

Técnico Superior
en Anatomía
Patológica y
Citodiagnóstico

Procesamiento citológico y tisular

Coordinadores

*David de Pablo Velasco
Pedro Espinosa González
Julián Sanz Ortega*

ARÁN



Autores

Director

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales.

Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

Coordinadores

David de Pablo Velasco

Experiencia laboral, investigadora y docente en distintos centros de alta cualificación. Especialista en técnicas de Dermatopatología y cirugía de Mohs. Miembro del equipo de trasplantes del Hospital Universitario Clínico San Carlos. Técnico de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Pedro Espinosa González

Especialista en Sanidad Mortuoria, gestión de cadáveres y tanatopraxia, con experiencia laboral e investigadora en distintos centros. Técnico de Anatomía Patológica. Pracsamor s.l. Madrid

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012.

Autores**David de Pablo Velasco**

Técnico Superior de Anatomía Patológica y Citología. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Pedro Espinosa González

Técnico Superior de Anatomía Patológica y Citología. CNIC, Madrid

Lourdes Estrada Muñoz

Médico Residente Especialista en Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

José Manuel González Quintana

Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citología. Hologic Iberia S.L.

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid

María Suárez Solís

Médico Residente Especialista en Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Índice

Capítulo 1

Realización del procesamiento de la muestra	15
1. Materiales, reactivos y equipos en histotecnología y citotecnología	16
2. Uso eficiente de recursos	22
3. Seguridad y prevención de riesgos en el laboratorio. Gestión de residuos...	23
4. Características macroscópicas de la muestra	29
5. Proceso de fijación tisular	30
6. Decalcificación y reblandecimiento tisular	34
7. Artefactos.....	35
8. Registro y conservación de muestras	37

Capítulo 2

Realización de bloques de tejidos	45
1. Fundamentos y proceso de inclusión de muestras para microscopía óptica y electrónica: deshidratación, aclaramiento e infiltración	46
2. Preparación y confección de bloques. Orientación de la muestra	50
3. Preparación, programación, limpieza y mantenimiento de los equipos y materiales.....	53
4. Otras técnicas de procesamiento y estudio histocitológico. Análisis de imagen. Estereología. Microdissección láser.....	55

Capítulo 3

Aplicación de técnicas de corte	63
1. Tipos de microtomos y componentes: oscilación, rotación, deslizamiento, criostato y ultramicrotomo, entre otros.....	64
2. Preparación de equipo. Orientación del bloque y la cuchilla	67
3. Técnicas de corte según el microtomo y la composición del bloque.....	69
4. Problemas en la sección de especímenes y resolución de los mismos	71
5. Extensión y montaje de la muestra.....	73
6. Cumplimiento de las normas de seguridad.....	75

Capítulo 4

Aplicación de técnicas de tinción	83
1. Fundamentos y mecanismos generales de coloración	84
2. Coloraciones histológicas de conjunto.....	85
3. Técnicas de coloración no histoquímicas para la identificación de sustancias: lípidos, glucógeno, mucina, fibrina y tejido conjuntivo, entre otros métodos para estudios neurohistológicos.....	88
4. Tinciones para la visualización de microorganismos	94
5. Contrastado en microscopia electrónica	96

Capítulo 5

Aplicación de técnicas histoquímicas y enzimo histoquímicas	101
1. Técnicas de tinción histoquímicas	102
2. Tipos de tinciones histoquímicas	104
3. Fundamentos, controles y aplicaciones de las técnicas de histoquímica enzimáticas	114
4. Técnicas de tinción para la determinación de enzimas	116
5. Histoquímica de las lectinas y aplicaciones	117

Capítulo 6

Aplicación de técnicas inmunohistoquímicas	123
1. Anticuerpos monoclonales y policlonales. Marcaje de anticuerpos.....	124
2. Fundamentos de los métodos inmunohistoquímicos: directos e indirectos...	126
3. Clasificación de las técnicas en función del marcador utilizado	127
4. Procesamiento histológico y restablecimiento de la inmunoreactividad tisular.....	129
5. Procedimientos de las técnicas inmunohistoquímicas y controles.....	132
6. Marcadores tumorales	134

Capítulo 7

Procesamiento de muestras celulares	141
1. Materiales y equipos básicos para el procesamiento citológico	142
2. Procesado general del material citológico.....	146
3. Fundamento, reactivos y protocolos de las diferentes técnicas de tinción	150
4. Control de calidad de la preparación. Conservación y archivado.....	154
5. Bloques celulares. Concepto, fundamento y preparación.....	156
Soluciones “Evalúate tú mismo”	163

capítulo

I

REALIZACIÓN DEL PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

*David de Pablo Velasco,
Pedro Espinosa González*

Sumario

1. Materiales, reactivos y equipos en histotecnología y citotecnología
2. Uso eficiente de recursos
3. Seguridad y prevención de riesgos en el laboratorio. Gestión de residuos
4. Características macroscópicas de la muestra
5. Proceso de fijación tisular
6. Decalcificación y reblandecimiento tisular
7. Artefactos
8. Registro y conservación de muestras

En este capítulo se verán los **materiales** y **equipos** que utilizan más habitualmente los laboratorios de anatomía patológica y las principales normas de seguridad para prevenir accidentes. Veremos la importancia del estudio macroscópico y tallado de las muestras, donde seleccionamos el tejido que se va a procesar. La **fijación** es otro aspecto clave, y también el proceso de decalcificación cuando es necesario.

I. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS EN HISTOTECNOLOGÍA Y CITOTECNOLOGÍA

I.1. Materiales

Algunos de los más básicos para un laboratorio de anatomía patológica son:

- › **Casetes** (Figura 1): son recipientes perforados de plástico donde se introduce el material seleccionado para ser estudiado por el patólogo.
- › **Bisturís** (Figura 2).
- › **Pinzas** (Figura 2).

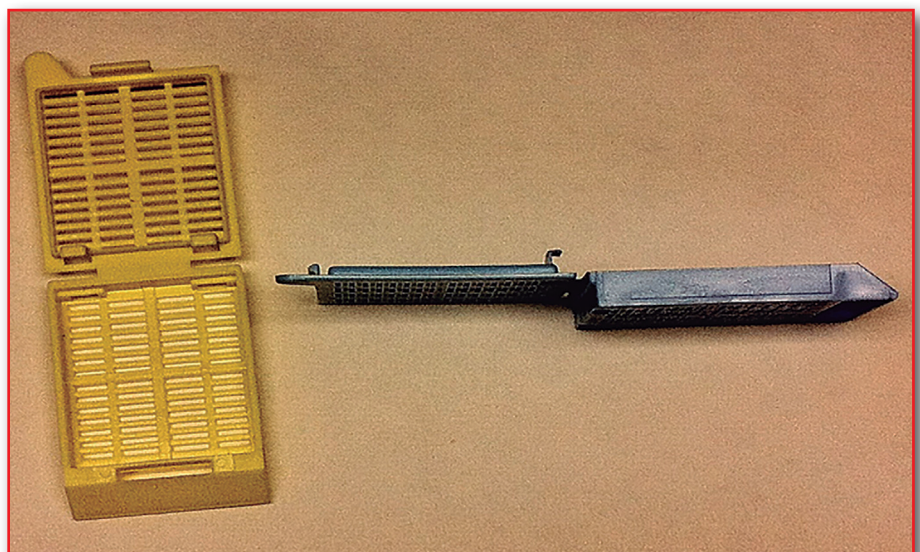


Figura 1. Casete de plástico.

1.5. Equipos comunes

- › Teñidores (Figura 11): los hay manuales y automáticos, contienen todos los reactivos necesarios para hacer las tinciones que deseemos.

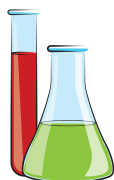


Figura 11. Teñidor automático.

- › Montadores automáticos (Figura 12): para poner cubreobjetos sobre los portaobjetos ya teñidos.



Figura 12. Montador automático.



La eficiencia es la relación entre los recursos utilizados en un proyecto y los logros conseguidos con el mismo.

2. USO EFICIENTE DE RECURSOS

Podemos definir la **eficiencia** como la relación entre los recursos utilizados en un proyecto y los logros conseguidos con el mismo. Se entiende

que la eficiencia se da cuando se utilizan menos recursos para lograr un mismo objetivo o, al contrario, cuando se logran más objetivos con los mismos o menos recursos.

El **análisis de los costos del sistema sanitario**, en el contexto económico nacional y de la actual crisis internacional, conduce inevitablemente al imperativo de un uso racional y eficiente de los cuantiosos recursos que le asegura el Estado, para continuar satisfaciendo con máxima calidad las necesidades de salud de la población.

En el contexto de los laboratorios debemos intentar siempre no gastar más de lo necesario, usando los materiales y reactivos todo lo que su vida útil nos permita. En los laboratorios de anatomía patológica la eficiencia nos vendrá dada por cada laboratorio, dependiendo de su volumen de trabajo.

Siempre habrá que adaptar las medidas de eficiencia a la rutina y volumen de trabajo de los laboratorios, de tal manera que no se entorpezca el trabajo.



RECUERDA QUE

Eficiencia es usar los mínimos recursos para lograr los objetivos.

⇒. SEGURIDAD Y PREVENCIÓN DE RIESGOS EN EL LABORATORIO. GESTIÓN DE RESIDUOS

A la hora de trabajar en un laboratorio es muy importante **saber cuáles son los riesgos** para poder llevar a cabo un trabajo seguro. Para ello se seguirán los principios de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales (Ley 31/95 del 3 de diciembre de 2003).

Los trabajos en el laboratorio pueden presentar una serie de riesgos según su **origen**: las instalaciones, los productos que se manejan o las operaciones que se realizan.

⇒.1. Identificación de los riesgos asociados a las técnicas

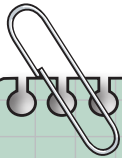
- **Riesgos de seguridad:** se denominan así los riesgos derivados del puesto de trabajo y de los equipos o máquinas que se manipulan. Pueden ser cortes, quemaduras, explosiones o riesgos eléctricos.
- **Riesgos biológicos:** están asociados con la exposición a agentes biológicos transportados por sangre o fluidos corporales (semen, fluidos vaginales, LCR, líquidos pleural y amniótico). Cuando estos riesgos derivan de la actividad profesional se denominan "riesgo biológico profesional". Su vía de entrada puede ser dérmica, digestiva o aérea.



RECUERDA QUE

La seguridad en los laboratorios es de vital importancia; lo que en principio no puede dar señal de accidente, con la repetición y el paso del tiempo puede desembocar en una enfermedad o daños de salud importantes.

que se utiliza con mayor frecuencia, adaptar la silla a la altura del plano de manera que los hombros estén en posición neutra (brazos a 90°), apoyar los pies en una superficie (reposapiés o estribos de la silla).



AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

Los **equipos de protección individual (EPI)** deberán utilizarse cuando existan riesgos para la seguridad o salud de los trabajadores que no hayan podido evitarse o limitarse por medios técnicos de protección colectiva. Son equipos individuales, ya que solo son usados por la persona que realiza el trabajo, por ejemplo, gafas de protección ocular, guantes de nitrilo o mascarilla de protección respiratoria con filtro.

3.3. Tipos de residuos y procedimientos de eliminación

3.3.1. Gestión de residuos en el laboratorio

La gestión de estos residuos merece una atención especial porque presentan una potencial peligrosidad. Esta gestión debe comenzar en el centro productor, con una minimización de residuos y con una separación eficaz por clases o grupos, siguiendo con un conveniente envasado, transporte seguro por el centro productor y habilitación de almacenes para los diferentes residuos. Por último, un gestor externo se encargará de llevar a cabo adecuadamente la recogida, el transporte, el tratamiento y la eliminación de estos residuos sanitarios.

3.3.2. Clases de residuos sanitarios (Decreto 83/99)

I. Residuos generales: papel, cartón, comida, vidrio, mobiliario, restos de jardinería.

- 】 Alejada de puntos de aspiración de sistemas de ventilación.
- 】 Dotada de medidas de extinción de incendios, y de equipos y productos adecuados para la limpieza y desinfección del área en caso de vertido o derrame accidental.
- 】 Sin escalones ni pendientes superiores al 5 %.
- 】 De acceso restringido.

El depósito final debe cumplir las siguientes condiciones:

- 】 Los envases de los residuos de tipo III y de tipo VI se almacenarán separados de los envases de residuos de otras clases y a su vez separados entre sí, salvo que el destino de eliminación sea el mismo.
- 】 Los residuos de tipo III y de tipo VI no podrán compactarse o triturarse en ningún caso.
- 】 Los residuos de tipo II se almacenarán en contenedores, con o sin compactación.

4. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DE LA MUESTRA

Consiste en la inspección del material y su descripción (Figura 13), lo más semejante a la realidad, indicando los siguientes aspectos:

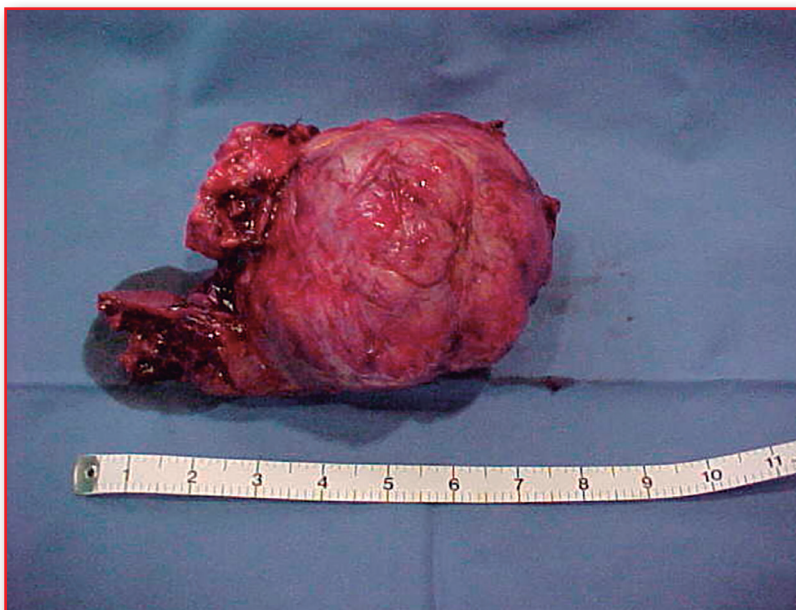
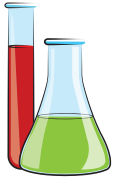


Figura 13. Pieza quirúrgica recibida en un servicio de anatomía patológica.



Existen protocolos de descripción macroscópica tipo, dependiendo del órgano y de la patología por la que la manden estudiar.

› Muestras de pequeño tamaño:

- › Tamaño.
- › Color.
- › Consistencia.
- › Hallazgos.

› En órganos parenquimatosos:

- › Tamaño, color, forma, superficie externa.
- › Peso.
- › Consistencia.
- › Hallazgos.
- › Superficie de corte.

› En órganos huecos:

- › Tamaño, forma, serosa.
- › Peso.
- › Pared (espesor, consistencia, hallazgos).
- › Mucosa (color, pliegues, aspecto, hallazgos).
- › Luz.

Existen protocolos de descripción macroscópica tipo, dependiendo del órgano y de la patología por la que la manden estudiar.

5. PROCESO DE FIJACIÓN TISULAR

5.1. Fundamentos y objetivos

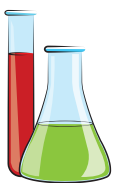
La **fijación tisular** consiste en la interrupción de los procesos de degradación (autólisis y putrefacción) que aparecen tras la muerte celular, intentando así preservar lo más fielmente posible tanto la arquitectura como la estructura de células y tejidos.

Tenemos que tener las ideas claras antes de tratar las muestras con los tipos distintos de fijadores. No existe un método universal de fijación, el fijador que es adecuado para un tejido puede no serlo para otro.

Hablar de fijación no equivale a hablar de conservación tisular, no todos los fijadores conservan indefinidamente los tejidos.

Tenemos que elegir el fijador adecuado teniendo en cuenta las características del estudio microscópico que se vaya a realizar.

Un defecto de fijación jamás puede ser corregido.



Un defecto de fijación jamás puede ser corregido.

5.2. Procesos previos a la fijación de la muestra

Tras el correcto **registro de la muestra** y la comprobación de todos los elementos contenidos en el contenedor, se deben tomar las precauciones necesarias para garantizar la llegada del fijador a todas las zonas, especialmente al interior de cavidades o piezas grandes como el pulmón, que a veces requieren apertura o manipulación por parte del patólogo. En la Figura 14 se observa cómo inyecta fijador a un fragmento pulmonar para facilitararlo. Hay que evitar que las piezas floten en el fijador.

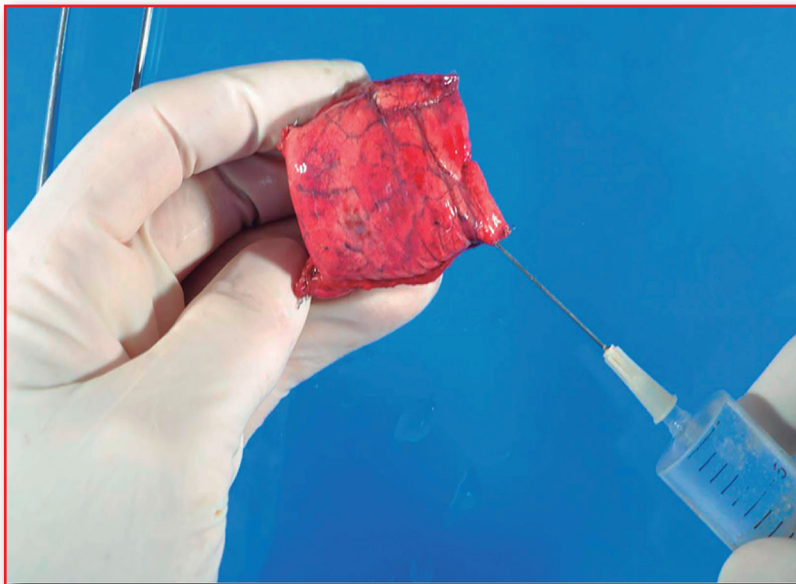


Figura 14. Inyección de formol dentro de pulmón.

Cuando queramos usar un **líquido fijador** debemos tener en cuenta unas reglas generales: el tejido debe ser colocado lo más rápidamente posible en el líquido fijador; la cantidad de líquido fijador debe ser diez veces mayor que el volumen que ocupe el tejido que se va a fijar; tanto la presión osmótica como el pH deben ser lo más aproximados al del tejido; debemos controlar los tiempos de fijación, algunos fijadores nunca deben sobrepasar un tiempo máximo.

5.3. Tipos de fijadores y normas de aplicación

Los **fijadores** se clasifican genéricamente dependiendo el mecanismo de actuación. Existen dos grandes grupos, fijadores por métodos físicos y fijadores por métodos químicos.

Nombre	Actuación	Presentación	Uso	Ventajas	Inconvenientes
Ácido acético (CH₃-COOH)	Por cambios en el estado coloidal de las proteínas	Líquido transparente, de fuerte olor avinagrado. Se vende puro (ácido acético glacial)	Fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Menor retracción tisular		Mal fijador de membranas y citoplasmas. Destruye las mitocondrias
Ácido pícrico (2,4,6-Trinitrofenol)	Por formación de sales en los tejidos	Comercialmente se encuentra en forma de agujas cristalizadas de color amarillo, muy tóxico	Coagula las proteínas a través de la formación de picratos	Excelente fijador estructural. Óptima contracción de los tejidos. Buena velocidad de fijación. Leve acción decalcificante	Muy tóxico. Explosivo. Ciertos tejidos los vuelve frágiles y quebradizos. Mala velocidad de penetración. Tiñe los tejidos de color amarillo

Fijadores compuestos

Nombre	Actuación	Presentación	Uso	Ventajas	Inconvenientes
Glutaraldehído	Análogo al del formaldehído	Líquido oleoso que se encuentra diluido al 25 %	Debido a su excepcional capacidad para preservar la morfología celular es el fijador ideal para microscopia electrónica		Velocidad de penetración muy baja. Gran capacidad de endurecimiento y retracción tisular
Líquido de Bouin (existen diferentes tipos)	Análogo al del formaldehído	Líquido amarillo de fuerte olor avinagrado	Penetra rápidamente en los tejidos. Excelente fijador estructural. Óptima contracción de los tejidos. Buena velocidad de fijación		Un uso prolongado endurece excesivamente las muestras y las vuelve quebradizas

6. DECALCIFICACIÓN Y REBLANDECIMIENTO TISULAR

Se llama **decalcificación** a la completa eliminación de las sales de calcio presentes en los tejidos previamente fijados. Habitualmente se realiza de rutina en tejidos mineralizados (huesos y dientes) y esporádicamente sobre biopsias con calcificaciones que impidan su correcto procesado y observación microscópica.

Principalmente se emplea para decalcificar ácidos fuertes o débiles, empleados aisladamente o en conjunto con otros componentes como líquidos fijadores.

RESUMEN

- ✓ En este capítulo se han repasado los **fundamentos de un laboratorio de anatomía patológica**. Es importante conocer los **equipos y reactivos** que utilizan y las condiciones idóneas para el tallado y estudio macroscópico y para la fijación y decalcificación de las muestras. En este proceso los errores no se pueden corregir posteriormente.
- ✓ También es importante el **correcto registro de las muestras** y comprobar que se reciben con todos los datos requeridos asociados a la muestra.

G L O S A R I O

Casetes: recipientes perforados de plástico donde se introduce el material seleccionado para ser estudiado por el patólogo.

Cubreobjetos: lámina de cristal más fina que un portaobjetos, que se sitúa encima del mismo para proteger los cortes tisulares.

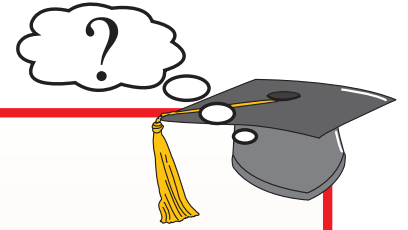
Fijación tisular: consiste en la interrupción de los procesos de degradación tras la muerte celular, intentando así preservar tanto la arquitectura como la estructura de células y tejidos

Microtomo: equipo para hacer secciones micrométricas de bloques de parafina.

Decalcificar: eliminación de las sales de calcio presentes en los tejidos previamente fijados.

Parafinero: equipo que contiene la parafina líquida para hacer los bloques de parafina.

Portaobjetos: fina lámina de cristal donde se colocan los cortes tisulares para ser estudiados.



EJERCICIOS

- › E1. **Elabora una lista con equipos para histotecnología de un laboratorio de anatomía patológica.**
- › E2. **Enumera tipos de fijadores.**
- › E3. **Describe precauciones para evitar riesgo químico.**
- › E4. **¿Qué datos debe tener un volante de una muestra para registrar?**
- › E5. **¿Qué aspectos debe incluir la descripción macroscópica de una pieza quirúrgica grande?**
- › E6. **Realiza un esquema de los pasos que se siguen desde que se recibe una muestra hasta que sale el informe diagnóstico.**
- › E7. **Describe qué es un portaobjetos y qué es un cubreobjetos.**
- › E8. **¿Para qué sirve el procesador de tejidos?**
- › E9. **Enumera artefactos causados por un mal procesamiento de la muestra.**
- › E10. **Establece una tabla con distintos tipos de fijadores y el uso principal de cada uno de ellos.**

EVALÚATE TÚ MISMO



1. **¿Cuál de las siguientes afirmaciones es falsa?:**

- a) Un defecto de fijación jamás puede ser corregido.
- b) No todos los fijadores conservan indefinidamente los tejidos.
- c) No existe un método universal de fijación.
- d) Cualquier fijador es válido independientemente del estudio que se vaya a realizar.

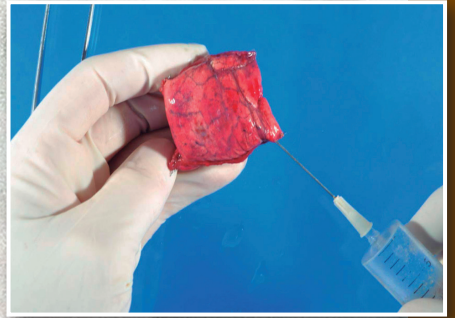
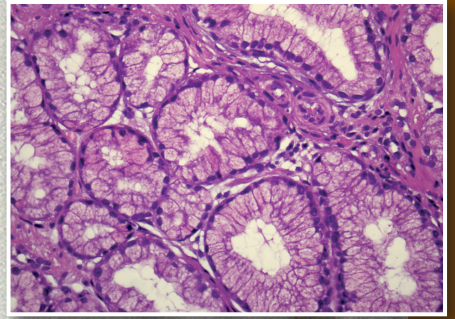


SOLUCIONES

EVALÚATE TÚ MISMO



http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=20



Avalado por:

SeAP-IAP

[Sociedad Española de Anatomía Patológica]
[International Academy of Pathology]

ISBN 978-84-16565-03-6



9 788416 585038