

1. Fundamentos y proceso de inclusión de muestras para Microscopía Óptica y Electrónica.

Entendemos como inclusión el proceso por el cual eliminamos completamente el agua existente en los tejidos y la sustituimos por un material sólido que mantenga la estructura y la arquitectura entre los distintos elementos, impidiendo así su fragmentación durante el corte.

1.1.- Inclusión en microscopía óptica

a.- Deshidratación

El primer paso de la inclusión es la deshidratación, que puede realizarse mediante agentes químicos, reactivos deshidratantes o por procedimientos fisicoquímicos. Las principales características de los agentes deshidratantes son las siguientes:

- No deben alterar la estructura tisular
- Deben ser rápidos, no endurecer demasiado los tejidos
- Presentar mínima toxicidad o peligrosidad.

El más importante es el alcohol etílico, entre otros como el alcohol metílico y la acetona.

Los pasos que el proceso de deshidratación es una graduación ascendente de los alcoholes:

- **Graduación ascendente de los alcoholes** (50°, 70°, 96° y absoluto):
 - La acción brusca de un alcohol de alta graduación provoca una alta retracción del tejido,
 - El volumen del alcohol debe ser 10 veces superior al volumen de la muestra que se va a deshidratar.
 - Se recomiendan varios baños de alcohol para disminuir el riesgo de endurecimiento del tejido y para controlar el grado de saturación de agua en el alcohol.
 - La duración de la deshidratación está en función del tejido y su contenido en agua; un exceso de tiempo causa un endurecimiento excesivo del tejido.

b.- Aclaramiento (Desalcoholización)

El segundo paso es el aclaramiento. Consiste en sustituir el agente deshidratante por una sustancia miscible con el medio de inclusión. El agente aclarante adecuado deberá:

- Eliminar el agente deshidratante,
- Respetar las estructuras de los tejidos.
- Fácil eliminación del medio de inclusión
- Baja toxicidad y peligrosidad.

Manejo

Se recomiendan varios baños de agente aclarante para evitar que este pierda sus propiedades.

El principal agente aclarante es el xileno (dimetilbenceno), comercialmente conocido como xilol.

Ventajas:

- Rápido,
- Endurece poco los tejidos,
- Fácil eliminación del medio de inclusión,
- Fácil manejo.

Inconvenientes:

- Muy tóxico
- Tiende a volver blanquecino el tejido
- En tiempos prolongados endurece el tejido.

Comienzan a aparecer en el mercado productos comerciales que sustituyen al xilol; son una mezcla de hidrocarburos que se usan con los mismos procedimientos y características, pero minimizando su toxicidad en el uso.

c.- Infiltración o inclusión

El último proceso de la inclusión es la infiltración. Consiste en sustituir el agente aclarante por un medio sólido que proporcione la dureza y homogeneización suficientes al tejido para que del mismo se puedan obtener secciones finas y de calidad. Se recomiendan varios baños del agente infiltrante para su total penetración.

El medio más utilizado en la práctica diaria es la parafina, aunque existen otros.

- Parafinas: son hidrocarburos saturados de cadena larga (sustancias de tipo ceroso).

Comercialmente podemos encontrarlas con diferentes puntos de fusión (40 °C-70 °C). Dependiendo del uso que pretendamos darle, del tipo de tejido y del grosor de los cortes elegiremos uno u otro rango. La parafina de uso habitual se mueve en el rango de 54 °C a 58°C.

El proceso de inclusión puede hacerse tanto manual como automáticamente en aparatos específicos para tal uso. Los reactivos y número de baños dependerán del tamaño de las muestras que vayamos a incluir:

- Para piezas pequeñas: menor cantidad de baños en tiempos más cortos.
- Para piezas más grandes: mayor cantidad de baños y tiempos más prolongados para su correcto proceso.

Existen procesadores automáticos que, además de sumergir las muestras en los diferentes reactivos, utilizan la temperatura y la presión, aumentando la temperatura y la presión de

U.D. 2 REALIZACIÓN DE BLOQUES DE TEJIDOS

los reactivos conseguimos optimizar y acelerar el trabajo, penetrando mejor en los tejidos.

Para un trabajo de rutina con muestras de diferentes tamaños se emplean programas de tiempos medios en aparatos automáticos (los tiempos pueden variaren función del tipo de muestra y las necesidades del laboratorio).

1.2.- Microscopía electrónica

A grandes rasgos, los procesos de inclusión son idénticos a los descritos para la microscopia óptica. Debemos saber cuál es el producto final que queremos obtener para usar los reactivos, tiempos y metodología adecuados. Los cortes deben presentar unas características fundamentales:

- El corte debe ser extraordinariamente fino.
- Debe conservar la estructura celular que queramos observar.

Es necesario un medio de inclusión de elevada dureza para poder obtener secciones ultrafinas que permitan ser atravesadas por el haz de electrones y obtener la imagen de la muestra. El procedimiento lo podemos dividir en los siguientes puntos:

a.- Deshidratación:

- Etanol o acetona, aislados o combinados
- Debe ser completa ya que los medios de inclusión son hidrófobos.

b.- Líquidos intermediarios: a pesar que el alcohol y la acetona son miscibles con el medio de inclusión, estos líquidos facilitan la penetración del medio de infiltración, se utiliza el epoxipropano y óxido de propileno sobre todo cuando el medio de inclusión sea algún tipo de epoxiresina.

c.- Inclusión: tipo plástico como epoxirresinas y diferentes variedades, que suelen conservar muy bien las estructuras subcelulares. Las epoxirresinas que producen menor retracción tisular son El araldite, la resina Epon y la resina Spurr. Esta última es la más usada por su baja toxicidad.

d.- Confección de bloques: a diferencia que en microscopia óptica (moldes metálicos), en electrónica se usan moldes de silicona que son también seccionados o cápsulas de gelatina que se disuelven en agua a 70°.

2.- Preparación y confección de bloques. Orientación de la muestra.

Una vez finalizado el proceso de inclusión en las muestras que queremos estudiar, debemos proceder a la formación de bloques sólidos que puedan ser adaptados al microtomo. Estos deben tener:

- Una dureza homogénea.
- Plasticidad y elasticidad adecuadas para obtener cortes de calidad sin distorsión

U.D. 2 REALIZACIÓN DE BLOQUES DE TEJIDOS

de las estructuras que forman el tejido.

Para la realización de los bloques se utilizan las llamadas estaciones de inclusión o “parafineros”, que constan de:

- Dispensador de parafina líquida .
- Placa caliente , para mantener la muestra caliente hasta que realicemos el bloque o para orientar la pieza cuando estemos realizando el bloque.
- Placa fría, de temperatura entre 10 °C y 15 °C, de pequeño tamaño, para ayudarnos a orientar la pieza al hacer el bloque.
- Placa fría de mayor tamaño para ir dejando los bloques ya hechos.

La orientación de las muestras en los bloques es esencial para obtener un corte y posterior diagnóstico correctos. Tenemos que tener en cuenta que la base del molde es la zona donde se inicia el corte.

A la hora de hacer los bloques hemos de intentar siempre:

- Siempre se corta primero la zona más blanda del tejido
- Hemos de poner la muestra de forma que se corte y se vea la mayor cantidad posible de tejido.
- En mucosas y piel se tienen que ver todas las capas del tejido.
- En la mayoría de las ocasiones simplemente hemos de colocar la muestra de la misma manera que el patólogo lo hizo al tallar. Siempre que tengamos dudas hemos de preguntar al patólogo que lo talló, una vez cortado puede no tener solución un problema de orientación.

3.- Preparación, programación, limpieza y mantenimiento de los equipos y materiales

Tenemos que tener en cuenta que toda la maquinaria que utilizamos es muy delicada. Es muy importante llevar al día el mantenimiento y la limpieza para alargar lo más posible su vida útil y la aparición de averías.

3.1.- Procesador de tejidos

Siempre antes de usarlo tenemos que hacer diferentes comprobaciones:

- Limpieza propia del aparato.
- Cantidad y limpieza de los líquidos.
- Limpieza de la zona donde se depositen las muestras antes de su procesamiento.

Una vez finalizado el programa del procesador, después de sacar las muestras, hay que hacer hincapié en la total limpieza de la parafina. Esta limpieza suele realizarse con xilol, alcohol absoluto y agua, en este orden.

3.2.- Estaciones de inclusión

Antes de comenzar a usarlos, debemos comprobar que:

- La parafina del dispensador esté líquida con suficiente temperatura para su óptimo uso.
- Tener cantidad suficiente de parafina líquida para hacer todos los bloques.
- La placa caliente debe estar a la temperatura óptima.
- La placa fría debe estar fría (10-15 °C).

Se debe tener en cuenta la limpieza de las diferentes partes que forman el parafinero:

- Dispensador de parafina: si no está limpio puede obstruirse.
- Placa caliente: pueden producirse contaminaciones entre muestras; un exceso de parafina líquida en esta zona puede hacer que se filtre por partes internas del aparato y provocar averías.
- Placa fría: eliminar los restos de parafina sólida adherida ya que puede actuar como aislante térmico, no permitiendo la correcta solidificación de la parafina y la orientación puede no ser correcta.

Los servicios especializados han de revisar periódicamente el aparato.

4.-Otras técnicas de procesamiento y estudio histocitológico. análisis de imagen. Estereología. Microdissección láser

4.1.- Otras técnicas de procesamiento

a.- Inclusión en gelatina

- Se utiliza sobre todo para cortes macrométricos de órganos completos.
- Al ser soluble en agua no es necesario deshidratar y aclarar.
- Hay que eliminar completamente el fijador del tejido.

b.- Inclusión en celoidina

- Se emplea en trabajos neurohistológicos,
- Muestras duras, frágiles o de gran heterogeneidad (tejido óseo, globoocular).

Inconvenientes:

- No pueden obtenerse cortes menores de 10 micras de grosor.
- Procesamiento muy lento (días, incluso semanas).

c.- Inclusión en medios hidrosolubles

Se utiliza para demostrar elementos intratisulares que puedan desnaturalizarse por calor o por agentes deshidratantes como por ejemplo enzimas o lípidos. El más utilizado es el polietilenglicol y sus derivados.

e.- Inclusión en plástico (resinas)

U.D. 2 REALIZACIÓN DE BLOQUES DE TEJIDOS

Por ejemplo metilmetacrilato, glicolmetacrilato, butilmetacrilato, resinas hidrosolubles, etc. Se emplean para el estudio de tejido óseo sin decalcificar o materias de elevada dureza; conservan la estructura excepcionalmente.

4.2.- Análisis de imagen

Se ven en Técnicas generales de laboratorio, pero hay que tener en cuenta que hoy día es fundamental conocer los métodos de digitalización de imágenes y telepatología.

4.3.- Estereología

Se define como “la interpretación espacial de secciones”, teniendo en cuenta que los tejidos son tridimensionales. Normalmente en el microscopio se ven secciones bidimensionales del material, a partir de las cuales tenemos que extrapolar el aspecto tridimensional. La estereología nos da herramientas para hacerlo, por ejemplo con imágenes microscópicas en 3D.

4.4.- Microdissección láser

La microdissección por captura láser es una técnica práctica y fiable para conseguir separar grupos celulares específicos que nos interesan en una sección bidimensional de tejido de los que no nos interesan. Se emplea sobre todo para estudios moleculares.

Existen distintos sistemas disponibles en el mercado y debe hacerlo un patólogo bajo control microscópico.