

1.- Tipos de Microtomos y Componentes

El microtomo es un instrumento mecánico de precisión con el que se realizan cortes de tejido de grosor micrométrico para su estudio al microscopio. Todos los microtomos siguen el mismo principio básico de funcionamiento: una muestra de tejido incluido en un medio de homogenización (generalmente parafina) avanza, gracias a un mecanismo regulable de cremallera, sobre una cuchilla de forma periódica.

Los componentes de un microtomo son:

- .- Portabloques: es una pinza donde se coloca el material tisular incluido en un medio de homogenización (normalmente parafina).
- .- Portacuchillas: es una pinza orientable en el espacio donde se fija la cuchilla, la pinza permite tanto variar el ángulo de inclinación de la cuchilla, como la aproximación al portabloques.
- .- Mecanismo de avance: puede ser mecánico o electrónico, y regula el grosor de los cortes.

1.1.- Tipos de Microtomos

a.- Microtomo de oscilación o balanceo.

Usado para tejido incluido en parafina, es bastante simple y sencillo de usar, permite buenos cortes pero ha sido sustituido por tecnologías más precisas y avanzadas. Casi no se utiliza actualmente.

b.- Microtomo de rotación o tipo Minot

El portabloques y la cuchilla están colocados en posición vertical. El corte se realiza sobre bloques de parafina gracias a un sistema de avance del portabloques sobre una cuchilla fija por un mecanismo regulable de cremallera. Existen dos tipos: manual y automático.

- .- Ventajas: Tiene una gran precisión que permite producir secciones seriadas muy finas.
- .- Inconvenientes: Elevado precio y no permite cortar tejidos incluidos en celoidina, gelatina y polietilenglicol.

c.- Microtomo de deslizamiento

El portabloques y la cuchilla están colocados en posición horizontal. Dependiendo del tipo de microtomo, el portabloques se desliza sobre unas guías metálicas hacia la cuchilla que está fija o viceversa.

.- Ventajas:

- . Debido a su diseño y construcción sencilla, apenas ocasiona averías.
- . Debido al gran tamaño de su cuchilla, pueden realizarse cortes en bloques de mayor tamaño.
- . Permite realizar cortes sobre tejido incluido en celoidina.

.- Inconvenientes:

- . El corte es un proceso lento debido a que no se pueden sacar cortes seriados.
- . La exposición de la cuchilla favorece los accidentes.
- . No se pueden sacar cortes de grosor inferior a 8 micras.

d.- Microtomo de congelación

Se utiliza para realizar secciones de tejido congelado y no deshidratado. Para la congelación del tejido se utiliza un gas, anhídrido carbónico (CO₂). Este tipo de micrótopo ha sido desplazado por el criostato, debido a los inconvenientes que presenta:

- .- Dependencia gas carbónico
- .- Espesor de los cortes
- .- Dificultad estiramiento cortes.

e.- Criostato o criotomo

De uso común en los servicios de anatomía patológica, consta de un micrótopo de rotación o tipo Minot metido dentro de una cámara de congelación (entre - 22 °C y - 27 °C). El brazo de rotación para controlar el corte se encuentra en el exterior; el portabloques, el portacuchillas y el mecanismo de avance se encuentran en el interior.

.- Ventajas:

- . Se pueden llegar a sacar cortes de 2 micras.
- . Permite el enfriamiento rápido de la muestra, por lo que se usa para biopsias intraoperatorias y estudios inmunohistoquímicos.

f.- Ultramicrotomo

Se utiliza principalmente para cortes en microscopía electrónica. Derivado del microtomo de rotación para parafina pero con numerosas mejoras técnicas que le permiten sacar cortes de hasta unos pocos nanómetros de grosor a partir del material incluido en plástico.

Partes de las que consta:

- Sistema de iluminación con luz incidente sobre la muestra.
- Avance térmico por dilatación de una varilla metálica.
- Ajuste digital del corte en nanomicras.
- Platina portacuchillas regulable y apta para cuchillas de vidrio o diamante.
- Sistema óptico con microscopio incorporado.
- Movimiento motorizado regulable del brazo.

g.- Vibratomo

Es un tipo de microtomo un poco especial, ya que no necesita que la muestra esté incluida en resina ni parafina. Todo el proceso de corte se realiza en una cubeta llena de solución salina o líquido tamponado.

.- Ventajas: destaca la rapidez del procesamiento, ya que trabajamos con muestras que sólo han sido fijadas (a veces son frescas también). Podemos observar estructuras que se estropearían al deshidratar el tejido y tenemos un menor riesgo de producir artefactos.

.- Desventajas: no corta bien tejidos demasiado blandos, elásticos o demasiado duros. Los cortes son bastante gruesos, por lo que pueden ser difíciles de observar al microscopio. Sin embargo, se usan cuando nos interesa ver la posición y distribución de las células (por ejemplo, en tejido nervioso).

2.- Preparación de Equipo. Orientación del Bloque y la Cuchilla

Antes de comenzar a trabajar con el microtomo se debe comprobar que todo esté correctamente:

- .- Hay que mirar que estén todos los componentes (portabloques, portacuchillas).
- .- Preparar todo el material complementario (cuchillas, portaobjetos, cestillos para ir dejando las muestras, etc.).
- .- Comprobar la iluminación.
- .- Comprobar que el micrótopo avanza suave, sin oposición.

Una vez comprobado que todo está correcto, hay que comprobar y orientar bien tanto el portabloques como el portacuchillas.

2.1.- Portabloques

Para poder orientar correctamente este elemento es necesaria la ayuda de un bloque de parafina. Una mala orientación del bloque puede provocar desde no conseguir sacar un corte real de la muestra hasta romper el bloque.

Procedimiento:

1. Se coloca el bloque en la pinza del portabloques.
2. Descendemos el brazo del portabloques hasta que la superficie del bloque entre en contacto con la cuchilla.
3. Comprobar el paralelismo entre el bloque y la cuchilla y corregir en caso necesario con las dos ruedas que existen en la rótula del portabloques (horizontal y vertical).

2.2.- Portacuchillas

Para hacer una correcta orientación, nos ayudamos igualmente de un bloque de parafina. La orientación de la cuchilla viene dada por la angulación de esta con respecto al bloque. Cada microtomo precisa de una angulación que debe proporcionar el fabricante, aunque por lo general, suele ser de 15°; también puede variar dependiendo del tipo de cuchilla que se use. Una incorrecta orientación puede provocar desde no conseguir cortar hasta romper el bloque y la muestra.

3.- Técnicas de Corte según el Microtomo y la Composición del Bloque

En función del tipo de material del que esté compuesto el bloque que se esté trabajando, se elegirá el microtomo adecuado a ese material.

3.1.- Bloques de parafina

Los cortes se realizan en microtomos de tipo Minot. Va a ser el trabajo de rutina en cualquier laboratorio de anatomía patológica.

La confección de los cortes en parafina consta de varios pasos:

1. **Retallado y enfriamiento del bloque**, consiste en eliminar el exceso de parafina existente en la periferia del bloque para disminuir la superficie total en contacto con la cuchilla. A continuación, enfriamos el bloque para conseguir una consistencia óptima de la parafina
2. **Fijación del bloque al portabloques**, soporte plástico adaptable a la pinza portabloques del microtomo.
3. **Orientación del bloque**
4. **Orientación de la cuchilla** (estos dos puntos tal y como se ha explicado anteriormente)
5. **Selección del espesor de los cortes.**
6. **Realización de las secciones** con un movimiento rítmico del volante para comenzar a subir y bajar el portabloques; de esta manera se obtiene una tira continua de cortes. Para evitar el fraccionamiento de la cinta de cortes, es conveniente sujetarla con la ayuda de la mano o de un pincel, coger la tira

provocando cierta tensión para mantenerla estirada.

7. **Estirado de los cortes y confección de las preparaciones**, para ello se posan sobre un baño de agua caliente (40-50 °C) y se procede a capturar los cortes elegidos con un portaobjetos.
8. **Secado de las preparaciones histológicas**, estufa 60º durante 10-20 minutos o 37º hasta el día siguiente.

3.2.- Bloques de celoidina

Los cortes se realizan en un microtomo de deslizamiento, preferentemente con cuchilla fija y portabloques deslizante. Las operaciones a realizar con bloques de celoidina son similares a los de parafina, aunque hay que hacer algunas consideraciones.

- .- Para poder obtener buenos cortes y evitar que estos se enrollen sobre sí mismos, hay que impregnar continuamente tanto la cuchilla como la superficie del bloque con etanol 70º.
- .- Estirar los cortes con etanol 70º sobre la propia cuchilla.
- .- Depositar los cortes sobre un baño de alcohol 70º.

3.3.- **Bloques de material congelado**

Se utiliza principalmente el criostato para realizar estas secciones. Prácticamente la totalidad de su uso queda destinado a intraoperatorias.

- .- El material sin fijar se congela junto con un medio sintético sobre una pletina metálica para evitar que el corte se enrolle. Este medio se denomina OCT (Óptimum cutting temperatura, corte a temperatura óptima). El OCT es soluble en agua y no es necesario eliminarlo para la tinción.
- .- El material y el medio sintético quedan con la misma consistencia y propiedades que el tejido congelado.
- .- Estas pletinas se ensamblan perfectamente en el portabloques del criostato.
- .- Colocar la pletina sobre el portabloques, orientar y desbastar el bloque igual que la parafina.
- .- Los criostatos suelen tener un sistema llamado “antirrol”, que consiste en una lámina de plástico o cristal que se apoya directamente sobre el filo de la cuchilla.
- .- Para coger los cortes hay que apoyar directamente el portaobjetos sobre el corte que está en la pletina del portacuchillas; por la diferencia de temperatura el tejido se queda pegado a este último.

4.- Problemas en la Sección de Especímenes y Resolución de los mismos.

Algunos de los casos más comunes son:

a.- Los cortes están muy arrugados. Causa y solución:

- Puede ser que el bloque no esté suficientemente frío, por lo que ponemos a enfriar el bloque unos minutos.
- La cuchilla ha perdido su filo, procedemos a sustituirla.
- La inclusión no se ha realizado correctamente. Si es una zona pequeña se continúa con el proceso. Si es una zona grande hay que invertir el proceso de inclusión y realizarlo de nuevo.

b.- Cortes con efecto persiana. Causa y solución:

- La angulación de la cuchilla es superior a 15°. Corregir y situarla entre 10-15.
- La cuchilla o el bloque no están bien sujetos por lo que se produce vibración. Reajustar las sujeciones o llamar al servicio técnico.

c.- No se llega a realizar el corte. Causa y solución:

- La angulación de la cuchilla es inferior a 10°. Corregir.

d.- Cortes con estrías verticales. Causa y solución:

- El material tiene calcificaciones. Si la calcificación es pequeña poner el bloque a enfriar sobre líquido decalcificador. Si la calcificación es grande invertir el proceso de inclusión y decalcificar.
- El material contiene grapas o hilo de sutura quirúrgico. Intentar extraer el objeto dañando lo menos posible el tejido. Si es de tamaño grande deshacer el bloque y eliminar.
- La cuchilla está dañada por cortes anteriores de material con calcificaciones o quirúrgico. Sustituir la cuchilla, o mover la vieja a una zona sin usar.

e.- Alternancia de un corte fino y un corte grueso o no corta uniformemente la superficie del bloque (pega saltos).

- El material es de consistencia muy firme o dura. Ralentizar la velocidad de corte.
- El mecanismo de avance no va suave. Lubricar el sistema de avanceo llamar al servicio técnico.

f.- No sale todo el tejido (agujeros en mitad del tejido).

- No está completamente desbastado el bloque. Desbastar un poco más.
- Parte del tejido es grasa. Realizar los cortes y que valore el Patólogo.
- No está bien realizada la inclusión. Continuar el proceso o invertir inclusión según sea la zona defectuosa pequeña o grande, respectivamente.

5.- Extensión y Montaje de la Muestra

5.1.- Maniobras de extensión de cortes

El baño de flotación es un depósito de agua caliente (entre 40 °C y 50 °C) donde se depositan los cortes de parafina una vez realizados.

Los cortes flotan en el baño. En este momento, con ayuda de un pincel o una aguja histológica, se pueden solventar y eliminar posibles arrugas de pequeño tamaño que hayan podido surgir a la hora de depositar el tejido sobre el agua.

Seleccionamos los cortes de mayor calidad, teniendo solo en cuenta el tejido y no la parafina de alrededor. Siempre se aconseja sacar varios cortes de más para poder seleccionar posteriormente los mejores.

Hay que tener precaución a la hora de manejar el baño de flotación. Al calentar el agua se producen burbujas de gas en el fondo del baño, en un golpe podrían desprenderse. Si existen cortes en la superficie del agua y alguna burbuja se queda atrapada debajo no se podrá eliminar sin dañar el tejido.

5.2.- Captura y secado de las preparaciones

Una vez elegidos los cortes para el estudio:

- a.- Introducimos verticalmente en el baño un portaobjetos debidamente identificado con el número de la muestra que se está seleccionando.
- b.- Con la ayuda del pincel, se orientan los cortes hacia el portaobjetos.
- c.- Extraer poco a poco el portaobjetos del agua, dejando drenar el agua por gravedad.
- d.- En caso de necesidad se puede volver a introducir el portaobjetos verticalmente en el agua para despegar el corte y volver a orientar.

Tras tomar la muestra, y antes de iniciar el corte de la siguiente muestra, hay que eliminar del baño cualquier vestigio de las muestras anteriores y evitar una contaminación accidental. Esto se puede hacer pasando una servilleta de papel o un papel de filtro sobre la superficie del agua.

Una vez obtenidos varios cortes se deben secar bien para evitar que se desprendan (estufa de calor seco a 60 °C durante 30 minutos o 37 °C de un día para otro).

5.3.- Soluciones adherentes para portaobjetos

Para conseguir mejorar la adherencia al portaobjetos cuando se va a someter a altas temperaturas se emplean las gelatinas y la polilisina. La gelatina se añade al baño de flotación (cantidad mínima).

La polilisina se coloca una gota en el portaobjetos y se frota con otro; se deja secar al

aire libre para su uso ulterior.

6.- Cumplimiento de las Normas de Seguridad

Se seguirán los principios de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (Ley 31/95 del 3 de diciembre de 2003), además del sentido común.

En el corte de muestras se manejan muestras biológicas y químicas, además de materiales punzantes y cortantes. Es importante tener muy en cuenta los peligros y no bajar la guardia para evitar accidentes.

Manejo del microtomo

Manejando el microtomo existe el riesgo de corte (por las afiladas cuchillas) y de aplastamiento (entre el portabloques y el portacuchillas). Normalmente los propios aparatos traen equipos de seguridad:

- .- El portacuchillas incorpora una pieza que tapa la cuchilla (salvadedos).
- .- En el caso del portabloques, los aparatos traen un freno para que el volante de inercia quede bloqueado cuando no se vaya a usar.

Baño de Flotación

El baño de flotación es un equipo eléctrico que contiene agua:

- .- Siempre debe manejarse con cuidado para que no se produzcan vertidos de agua que puedan entrar en el aparato.
- .- El aparato siempre debe estar enganchado a un enchufe con toma de tierra.
- .- Controlar bien la temperatura del agua para evitar el riesgo de quemadura (comprobar la temperatura del agua periódicamente).