

MÉTODOS DE ESTUDIO EN

HISTOLOGÍA



TINCIONES EN HISTOLOGÍA

HISTOTECNOLOGÍA

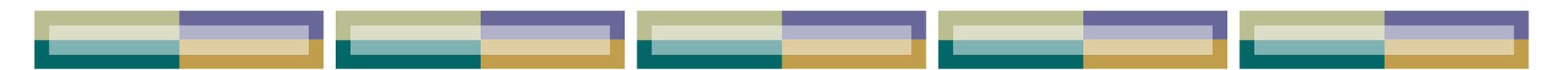
- Conjunto de técnicas que se llevan a cabo para la preservación y preparación de los tejidos y células, para su estudio con microscopio de luz y sus variantes





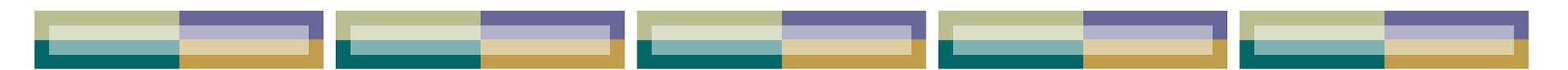
OBJETIVOS BÁSICOS DE LA HISTOTECNOLOGÍA

- 1. Preservación óptima y funcional de los diferentes materiales tisulares y celulares que llegan al laboratorio.
 - 2. Conocer los principios de las técnicas rutinarias y especiales, así como sus indicaciones precisas para el estudio de los tejidos
- 



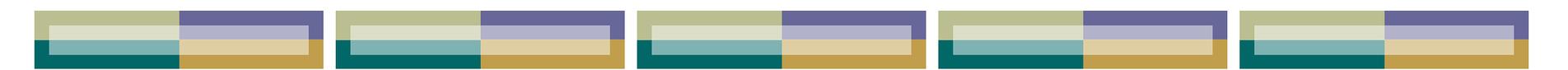
MATERIAL A ESTUDIAR

- BIOPSIAS
 - INCISIONAL
 - EXCISIONAL
 - NECROPSIA O AUTOPSIA
 - CITOLOGÍA EXFOLIATIVA
 - FROTIS E IMPRONTAS
- 



TÉCNICA HISTOLÓGICA

- Comprende la preparación de tejidos para su estudio microscópico
 - Se logra sometiéndolos a una serie de procesos:
 - Obtención del tejido a estudiar
 - Fijación
 - Deshidratación
 - Aclaramiento
 - Inclusión
 - Corte
 - Montaje
 - Observación (Diagnóstico)
- 



MATERIAL A ESTUDIAR

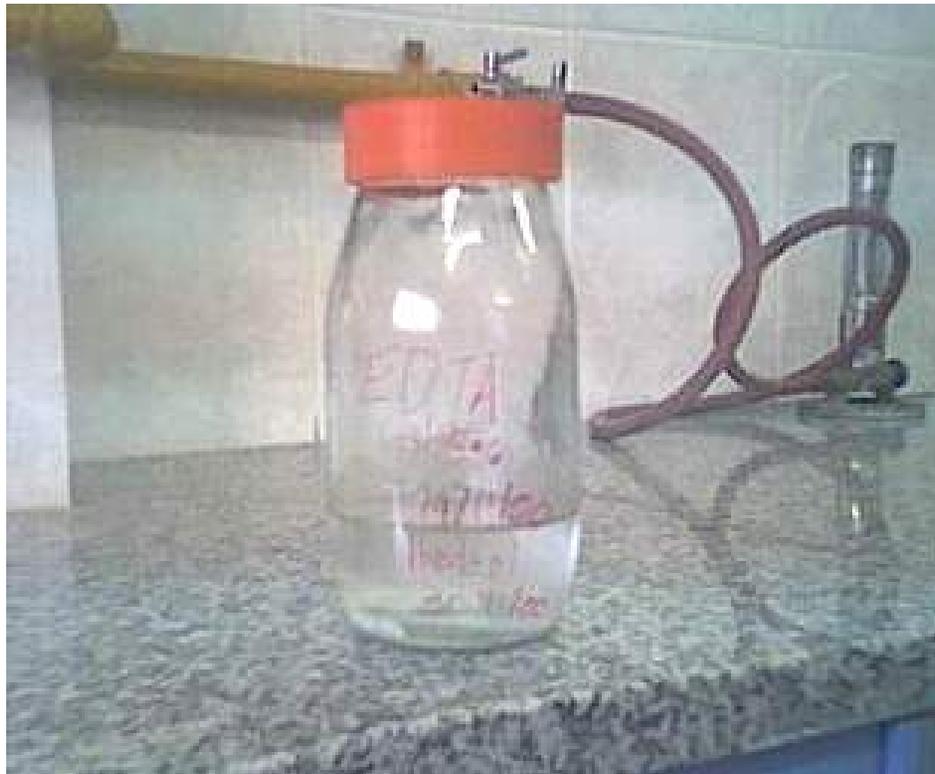
- BIOPSIAS
 - INCISIONAL
 - EXCISIONAL
 - NECROPSIA O AUTOPSIA
 - CITOLOGÍA EXFOLIATIVA
 - FROTIS E IMPRONTAS
- 



FIJACIÓN

- La fijación tiene por objeto matar las células y conservarlas, hasta donde sea posible
 - Es un método histológico destinado a obtener preparados duraderos que conservan la estructura morfológica y química de las células y tejidos al estado vivo y que permite realizar, posteriormente, los procedimientos de coloración o de identificación que facilitan el completo conocimiento de su constitución íntima
- 

FIJACIÓN





FIJACIÓN

CUALIDADES DE UN FIJADOR

- 1. Actuar con rapidez, matando y fijando a las células antes de que aparezcan autólisis, desintegración, etc.).
 - 2. Poseer alto poder de penetración para asegurar la fijación correcta hasta en las capas profundas
 - 3. Conservar, en lo posible, los detalles estructurales que presentaban in vivo
 - 4. Permitir o favorecer el empleo de los procedimientos necesarios para su observación ulterior (ejecución de cortes, coloración, etc.)
 - 5. Impedir la desaparición de los elementos solubles durante la fijación o después de ella
 - 6. No provocar o impedir la producción de estructuras artificiales
 - 7. No retraer excesivamente los tejidos ni volverlos friables o quebradizos.
- 



FIJACIÓN

COMO ACTÚAN LOS FIJADORES?

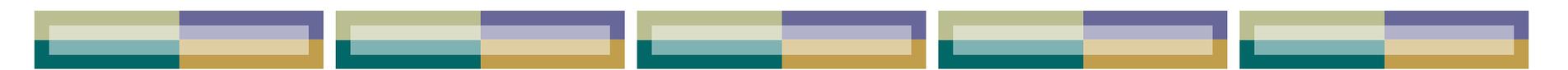
- Varía con la composición o naturaleza
 - Coagulando las proteínas sin combinarse con ellas (alcohol, ácido pícrico, yodo, calor)
 - Formando combinaciones químicas con las sustancias orgánicas (ácido crómico y sus sales), o reduciéndose en contacto con las mismas y originando en su seno un precipitado sumamente fino (ácido ósmico, bicloruro de mercurio, cloruro de oro)
 - La mayor parte de los fijadores actúan como oxidantes, favorece la coloración ulterior de los tejidos (recuérdese que éstos, en su mayoría, son reductores que muchos colorantes se transforman en leucobases incoloras al combinar una molécula de hidrógeno con su cromóforo)
- 



FIJACIÓN

FIJADORES QUIMICOS

- Son los más utilizados; pueden ser
 - **Fijadores simples**, constituidos por una sola sustancia química
 - **Fijadores compuestos** o mezclas fijadoras cuando varias sustancias intervienen en su constitución
- 



FIJACIÓN

FIJADORES SIMPLES

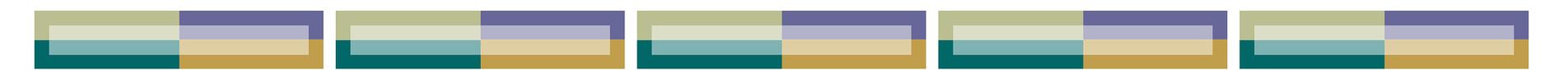
- a) *Formol al 10%*, es el más usado. Su empleo es aconsejable en todos los casos en que no se disponga de un fijador especial, principalmente cuando se trata de fijar órganos o tejidos para estudios histológicos topográficos.
 - b) *Alcohol etílico absoluto o de 96%*, se usa generalmente en microquímica.
 - c) *Alcohol metílico*, se lo emplea con frecuencia para fijar frotis desecados (sangre, médula ósea, ganglio, bazo, líquidos de punción, etc.).
 - d) *Ácido ósmico al 1 ó 2%*, es poco penetrante pero energético, conserva muy bien estructuras celulares.
 - e) *Bicromato de potasio al 3-5%*.
-



FIJACIÓN

FIJADORES COMPUESTOS

- En su composición intervienen un número variable de fijadores simples racionalmente elegidos con el fin de completar la acción de cada uno de ellos o atenuar sus efectos
- 



FIJACIÓN

FIJADORES COMPUESTOS

- a) *Líquido de Fleming*, mezcla cromo-osmio-acética.
 - b) *Líquido de Zenker*, mezcla bicromato-sublimado-acética.
 - c) *Líquido de Helly*, mezcla Zenker-formol.
 - d) *Líquido de Bouin*, mezcla picro-formos-acética.
 - e) *Líquido de Duboscq-Brasil*, o Bouin alcohólico.
- 



FIJACIÓN

FIJADORES FÍSICOS

- 1. Desecación.
 - 2. Calor seco.
 - 3. Calor húmedo.
 - 4. Frío.
 - 5. Congelación y desecación.
- 

PROTOCOLO GENERAL

● I. Fijación

- En formol al 10% (1 parte de formol y 9 partes de agua destilada) por lo menos durante 6 hs.



● II. Corte

- Se le da el tamaño deseado a la pieza y se la coloca en una bolsa de gasa, con el fin de enjuagarla en agua corriente durante, por lo menos, 15'.

PROTOCOLO GENERAL

- III. Deshidratación
- 1) Alcohol 70°, 1h30'.
- 2) Alcohol 96°, 1h30'.
- 3) Alcohol 100° (I), 1h30'.
- 4) Alcohol 100° (II), 1h30'.
- 5) Toluol, entre 1h30' y 3hs.



PROTOCOLO GENERAL

- IV. Inclusión
- 1) Secado de la muestra con gasa.
- 2) Parafina 56° (I), 1h30'.
- 3) Parafina 56° (II), 1h30'.
- 4) Formación de la barra.
- 5) 30' de freezer.
- 6) Fractura del taco
- V. Corte



PROTOCOLO GENERAL

● VI. Coloración

- 1) Secado de los cortes en estufa a 58°C, 15'.
- 2) Xilol o toluol (I), 15' en estufa.
- 3) Xilol o toluol (II), 2'.
- 4) Alcohol 100°, 30".
- 5) Alcohol 96°, 30".
- 6) Alcohol 70°, 30".
- 7) Alcohol 50°, 30".
- 8) Agua destilada, 30".
- 9) Hematoxilina, 1'30".
- 10) Agua corriente, 2'.
- 11) Alcohol 50°, 15".
- 12) Eosina, 30".
- 13) Alcohol 96°, 10".
- 14) Alcohol 100°, 10".
- 15) Xilol, 1' por lo menos.
- 16) Montaje con Bálsamo de Canadá sintético.





PROTOCOLO GENERAL

 MONTAJE

 OBSERVACIÓN





MÉTODOS DE ESTUDIO EN HISTOLOGÍA

- Para el estudio de los tejidos el instrumento más importante es el MICROSCOPIO
 - Existen una variedad importante de microscopios según el tipo de estudio que se va a realizar
 - El más utilizado es el microscopio de luz (ÓPTICO)
- 



MICROSCOPIOS

- Microscopio de campo oscuro
 - Microscopio de contraste de fase
 - Microscopio de interferencia
 - Microscopio de luz polarizada
 - Microscopio de fluorescencia
 - Microscopio de barrido confocal
 - Microscopio de luz ultravioleta
- 



MICROSCOPIOS

- Microscopio electrónico
 - Microscopio electrónico de barrido
 - Microscopio de túnel de barrido
- 



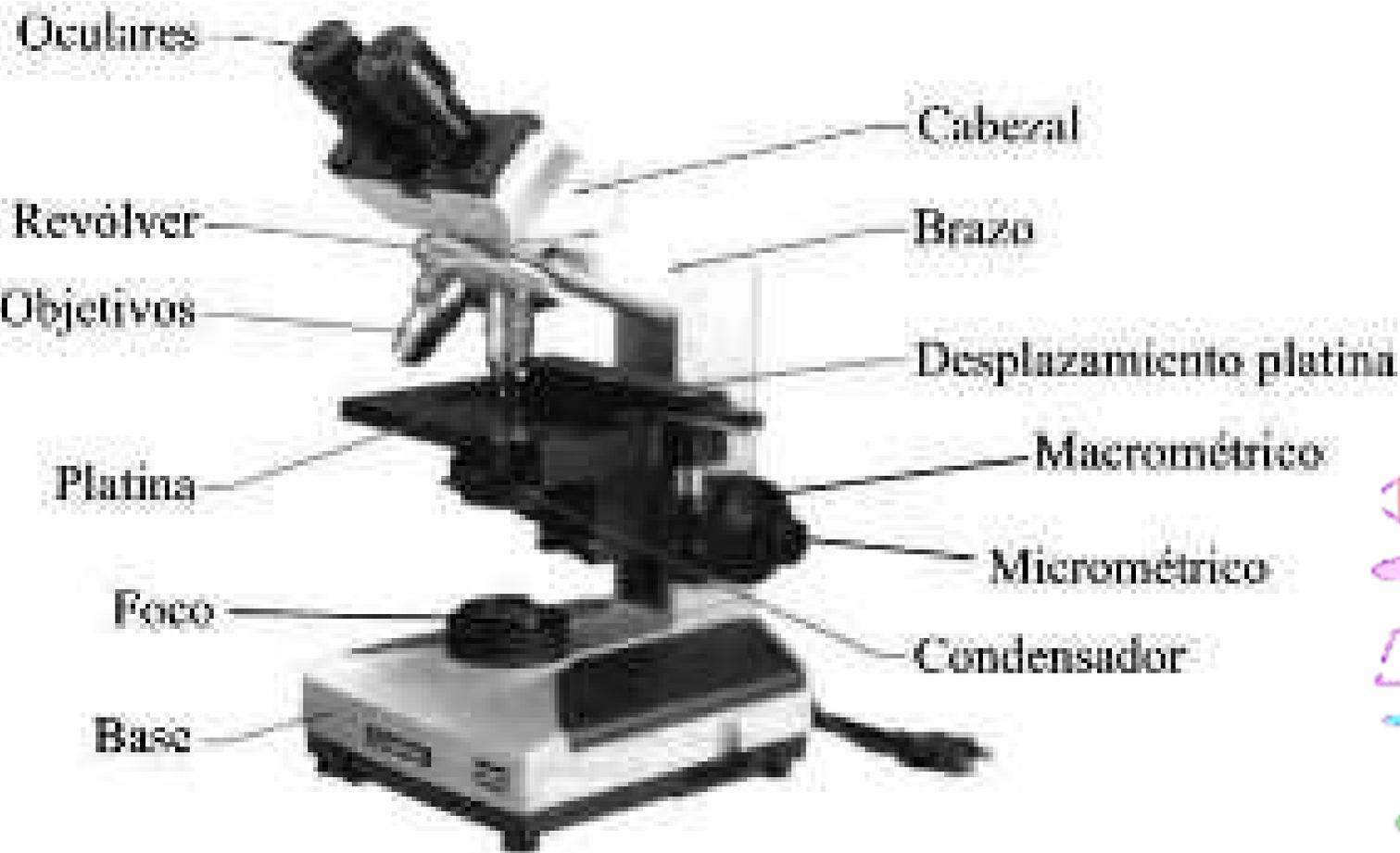
MICROSCOPIO ÓPTICO

- Compuesto por partes mecánicas y ópticas

COMPONENTES ÓPTICOS

- **Condensador:** produce un haz de luz que ilumina el objeto estudiado
 - **Objetivo:** aumenta el objeto y proyecta la imagen sobre el ocular
 - **Ocular:** aumenta aun más la imagen y la proyecta sobre el ojo del observador
- 

MICROSCOPIO ÓPTICO

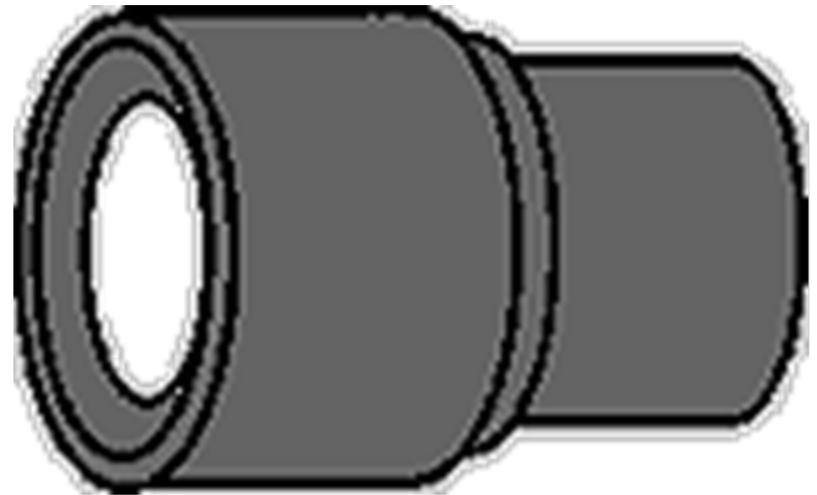


Microscopio óptico



OCULAR

- Es un tubo cilíndrico con un diafragma fijo en el centro y una lente en cada extremo, la superior se denomina lente ocular y la inferior lente colectora



OBJETIVO

- Formado por un sistema de pequeñas lentes ubicadas muy cercanas una de la otra.
- Los objetivos pueden ser objetivos a seco (no hay ninguna sustancia interpuesta entre la lente frontal y el preparado), u objetivos de inmersión (entre la lente frontal y el preparado se coloca una sustancia cuyo índice de refracción es muy similar al del vidrio)

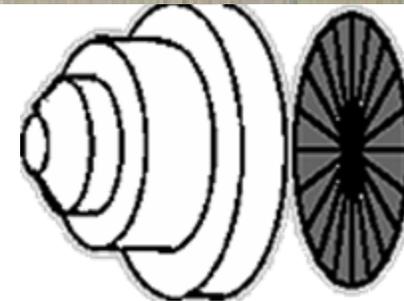


A 40X PLAN
0.65
160/17



CONDENSADOR Y DIAFRAGMA

- concentra el haz de luz sobre el plano del objeto que se encuentra en la platina.
- Debajo de él se encuentra el diafragma iris que regula la cantidad de luz que llega al condensador.



FUENTE DE LUZ

- Lámpara ubicada en la parte inferior del aparato, en caso de no poseerla debe ubicarse una fuente de luz externa (lámpara incandescente común) aproximadamente a 30 cm. del espejo

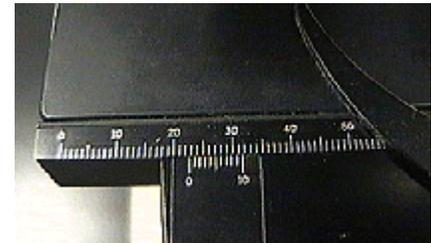


COMPONENTES MECÁNICOS

- **SOPORTE:** Mantiene la parte óptica.
Tiene dos partes: el pie o base y el brazo.



- **PLATINA:** Lugar donde se deposita la preparación.



- **CABEZAL:** Contiene los sistemas de lentes oculares. Puede ser monocular, binocular,

COMPONENTES MECÁNICOS

- **REVÓLVER:** Contiene los sistemas de lentes objetivos. Permite, al girar, cambiar los objetivos.



- **TORNILLOS DE ENFOQUE:** Macrométrico que aproxima el enfoque y micrométrico consigue el enfoque correcto.





USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO

- Conseguir una buena fuente de iluminación. Si la misma está incorporada al microscopio
 - Enfocamos con el objetivo de menor aumento
 - Cerramos el diafragma de campo y movemos el condensador hacia arriba y hacia abajo hasta que el contorno del diafragma se vea nítido
 - El diafragma se centra con los tornillos que lo sujetan a la subplatina.
 - Luego se quita el ocular y se verifica que la luz esté centrada
 - A medida que se abre el diafragma su contorno desaparece del campo observado
 - Si la fuente de luz es externa, se quita el ocular, se coloca el objetivo de menor aumento, y se mueve el espejo hasta centrar la luz
Recordemos que si tenemos condensador debemos usar la cara plana del espejo
- 



USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO

- Volvemos a colocar el ocular y, siempre con el objetivo de menor aumento, colocamos el preparado sobre la platina. Utilizando el tornillo el ajuste macrométrico enfocamos lo más claramente posible
 - El condensador debe estar en la posición más alta y el diafragma abierto. Esto si el preparado está coloreado, sino el diafragma debe estar cerrado
 - Con el tornillo micrométrico se logra el enfoque fino según nuestra visión
 - Modificamos la apertura del diafragma hasta obtener la cantidad de luz deseada
 - Luego de estudiado el preparado con este objetivo, podemos pasar gradualmente a objetivos de mayor aumento, corrigiendo la apertura del diafragma para cada uno de ellos
-



USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO

- En caso de utilizar el objetivo de inmersión, se coloca una pequeña gota de aceite sintético sobre el preparado y luego se enfoca con sumo cuidado, recordando que este objetivo es el de menor distancia frontal y corremos el riesgo de estropear el preparado y la lente frontal. Al finalizar el uso de este objetivo se deben retirar los restos de aceite con un papel de carilina o una gasa embebida en xilol o solvente especial para limpieza de lentes, nunca se debe dejar sucio el objetivo
 - Cuando se termina de utilizar el microscopio se lo debe dejar de la siguiente manera:
 - fuente de luz apagada
 - condensador al tope
 - diafragma abierto
 - platina alta
 - objetivo de menor aumento en posición
 - todas las lentes limpias
- 



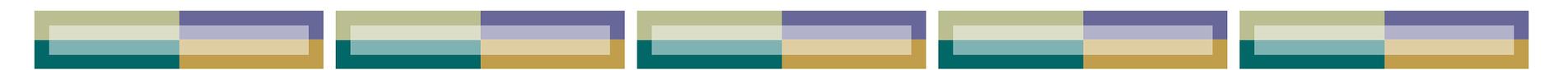
RECONOCIMIENTO DEL PREPARADO HISTOLÓGICO

- seleccione su preparado, pase el dedo suavemente por la superficie para detectar el lado del cubre objeto y colóquelo en la platina orientado hacia arriba
 - Es recomendable que se acostumbre a realizar este procedimiento con cada preparado, si usted lo coloca invertido, va a poder usar el objetivo seco débil (10 X) sin inconvenientes
 - pero cuando usted pase al objetivo seco fuerte (40 - 45 X), con el que el foco óptimo se logra a un milímetro de la preparación dado que portaobjeto tiene un grosor superior, la distancia focal quedaría dentro del mismo vidrio que constituye el portaobjeto entonces al intentar enfocar correctamente la imagen corre el riesgo de producir un daño.
 - Este puede ser de menor grado rompiendo el preparado o mayor, dañando el objetivo
- 



COLOCACIÓN DEL PREPARADO

- Coloque el preparado en la platina correctamente sujeto en su lugar con la pinza y desplace el mismo moviendo el tornillo de la platina
 - Sin mirar por el ocular, hasta que la preparación interrumpa el haz de luz que proviene de la fuente incorporada o externa
 - Una vez hecho esto aproxime, sin mirar por el ocular, la lente frontal del objetivo al preparado (sí esta por usar el seco débil de 10 X) aproximadamente a 1 cm. Coloque y mantenga una mano en el tornillo que desplaza a la platina y la otra en el tornillo macro o micrométrico que mueven el objetivo y proceda a ajustar la distancia hasta lograr una visión nítida del preparado
-



OBSERVACIÓN

- Comience con el objetivo seco débil (X10) con el que logrará una ampliación de 100 X y que permite un área de visión de 1,5 mm = 1.500 micrómetros de diámetro, aproximadamente corresponde al área que delimita esta letra "o". Recorra la totalidad del espécimen tratando de reconocer sus partes basándose en su conocimiento o a la comparación de un atlas que usted puede mantener a su lado
-

