



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

“TÉCNICAS HABITUALES EN LABORATORIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CITOLOGÍA”

AUTORIA AZAHARA CABRERA ORTEGA
TEMÁTICA PRÁCTICAS EN LABORATORIO
ETAPA EDUCACIÓN SECUNDARIA POSTOBLIGATORIA

Resumen

En el Ciclo Formativo de Grado Superior “Anatomía Patológica y Citología” es indispensable conocer y saber hacer bien las técnicas de laboratorio que a continuación se describen, las cuales son las más comunes en este tipo de muestras que se analizan en un laboratorio de este tipo.

Palabras clave

- Procesador de tejidos
- Estación de parafina
- Microtomo
- Secado
- Tinción de hematoxilina-eosina
- Reacción del PAS
- Centrífuga
- Citospyn
- Diff quick
- Papanicolau
- Tinción de Gram



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

1. PROCESADOR DE TEJIDOS

1.1 Objetivo:

El objetivo del procesador de tejidos es rellenar los espacios de los tejidos intra y extracelulares con parafina para otorgarle consistencia para la posterior microtomía.

1.2 Componentes del procesador:

El procesador está compuesto por diez recipientes de cristal y dos de metal con resistencias. Los recipientes de cristal se reparten de la siguiente forma: 2 para etanol de 80°, 2 para etanol de 96°, 3 para etanol de 100° o absoluto y 3 para xilol. En los de metal se introduce parafina que se deshace por acción del calor y penetra en los tejidos dándoles una cierta consistencia. Además, las muestras van introducidas en un cestillo metálico que se va moviendo automáticamente.

1.1 Procedimiento técnico:

Para comenzar la inclusión hay que programar el procesador, lo cual se hace de la siguiente forma: a los dos primeros recipientes se les da un tiempo de dos horas, a los ocho siguientes un tiempo de una hora y media, y a los dos de parafina que son los últimos se les da un tiempo de dos horas.

Hecho esto se procede a introducir el cestillo con las muestras en el primer recipiente y cuando termina en este se pasa automáticamente al segundo y así sucesivamente hasta terminar el programa. El programa dado puede ser modificado dependiendo del laboratorio donde se trabaje.

Una vez sacadas las muestras del procesador de tejidos se ponen en la estación de parafina para recubrirlas por fuera con este material.

2. ESTACIÓN DE PARAFINA

2.1 Objetivo:

El objetivo es lograr un bloque consistente en el que esté incluido el tejido procesado previamente para poder obtener cortes finos (de 4 a 6 micras de grosor) con el micrótopo.

2.2 Componentes de la estación:

C/ Recogidas N° 45 - 6°-A Granada 18005 csifrevistad@gmail.com



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

Está compuesta de un dispensador de parafina, un recipiente con parafina líquida para depositar las muestras que no se van a recubrir con parafina por el momento, una placa fría para que se endurezcan los bloques ya recubiertos y un apartado para los recipientes de metal en los que se ponen los tejidos.

2.2 Procedimiento técnico:

Se coge un cassette del recipiente con parafina líquida, se abre, se pone el tejido en un recipiente de metal (que están calientes) y encima se coloca la parte de abajo del cassette. Se le hecha parafina por encima (apretando en la palanca con unas pinzas para que salga la parafina del dispensador), se deja enfriar unos segundos y se le vuelve a echar parafina. Se pone en la placa fría para endurecer el bloque de parafina. Una vez enfriado se guarda en el refrigerador hasta el momento de realizar los cortes con el micrótopo.

3. MICROTOMO

3.1 Objetivo:

El objetivo del micrótopo es conseguir cortes lo suficientemente finos (de 4 a 6) del tejido incluido (en parafina) para su posterior visualización con el microscopio óptico.

3.2 Componentes y material necesario:

El micrótopo se compone de: un porta bloques con orientación regulable que avanza sobre una cuchilla discontinuamente, un porta cuchillas con un sistema para regular la inclinación de la cuchilla, una palanca que de tornillo macrométrico que acerca o aleja el porta bloques a la cuchilla, un tornillo micrométrico que mueve el porta bloques de arriba abajo haciéndolo incidir sobre la cuchilla y un tornillo en donde pone el grosor de los cortes.

El material necesario para realizar la microtomía además del micrótopo es: una cuchilla para micrótopo, un baño con agua relativamente caliente para estirar los cortes ya que se pliegan, una aguja histológica para recoger los cortes realizados y ponerlos en el baño para que se estiren, una bolsa de basura para tirar lo desbastado y los cortes inservibles, un cepillo para limpiar el micrótopo, portaobjetos para recoger los cortes elegidos del baño y un lápiz de grafito para numerar los portas.

3.1 Procedimiento técnico:

Se procede a colocar todo el material necesario en la mesa del micrótopo para no perder tiempo, se coge un bloque de parafina del refrigerador y se eliminan los restos de parafina de su periferia, se coloca en el porta bloques, se orienta el porta bloques y la cuchilla, se pone un grosor de 20 _ para desbastar hasta conseguir un corte uniforme en el que aparezca toda la superficie del tejido, se cambia el grosor a 4 o 6 para obtener cortes finos que se recogen con la aguja histológica y se depositan en el baño. Una vez estirados se recogen los cortes, seriados o no, con portas numerados para su secado en la estufa.

Se limpia el micrótopo y se recoge todo el material. El bloque se vuelve a guardar en el refrigerado



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

4. SECADO

4.1 Objetivo:

El objetivo es eliminar el agua de los tejidos por evaporación así como la parafina sobrante que se pega al porta al derretirse y así se evita el desprendimiento de los cortes.

4.2 Material necesario:

Lo único que se necesita es una estufa de laboratorio.

4.1 Procedimiento técnico:

Colocar en la estufa los cortes antes realizados con el micrótopo a 37°C durante toda la noche o a 60°C durante 1-2 horas.

5. TINCIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

5.1 Objetivo:

El objetivo perseguido es teñir los tejidos previamente secados en la estufa par poder diferenciar unas estructuras de otras en la posterior visualización con el microscopio óptico.

5.2 Material necesario:

Se necesita una cubeta para la hematoxilina (Harris o Mayer), dos cubetas para la eosina (alcohólica o acuosa), un cestillo con los portas, tres cubetas para el xilol del desparafinado, cuatro más para el alcohol (100°, 96°, 70°) y agua destilada del rehidratado, tres cubetas para alcohol (70°, 96°, 100°) de la deshidratación y otras tres para el xilol del aclarado, alcohol ácido al 1%, agente de azuleamiento, Eukitt, cubres y aguja histológica para darle golpes a los cubres. Además, se necesita una campana y guantes azules por el uso de xilol durante la tinción.

5.1 Procedimiento técnico:

Se empieza por desparafinar la muestra introduciendo el cestillo en las tres cubetas con xilol durante 1 minuto en cada una. Se rehidrata la muestra introduciendo el cestillo en las cubetas con alcohol de 100° (2 cambios de un minuto), 96° (1 cambio de un minuto), 70° (1 cambio de un minuto). Ahora se introduce el cestillo en la cubeta con hematoxilina (Harris 2 minutos o Mayer 15 minutos), seguidamente se elimina el exceso de tinción con alcohol ácido al 1% si es hematoxilina de Harris y con un agente de azuleamiento (agua corriente, CO₃Li). Se introduce el cestillo en la cubeta con eosina (alcohólica o acuosa) durante un minuto y se elimina el exceso con agua corriente si es eosina acuosa o con alcohol 70° si es eosina alcohólica. Se introduce el cestillo en las cubetas de la deshidratación (70°, 96°, 100°) durante 5 minutos en cada una, se aclara con xilol durante 5 minutos en cada una de las tres cubetas y se monta el porta con Eukitt u otro medio de montaje y se le pone un cubreobjetos encima dándole unos golpes con una aguja histológica.

El porta ya está listo para observarlo al microscopio.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

6. REACCIÓN DEL PAS

6.1 Objetivo:

El objetivo es colorear los hidratos de carbono de los tejidos para conocer si un tejido posee grupos carbonilo (PAS +) o no (PAS -).

6.2 Material necesario:

Ácido peryódico 0,5%, reactivo de Schiff, baño de ácido sulfuroso, hematoxilina (Harris, Mayer, Carachy) o Van Gieson o Naranja G para contrastar, agua corriente, agua destilada, xilol para desparafinar, alcoholes en concentraciones decrecientes para rehidratar, alcoholes en concentraciones crecientes para deshidratar, xilol para aclarar y Eukitt, cubres para montar y aguja histológica para darle unos golpes al cubre. Realizar esto en una campana y con guantes azules ya que se utiliza xilol.

6.1 Procedimiento técnico:

- Desparafinar e hidratar
- Tratamiento con ácido peryódico 0,5% durante 5 minutos
- Lavar con agua destilada
- Reactivo de Schiff de 15-30 minutos
- Aclarar en tres cambios de baño sulfuroso (2 minutos en cada uno)
- Lavar con agua corriente durante 5 minutos
- Contrastar con hematoxilina de Harris, Mayer, Carachy o con Van Gieson o Naranja G
- Lavar con agua corriente
- Deshidratar con alcohol en concentraciones crecientes
- Aclarar
- Montar

7. CENTRÍFUGA

7.1 Objetivo:

El objetivo de la centrifugación es conseguir un sedimento de la muestra a centrifugar para poder visualizarlo una vez teñido.

7.2 Material necesario:

Para la centrifugación se necesita una sustancia líquida para centrifugar (usaremos orina), tubos de ensayo, pipetas Pasteur y una centrífuga de laboratorio.

7.3 Procedimiento técnico:



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

Se llenan los tubos de ensayo con la orina utilizando pipetas Pasteur para ello, se ponen los ocho tubos en la centrífuga (los tubos que estén uno enfrente de otro deben de pesar lo mismo, aunque no es estrictamente necesario pesarlos ya que se puede hacer a ojo). Una vez colocados todos los tubos se cierra la centrífuga y se le da un tiempo de 5 minutos a una velocidad de 1500-2000 rpm. La centrífuga no debe abrirse hasta que no se haya parado del todo. Se sacan los tubos de ensayo, se elimina el sobrenadante dejando el sedimento y una pequeña cantidad de sobrenadante para mezclarlo.

Una vez hecho esto se pasa al citospyn.

8. CITOSPIN

8.1 Objetivo:

El objetivo del citospyn es conseguir una monocapa de células que posteriormente se teñirán con Papanicolau o con Diff Quick.

8.2 Materiales necesarios:

Se necesita un citospyn con sus porta muestras, el sedimento de la orina centrifugada, pipetas Pasteur, porta objetos, filtros y soportes para los portas.

8.1 Procedimiento técnico:

Se procede de la siguiente forma: se cogen los soportes para los portas, se coloca un porta encima, un filtro que lleva un agujero en el centro, una especie de embudo y un anillo que se gira para sujetar lo demás. Una vez extraídos de la centrífuga los tubos de ensayo, se coge uno por uno y con una pipeta Pasteur se deposita una gota en el porta a través del embudo mencionado antes; este soporte con el porta, el filtro y la gota de sedimento se coloca en un envase cerrado que se pone en el citospyn.

Una vez puestos los seis envases en el citospyn, este se cierra, se le dan 5 minutos de tiempo a una velocidad de 1500 rpm. Antes de que empiece el proceso de cito centrifugación hay que darle un impulso y cuando este termina se le da a empujar.

Cuando a parado totalmente se van sacando los soportes de los envases en los que estaban, se desmonta el soporte, se tira el filtro y el porta está listo para ser teñido con Papanicolau o con Diff Quick.

Así se ha conseguido realizar una citología de orina.

9. DIFF QUICK

9.1 Objetivo:

El objetivo del Diff Quick es teñir las estructuras celulares de la citología de orina preparada anteriormente para diferenciar unos elementos de otros.



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

9.2 Materiales necesarios:

Se necesita la citología realizada previamente, una solución colorante ácida, una solución colorante básica, una solución fijadora y agua destilada.

9.3 Procedimiento técnico:

Se coloca las soluciones colorantes ácida y básica y la fijadora cada una en un recipiente. La tinción es muy sencilla: se coge el porta y se realizan 20 inmersiones en cada una de las soluciones empezando por la ácida, después la básica y por último la fijadora, secando después de cada una de ellas el porta apoyándolo sobre

papel de filtro para no contaminar la siguiente solución. Finalmente se lava el porta cuidadosamente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante, se seca con papel de filtro y la citología está lista para ser observada con microscopio óptico.

Si se realizase una citología de la boca, el material se recogería con un hisopo y se depositaría directamente sobre el porta, se fijaría con un mechero de alcohol y se teñiría con Diff Quick o con Papanicolau sin necesidad de centrifugar ni de cito centrifugar.

10. PAPANICOLAU

10.1 Objetivo:

El objetivo es conseguir diferenciar estructuras celulares de una citología de orina o de boca utilizando para ello diversos colorantes.

10.2 Material necesario:

Se necesita un cestillo con los portas a teñir, 23 cubetas para alcoholes, colorantes, agua destilada y agua corriente. Se necesita también una campana ya que se utiliza xilol y guantes azules para este.

10.1 Procedimiento técnico:

El procedimiento a utilizar es el que se adjunta a continuación:

- Etanol 80°.....30s
- Etanol 70°.....30s
- Etanol 50°.....30s
- Agua destilada.....30s
- Hematoxilina Harris.....3-6 minutos
- Agua destilada.....30s
- Solución HCL 0,25%.....sumergir 6 veces
- Agua corriente.....6 minutos



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

- Agua destilada.....30s
- Etanol 50°.....30s
- Etanol 70°.....30s
- Etanol 80°.....30s
- Etanol 95°.....30s
- Papanicolau OG6.....90s
- Etanol 95°.....30s
- Etanol 95°.....90s
- Papanicolau Stain EA-50.....90s
- Etanol 95°.....30s
- Etanol 95°.....30s
- Etanol 95°.....30s
- Etanol 95°.....30s
- Etanol 100°.....30s
- Xilol-Alcohol (1:1).....30s
- Xilol.....30s

Después de este proceso se monta la muestra con Eukitt y se le pone un cubre encima dándole unos golpes con una aguja histológica.

11. TINCIÓN DE GRAM

11.1 Objetivo:

El objetivo del Gram es diferenciar a los microorganismos en Gram (+) y Gram (-) utilizando diversos colorantes. Los Gram (+) se tiñen con el primer colorante que es violeta de metilo y los Gram (-) no se tiñen con este colorante.

11.2 Materiales necesarios:

Se necesitan portas con muestras a teñir, un cristizador para que caigan los restos de colorante en él, unas varillas paralelas para situar los portas encima de ella y echarle los colorantes, las soluciones colorantes necesarias, agua destilada, Eukitt, cubre objetos y aguja histológica para golpear suavemente el cubre para que se adhiera mejor.

11.3 Procedimiento técnico:

Las muestras se fijan con formalina al 10%, se desparafinan y se hidratan. Seguidamente se ponen los portas sobre las varillas paralelas y se procede a la tinción según el siguiente protocolo:

- Violeta de metilo al 1% durante 3 minutos
- Solución yodada de Gram durante 3 minutos
- Lavar bien en agua corriente
- Diferenciar en solución alcohólica yodada hasta que cese la extracción de color
- Lavar en agua corriente durante 5 minutos
- Rojo neutro al 1% durante 2 minutos



ISSN 1988-6047 DEP. LEGAL: GR 2922/2007 N°3 – FEBRERO DE 2008

- Lavar en agua corriente
- Aclarar en alcohol absoluto para eliminar el exceso de rojo neutro. Secar con papel de filtro,
- Repetir hasta que quede claro
- Montar con Eukitt y cubrir objetos
- La muestra ya está lista para observarla con el microscopio óptico.

BIBLIOGRAFÍA

- García del Moral, R. (1993). *Manual de laboratorio de anatomía patológica*. Editorial MacGraw-Hill / Interamericana de España S.A
- Stevens, A. (2001). *Anatomía patológica* .Barcelona: Editorial Elsevier España, S.A,

Autoría

-
- Azahara Cabrera Ortega
 - Córdoba
 - E-MAIL: azahara_co@hotmail.com