

PROCESAMIENTO GENERAL DE UN TEJIDO

COLORACIÓN: HEMATOXILINA–EOSINA

Introducción:

En el diagnóstico histológico las piezas a estudiar deben sufrir un cierto número de manipulaciones:

- *Producto patológico:* El anatómopatólogo elige el fragmento de la pieza más adecuado para el examen y diagnóstico.
- *Fijación:* El líquido fijador confiere a la muestra una consistencia suficiente e inmoviliza las estructuras celulares y tisulares en un estado lo más próximo posible a su estado vivo.
- *Confección de los cortes:* Para que el micrótomopueda preparar cortes muy finos es necesario que se aumente consistentemente la pieza. Mediante la inclusión (en nuestro caso en parafina) se llega a este propósito.
- *Coloración:* Los colorantes son múltiples y variados. Nosotros utilizaremos la hematoxilina–eosina.
- *Conservación:* En este paso se monta la muestra utilizando un porta, un cubre, y un medio de montaje.

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA PATOLÓGICA

La extracción constituye la primera etapa de todo estudio histológico e histopatológico. Es en esta ocasión cuando el anatómopatólogo se pone en contacto con la pieza. De su impresión macroscópica y de los informes clínicos que le son proporcionados dependerá el sitio y el número de extracciones.

La extracción de las muestras debe observar las reglas siguientes:

- Instalarse cómodamente bajo una buena luz, sobre una amplia plancha de corcho colocado dentro de un recipiente estanco donde se puedan escurrir y recoger los líquidos fijadores o los productos patológicos.

Protegerse con guantes, delantal de materia plástica y lentes protectoras contra salpicaduras. Deberá contar además con la colaboración de un técnico de laboratorio.

- Tener muy cerca:

Una entrada de agua corriente provista de ducha, diversos fijadores, una balanza de lectura directa, una regla dividida en mm, transparente y de materia plástica, un hilo resistente destinado a medir circunferencias y curvaturas, un tapón de corcho grueso, tipo desagüe, pinzas sin dientes (preferiblemente largas y suaves) para coger fácilmente y sin destrozar los pequeños fragmentos del fondo de un frasco de cuello estrecho, una sonda, unas tijeras de ramas largas y extremos puntiagudos, bisturís, cuchillos preferiblemente de hojas largas, anchas y planas, de acero inoxidable.

- Empezar las extracciones por las biopsias y los pequeños

fragmentos que son urgentes y que peligran ulteriormente de ser descuidados o confundidos. Continuar con las piezas operatorias y las extracciones más voluminosas.

- Dar un dictamen macroscópico que se redactará mientras se efectúa la observación, que quedará guardado en cassettes debidamente etiquetados.
- Efectuar la extracción tomando un fragmento de la lesión, y si es posible del tejido vecino macroscópicamente sano.

La orientación de los cortes variará con cada finalidad. La forma de la pieza importa poco.

La extracción se efectuará además de lo más delicadamente posible, evitando magullar los tejidos bajo el esfuerzo de una pinza demasiado apretada, de un bisturí o de un cuchillo mal afilado.

Observaciones

En nuestro caso, tallamos los siguientes tejidos: ovario, tiroides y vesícula. Introducimos pequeñas piezas en los cassettes y los etiquetamos con el número del grupo y el tipo de pieza.

FIJACIÓN

La finalidad de la fijación es inmovilizar las estructuras tisulares. Consiste en sumergir la pieza en el líquido fijador escogido (en nuestro caso hemos utilizado el formol).

Un buen fijador debe penetrar rápida y homogéneamente, no producir retracciones en los tejidos, en pocas palabras no crear artefactos y asegurar a los tejidos (y sus células) una conservación e imagen fiel.

AUTOTHECNICON

Nosotros en el laboratorio sólo utilizamos el programa B (a partir de la cubeta número 5). Pero el programa completo consta de los siguientes pasos:

- 1ª Cubeta: Formol 1 hora
- 2ª Cubeta: Formol 1 hora
- 3ª Cubeta: Formol 1 hora
- 4ª Cubeta: Formol 1 hora
- 5ª Cubeta: Alcohol 70° 1 hora
- 6ª Cubeta: Alcohol 96° 1 hora
- 7ª Cubeta: alcohol 100° 1 hora
- 8ª Cubeta: alcohol 100° 1 hora
- 9ª Cubeta: Xilol 2 horas
- 10ª Cubeta: Xilol 2 horas
- 11ª Cubeta: Parafina 1 2horas

12ª Cubeta: Parafina 2 El resto del tiempo

Observaciones

Una vez a la semana control de la temperatura de la parafina.

La parafina se cambia todos los días y la 2 pasa a ser la 1.

El alcohol 70° se cambia todos los días.

INCLUSIÓN

Este proceso proporciona a la pieza dureza y homogeneidad suficiente para obtener secciones finas.

Estación histológica

Esta máquina consta de las siguientes partes:

Unidad térmica; compuesta de dos cámaras térmicas. Una para precalentamiento y otra como baño.

Unidad dispensadora; área de trabajo con sección térmica para la orientación de los tejidos.

Unidad criogénica; amplía área refrigerante a -5°C .

CORTE

En este paso obtenemos secciones de tamaño micrométrico para su observación al microscopio.

Utilizamos un micrótopo tipo Minot (aunque existen distintos tipos de micrótopos).

Se realiza el retallado de la pieza, que consiste en eliminar la parafina alrededor de la muestra.

El ángulo de orientación de la cuchilla debe estar en torno a los 10° .

Ya en el micrótopo se efectúa el debastado (20–25 ð), que elimina las capas de parafina situadas sobre el tejido.

El espesor de los cortes suele tener entre 3–5 ð.

Una vez obtenido el corte se coloca en el porta humedecido en etanol al 70% y se deposita en un baño con agua destilada (evita burbujas) a una temperatura de entre $40\text{--}44^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se pesca del baño con un porta y se efectúa la coloración.

Observaciones

En nuestro caso, además de cortar los bloques de ovario, tiroides y vesícula, también cortamos hígado y lipoma.

COLORACIÓN

Tinción de hematoxilina–eosina

La hematoxilina es un colorante natural sin capacidad tintorial, por lo que hay que oxidarla.

El proceso de oxidación de la hematoxilina se conoce como maduración de la hematoxilina. La hemateína no posee fijación por los tejidos por lo que hay que añadir un mordiente que actúe como vinculante entre el tejido y el colorante, acrecentando la unión entre ambos. El mordiente más utilizado es el alumbre potásico $\text{K}(\text{SO}_4)_2$ y también se utiliza el sulfato de aluminio potásico. La unión de hemateína más mordiente se llama hemalum o hemalumbre.

La hematoxilina es un colorante básico que va a teñir estructuras ácidas y basófilas (núcleos celulares).

Existen distintas lacas alumínicas de hematoxilina:

- Hematoxilina de Harris: Muy utilizada por su estabilidad (se conserva entre 6–12 meses) y por su fácil manejo.

Es una coloración regresiva, se elimina el exceso de colorante con alcohol. Como agente oxidante se utiliza el óxido de mercurio.

Tiñe los núcleos de color azulado.

- Hematoxilina de Mayer: Es un tipo de coloración progresiva (no requiere lavado posterior). Se usa el yodato de sodio como agente oxidante.

Tiñe los núcleos de azul suave.

- Hematoxilina ácida de Erlich.

- Hemalumbre de Delafield: Utilizada en técnicas histoquímicas e inmunológicas.

Para nuestra coloración seguimos los siguientes pasos:

- Preparación de la hematoxilina.

Hematoxilina– 1 g

Alumbre potásico– 20 g

Oxido de mercurio– 0,5 g

Alcohol 100°– 10 cc

Agua destilada– 200 cc

1º Disolver la hematoxilina en alcohol en un vaso de precipitados.

2º Calentar el agua destilada en un matraz o vaso de precipitados y antes de hervir retirar el matraz y añadir el alumbre potásico.

3º Añadir la hematoxilina disuelta en alcohol y poner otra vez al fuego hasta la ebullición.

4º Sacar del hornillo y echar el óxido de mercurio.

5° Filtrar y ponerla en un bote y etiquetar.

– Preparación de la eosina

Se prepara eosina al 1% en agua destilada en un vaso de precipitados. Añadimos una gota de ácido acético glacial, por cada 100 cc de disolución (a nosotras nos tocó hacer 200 cc). Se usa para reforzar la tonalidad rosa del tejido a colorear. Se pone en una estufa a unos 60° durante 30 minutos. Después se retira, se echa en un bote y se etiqueta.

– Preparación del alcohol ácido

Cogemos una probeta de 250 ml, le echamos menos de 200 ml de alcohol de 70°, y vertemos dos gotas de HCl, lo depositamos en un frasco de reactivos convenientemente etiquetado.

– Técnica de tinción

- Desparafinar con xilol 5 minutos, xilol 5 minutos.
- Hidrata con alcohol 100° y alcohol 96° , 2 minutos cada baño.
- Meter en agua destilada.
- Hematoxilina durante 5 minutos.
- Agua destilada, lavamos hasta que quede claro.
- Alcohol ácido (HCL al 1% más alcohol de 70°), 2 o 3 inmersiones. El alcohol ácido actúa como diferenciador (elimina el exceso de colorante).
- Agua destilada que frena la acción del diferenciador.
- Eosina durante un minuto.
- Agua destilada.
- Deshidratamos en dos baños de alcohol, uno de 96° durante 10 minutos y el otro de 100° con la misma duración que el anterior.
- Aclaración en dos baños de xilol de 10 minutos cada uno.

– Resultados de la tinción

Núcleos de azul.

Citoplasmas y fibra colágenas de rojo o rosa.

Eritrocitos de rojo brillante.

MONTAJE

Tiene como fin facilitar el examen microscópico y conservar las preparaciones. Montar una preparación consiste en impregnarla de una sustancia transparente y cubrirla con un cubre.

Un buen medio de montaje debe ser:

- Rápido
- Capaz de conservar duraderamente la preparación
- Químicamente neutro
- Transparente

– No alterarse con el tiempo

Los medios de montaje pueden ser no miscibles en agua, estos son muy utilizados por su fácil manejo y conservación ilimitada. Al no ser miscibles en agua es necesario deshidratar las preparaciones (alcoholes de graduaciones crecientes) y llevarlas a un disolvente del medio de montaje (por ejemplo xilol).

Si los medios de montaje son miscibles en agua, sus propiedades conservadoras son limitadas, se usan para montar cortes por congelación, o bien preparaciones que contengan sustancias o colorantes solubles en alcohol.

PROCESAMIENTO

GENERAL

DE UN

TEJIDO

COLORACIÓN: HEMATOXILINA–EOSINA