque puede utilizarse todavía para la formación de tejidos en la práctica ha sido desplazada por las soluciones tamponadas.

**Formol tamponado:** Es la solución mas empleada hoy en día para prevenir el choque osmótico que provoca la disolución de formalina en agua destilada y el depósito de pigmento formólico que ocurre a un pH inferior a 6. Se preparada la siguiente manera, como amortiguador se emplea el tampón fosfato calibrado con pH de 7.0 a 7.2 de la siguiente fórmula:

- ◇ FORMALINA PURA..100.0 ml.



- ◇ FOSFATO SÓDICO MONOBÁSICO.4.0 gr.
- ◇ FOSFATO SÓDICO DIBÁSICO (ANHIDRO\*\*)...6.5 gr.
- ◇ AGUA DESTILADA....900.0 gr.
- ◇

Se emplea fundamentalmente para fijar tejidos nerviosos en la preparación de algunas técnicas de impregnación argéntica. Y se prepara añadiendo una parte de ácido acético glacial a 9 partes de formalina al 10% con ello se consigue un pH en torno a 2.

\* 4gr: no tiene agua, cogemos 3.5gramos si no pone nada en el bote cogemos 4 gramos.

\*\* Anhidro: hay que hidratarlo después.

**Formol cálcico o solución de Baker:** Se emplea como fijador de elección en algunas técnicas de histoenzimología y se prepara añadiendo cloruro cálcico al 1% a una solución de formalina neutra o tamponada al 10%

- *Mezclas fijadoras:* 2 tipos:

**Glutaraldehído:** líquido oleoso en comercios se encuentra en disolución al 25%. Mecanismo de actuación es el mismo que el formaldehído y como fijador se emplea en concentraciones entre el 1 y el 3%.

Ventajas: Es el primer fijador de elección para microscopía electrónica porque tienen una excepcional capacidad para preservar la morfología celular.

- ◇ Se emplea para fijación de animales por perfusión en patología experimental.

Inconvenientes: Tiene velocidad de penetración muy baja por lo que los fragmentos de tejido no pueden tener volumen superior a unos pocos milímetros cúbicos.

- ◇ Posee gran capacidad de retracción y endurecimiento tisular que impide prolongar el tiempo de fijación por encima de las 3 horas.
- ◇ Tiene osmolaridad muy baja por lo que hay que emplearlo disuelta en soluciones amortiguadoras.

**Tetraóxido de Osmio: OsO<sub>4</sub>:** En el comercio se encuentra en forma de cristales amarillentos solubles en agua, muy volátiles y tóxicas. Actúa igual que el formol y se prepara como agente fijador al 1% en tampón fosfato.

Ventajas: Es el mejor fijador estructural conocido, por eso se utiliza en microscopía electrónica específicamente como 2º fijador.

Inconvenientes: Muy caro y descompone en presea de luz por lo que hay que conservarlo en recipientes opacos y oscuridad.

- ◇ Aunque sea soluble en agua es difícil preparar disoluciones acuosas con las que se trabaja
- ◇ Muy tóxico y en estado cristalino emite vapores que irritan la córnea mucosa respiratoria. Su manipulación es obligatoria en una campana de extracción de gases para prevenir la aparición de queratitis.
- ◇ Posee muy baja capacidad de penetración tisular por lo que las muestras deben tener muy poco volumen.
- ◇ Es incompatible con formol y dificulta la coloración nuclear, esto obliga a lavar

abundantemente los tejidos tras utilizarlo.

- ◊ Es que inactiva por completo las enzimas y altera notablemente la composición antigénica del tejido.

La combinación de diversos fijadores simples formando soluciones, complejas llamadas mezclas fijadoras pretende sumar las ventajas de cada una de ellas amortiguando sus inconvenientes. Desde un punto de vista general se clasifican en dos grupos:

- Aquellas que contienen formol:
- **Líquido de Bouin:** Solución muy usada como alternativo a la formalina cuando queremos fijar ciertos Tejidos como piel órganos endocrinos, testículos y tejido embrionario en general. Sin embargo no está fijado para la fijación de biopsias renales sobre los cuales provoca una severa distorsión.

Se prepara de la siguiente manera:

– SOLUCIÓN ACUOSA DE ÁC. PÍCRICO

(ÁC. PÍCRICO AL 1–2% EN AGUA DESTILADA)..750.0 ml.

- FORMALINA CONCENTRADA 250.0 ml.
- ÁC. ACÉTICO GLACIAL. 50.0 ml.
- PH. FINAL 2.2
- TIEMPO DE FIJACIÓN.. 2 a 24 horas
- **Fijador de Bouin–Hollander:** es una variante del líquido de Bouin especialmente indicado para la fijación de los cilindros de biopsia de médula ósea cuando no es posible controlar el tiempo de fijación de la muestra en éste líquido, la conservación, puede incluso conservar las 48 horas sin que se produzca excesivo endurecimiento.

Se prepara de la siguiente manera:

- ◊ ACETATO NEUTRO DE COBRE. 2.5 gr.
- ◊ ÁC. PÍCRICO.. 4.0 gr.
- ◊ FORMALINA CONCENTRADA.... 10.0 ml.
- ◊ ÁC. ACÉTICO GLACIAL.. 1.5 ml.
- ◊ AGUA DESTILADA.. 100.0 ml.

Para preparar la solución se disuelve primero la sal de cobre en el agua destilada luego se añade el ácido pícrico y tras filtrarlos el formol y el ácido acético glacial.

Esta solución se conserva indefinidamente a temperatura ambiente el tiempo de fijación oscila entre 48–72 horas y sigue las mismas precauciones que el líquido de Bouin

- **Bouin alcohólico (fijador de Dubosq–Brasil):** Es una alternativa de líquido de Bouin cuando la pieza que se debe fijar es relativamente voluminosa porque posee una velocidad de penetración mucho mas elevada. Se utiliza también cuando se precisa una fijación específica de sustancias hidrosolubles como el glucógeno ya que evita su disolución.

Se prepara de la siguiente manera:

◇ ALCOHOL ETILICO

80%.....75.0 ml.

◇ ÁC. PÍCRICO 0.5 gr.

◇ FORMALINA CONCENTRADA.....30.0 ml.

◇ ÁC. ACÉTICO GLACIAL...7.5 ml.

Mezclar antes de usar el tiempo medio de fijación para fragmentos con un espesor en torno a 5 milímetros es de 2 a 3 horas.

· **Líquido de Gendre:** Es una variación que está especialmente diseñada para la fijación del glucógeno y pigmentos derivados de la hemoglobina. Se prepara por:

◇ SOLUCIÓN SATURADA DE ÁC. PÍCRICO  
EN ALCOHOL ETÍLICO AL 70%.....80.0 ml.

◇ FORMALINA CONCENTRADA...15.0 ml.

◇ ÁC. ACÉTICO GLACIAL.7.5 ml.

El tiempo de fijación oscila entre 1 y 4 horas. Tras acabar el proceso debe realizarse sucesivamente 2 lavados cortos en etanol al 80, 95 y 100°

· **Fijador de Müller:** Es la disolución acuosa de un fijador simple de dicromato potásico con la adición de sulfato sódico su importancia actual radica en que se emplea para fabricar los fijadores de Orth y de Zenker. Lo que llamamos solución madre. Está compuesta de:

◇ DICROMATO POTÁSICO 2.5gr.

◇ SULFATO SÓDICO..1.0 gr.

◇ AGUA DESTILADA 100.0 ml.

Tiempo de fijación 4 y 8 horas. Tras la fijación es necesario lavar abundantemente en agua corriente durante unas horas.

· **Fijador de Orth:** Hoy día se emplea exclusivamente en ciertas técnicas de fijación de tejido nervioso. Se prepara de la siguiente manera:

◇ Solución stock de Orth: idéntica a la composición del fijador de Müller.

◇ Solución de trabajo: en el momento de su uso se mezclan:

◇ SOLUCIÓN STOCK..90.0 ml.

◇ FORMALINA CONCENTRADA.10.0 ml.

El tiempo de fijación de tejido nervioso es de 48 horas y tras el proceso de fijación los tejidos han de ser lavados abundantemente en agua y almacenados en alcohol etílico al 70%

· **Solución de B-5 y Zenker-Formol (Líquido de Nelly):** Ambas mezclas son en esencia casi idénticas. La denominación B5 corresponde en realidad a una modificación de la de Zenker.

La solución de Zenker-formol contiene dicromato potásico y sulfato sódico. La mayor utilidad de estos fijadores es que mejoran considerablemente la tinción nuclear, de hecho la fijación en una mezcla que contenga sublimado es hoy día prácticamente imprescindible para el diagnóstico morfológico en las patologías del sistema linfático y hematopoyético. Es debido a la gran importancia que se da a la observación de finos detalles nucleares como es la presencia o no de hendiduras o repliegues nucleares y del nucleolo para

catalogar un tumor maligno de ganglios linfáticos, o de médula ósea (leucemias) como de alto o bajo grado de malignidad y por tanto recomendar la terapéutica más oportuna. Además estas soluciones B5 zenker formol son los fijadores de elección para el riñón, hígado, fibras de tejido conectivo y para fibrina.

Se prefiere la solución de B5 porque al no contener dicromato, esto permite una mejor conservación de la cromatina nuclear y de la estructura antigénica tisular.

· Solución de 35:

*\*Solución stock de B5:* Esta mezcla es estable durante bastante tiempo pero concentrado en frasco opaco y oscuridad.

◇ CLORURO MERCÚRICO... 12.0 gr.

◇ ACETATO SÓDICO....2.5 gr.

◇ AGUA DESTILADA C.S.P.200 ml.

*\*Solución de trabajo de B5:* Esta solución es inestable debido a que el formaldehído reduce el sublimado a cloruro mercurioso y mercurio metálico que se depositan en forma de un precipitado blanco grisáceo, por este motivo y por el elevado índice de endurecimiento que posee el sublimado, el tiempo de fijación no debe superar las 4 horas. Además el espesor máximo de las muestras no debe superar los 4 mm debido al escaso poder de penetración de la mezcla fijadora. Debido a la aparición de precipitados mercúricos sobre los tejidos las secciones histológicas antes de ser coloreados. Han de ser sometidas a un tratamiento específico mediante soluciones que eliminan estos depósitos. Tras la fijación los tejidos se pueden conservar indefinidamente en alcohol etílico al 70–80%

– SOLUCIÓN STOCK DE B520.0 ml.

– FORMALINA CONCENTRADA .2.0 ml.

· Solución de Zenker–Formol Eliminación del pigmento mercúrico:

*\*Solución stock de Zenker:*

– CLORURO MERCÚRICO5gr.

– DICROMATO POTÁSICO...2.5 gr.

– SULFATO SÓDICO 1 gr.

– AGUA DESTILADA C.S.P. ....100.0 ml.

*\* Solución de trabajo: en el momento de su uso mezclamos:*

– SOLUCIÓN STOCK DE ZENKER..95 ml.

– FORMALINA CONCENTRADA...5 ml.

Tanto para la solución almacenada como para la de trabajo deben guardarse las mismas precauciones que para la de B5

· Eliminación del pigmento mercurico o deszenkerización:

Se realiza tratando las secciones histológicas antes de su coloración con soluciones yodadas y utilizamos:

*\*Solución de LUGOL:*

- YODURO POTÁSICO..2gr.
- CRISTALES DE YODO ..1gr.
- ALCOHOL ETÍLICO 70–80%.....100 ml.

*\*Solución de tiosulfato sódico:*

- TIOSULFATO SÓDICO..5gr.
- AGUA DESTILADA...100ml.

Después de la desparafinación hay que tratar los cortes durante diez minutos con la solución yodada a continuación lavar bien en agua destilada después decolorar durante dos minutos en la solución en agua corriente durante 10 minutos antes de realizar la coloración.

- Aquellas que no contienen formol:
- **Líquido de Zenker:** Trata de combinar los efectos favorables del sublimado y del dicromato potásico. En la práctica habitual ha sido sustituido por B5. Su empleo ha quedado prácticamente restringido al proceso de refinación–decalcificación a que son sometidas las biopsias de médula ósea cuando se realiza una fijación inicial con B5. Se prepara de la siguiente manera.
  - SOLUCIÓN STOCK DE ZENKER95.0 ml.
  - ÁC. ACÉTICO GLACIAL.. 5.0 ml.

El ácido acético reacciona con el dicromato y hace que la solución se oscurezca progresivamente, por lo que debe recomponerse antes de su uso.

El tiempo de fijación puede ser mas prolongada que con la solución de b5 porque el ácido acético que contiene, produce un excesivo endurecimiento. Pero no se deben sobrepasar las 48 horas. Tras la fijación el material debe ser tratado con sulfato sódico al 5% durante 1–2 horas.

- **Líquido de Carnoy:** Es el mejor fijador conocido para el glucógeno y en general, para los hidratos de carbono simples y para proteínas fibrilares y sobre todo miofibrillas, su acción fijadora es extremadamente rápida deshidratando el tejido al mismo tiempo, sin embargo produce una excesiva retracción mística y una hemólisis masiva de eritrocitos así como una pobre conservación estructural del

ADN. Está compuesta por:

- ETANOL ABOSLUTO..60.0 ml.
- CLOROFORMO.30.0 ml.
- ÁC. ACÉTICO GLACIAL..10.0 ml.

El tiempo de fijación puede ser acortado hasta 3 horas. Las muestras deben cambiarse directamente a alcohol etílico absoluto. El mayor endurecimiento se produce al prolongar demasiado la deshidratación en alcohol, para prevenirlo se puede sustituir el etanol por metanol en la composición de líquido fijador, que además provoca menor retracción tisular, y para conservar la pieza se deposita en alcohol etílico absoluto.

- Lavado postfijación.

Es el aclarado que se realiza después del proceso de fijación para eliminar los residuos del agente fijador, con el fin de limitar el tiempo de contacto entre el fijador y el tejido o impedir el contacto del fijador con los medios de inclusión utilizados, para proseguir el tratamiento de la muestra, a veces algunos colorantes alteran su efecto si la pieza contiene restos de determinados fijadores, como es el caso por ejemplo del ácido pícrico. No todos los fijadores deben lavarse igual:

- Las piezas fijadoras en formalina se lavan con agua prolongadamente.
- Fijadas por ácido pícrico hay que introducir las piezas hasta quitar color amarillo.
- Fijadas por tricloroacético hay que introducirlas en alcohol de 90%.

- Conservación de tejidos.

Cuando se practica un estudio histológico, solo se incluyen una pequeña porción del material remitido para el análisis. El resto se guarda de reserva para estudios complementarios. Casi nunca es posible conservar el tejido en el mismo líquido utilizado para la fijación.

La solución conservante más indicada en la mayor parte de los casos es el alcohol etílico al 70% en él además de iniciarse la deshidratación, el tejido una vez fijado puede conservarse durante meses sin apenas sufrir cambios, como alternativa mas simple y siempre que no se desee preservar el tejido para posteriores estudios inmunohistoquímicos, pueden usarse como conservante una solución de formalina neutra o tamponada al 10%.

Cuando lo que se produce exclusivamente es derramar la intrusión del tejido en parafina sobre todo para pequeñas muestras delicadas se puede realizar la deshidratación completa en alcoholes crecientes y conservarlos en butanol que permite una conservación indefinida y mejora la textura tisular.

Cuando se deseen conservar órganos completos procedentes de

necropsias podemos utilizar las soluciones de JORES.

#### **JORES I:**

- SULFATO SÓDICO.22 gr.
- SULFATO POTÁSICO..1 gr.
- CLORURO SÓDICO..9 gr.
- BICARBONATO SÓDICO..18 gr.
- FORMOL  
10% .....  
ml.
- SOLUCION ACUOSA SATURADA DE  
HIDRATO DE CLORAL.50 ml.
- AGUA DESTILADA C.S.P.1000 ml.

#### **JORES II:**

- ACETATO POTÁSICO300 gr.
- GLICERINA.600 ml.
- AGUA DESTILADA C.S.P. ..1000 ml.

En recipiente bien cerrado se conserva hasta años.

- Resultados de la fijación y su interpretación.

Durante la fijación se producen procesos que modifican la estructura tisular; se producen desgarros en tejidos que siendo de distinta estructura están en contacto, por ejemplo la muscular y la submucosa y al exponerlos a cambios bruscos, como tienen distintos contenidos, en agua se contraen más que otros. También se producen grietas por la misma causa que los desgarros, pero son pequeñas aberturas que pueden dar lugar a error porque parecen naturales, son muy difíciles de evitar y son más frecuentes cuando la fijación se hace en tejidos que ya han comenzado su descomposición.

Estas deformaciones de los tejidos que no corresponden con la realidad y son producidas por la agresividad de los fijadores se denominan artefactos y varían de un fijador a otro debido a las características propias de cada uno.

Ejercicios:

- La hematoxilina de Harnix se prepara con dos partes: A: 1 gr. De hematoxilina en polvo mas 10 cc. De etanol. B. 20 gr. De alumbre de aluminio potásico mas 200 gr. De H<sub>2</sub>O. Disolver en caliente. Técnica: A+B ebullición y añadir 0.5 gr. De óxido mercúrico.
- Vamos a preparar eosina alcohólica, está formado por una solución stock y una de trabajo.

La de stock esta formada por 1 gr. de eosina, 20 cc. de agua y enrasado hasta 100 ml de alcohol de 95%. La solución de trabajo esta formada por 25 cc. de solución de stock y 75 cc. de alcohol de 80 %. Calcular para 250 ml de solución de trabajo.