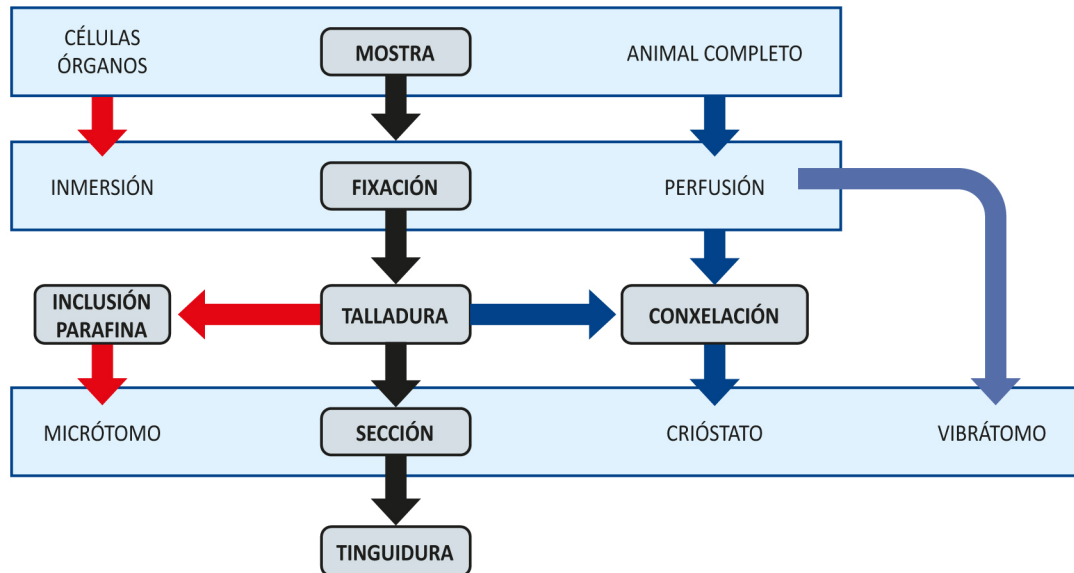


Etapas do procesamento de mostras:

1. Fixación
2. Descalcificación (opcional)
3. Talladura
4. Inclusión
5. Sección
6. Tinguidura



1. Fixación



Obxectivo da fixación: Evitar os fenómenos de autólise por acción enzimática (inactivación de enzimas lisosómicos) e impedir a difusión dos compoñentes intracelulares ("fixación").

Trátase de conservar o tecido nun estado o máis semellante ao ser vivo polo que **é importante que se inicie o máis rápido posible**.

O fixador de elección en microscopia óptica é o **formol tamponado** (10 %). A solución nai para obtelo é o formaldehido ao 40 %, polo que formol 10 % é igual a formaldehido 4 %.

Tipos de fixadores

FIXADORES RETICULANTES ou ADITIVOS: FORMOL 10 % (Tampón fosfato 0,1 M pH 7,2)

Establecen enlaces coas proteínas do tecido.

- Reacciona con aminoácidos básicos (lisina, arxina) formando pontes cruzadas de hidroximetileno.
- Fixador de elección en microscopia óptica para mostras de tecidos.
- O formol penetra 1 mm/h. Tempo estándar: 24 h (para biopsias endoscópicas ou con agulla: 6 h).
- O volume de fixador debe ser proporcional ao volume da mostra (10 veces este volume)

FIXADORES PRECIPITANTES ou COAGULANTES: ETANOL 96 % (Citoloxías e cultivos celulares)

Provocan a coagulación das proteínas (rompen enlaces de H).

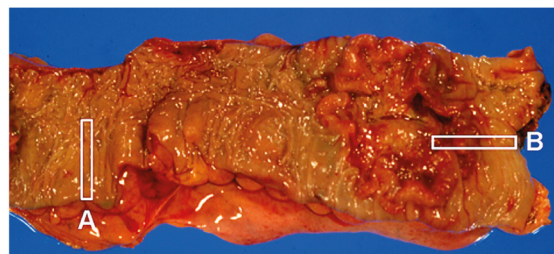
2. Descalcificación

- Necesaria se a mostra ten sales de calcio como o tecido óseo ou o dente.
- A descalcificación faise en medio ácido.
 - ✓ mesturas de etanol con ácido nítrico (5 %)
 - ✓ EDTA (etilendiamino tetraacético) 10 % (5,5 % se se engade ao formol).

3. Talladura (toma de mostras)

Selección de zonas para estudar (tecidos normais, tumores, marxes cirúrxicas) e orientación da mostra en órganos estratificados en capas.

Hai que coñecer a estrutura macroscópica dos órganos (coloración, consistencia do tecido, pregaduras...) para detectar as posibles alteracións.



É importante seguir un método estrito que está establecido con respecto a cada órgano. Permite comparar con resultados previos do propio laboratorio ou cos resultados dos demais laboratorios.

En órganos con estrutura tubular as seccións fanse seguindo unha dirección transversal (A). A marxe cirúrxica debe tomarse seguindo unha dirección lonxitudinal para observar a distancia do tumor á marxe cirúrxica (B).

A toma de mostras debe facerse de forma que se poidan ver todas as capas que forman a parede do órgano no mesmo plano. As mostras colócanse en casetes para a súa inclusión en parafina.

4. Inclusión

Para poder realizar cortes finos, a peza debe ter consistencia suficiente, o que se consegue por inclusión nun medio solidificable. Normalmente emprégase parafina (cera) ou paraplast (combinación de parafina e polímeros plásticos), que son sólidas a temperatura ambiente e funden a 60 °C).

O obxectivo é obter un bloque de tecido consistente e homoxéneo.

Pasos

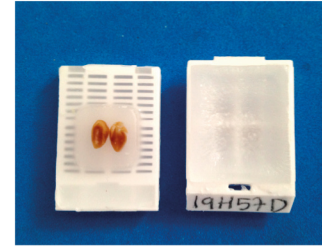
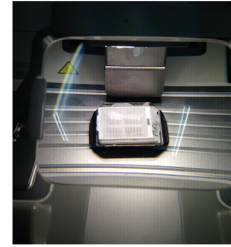
- DESHIDRATACIÓN: etanol 70 % (1h), 96% (2x1h), 100 % (3x1h)
- ACLARAMENTO xileno ou xilol (2x1h)
- INCLUSIÓN parafina 60 °C (2x1h)



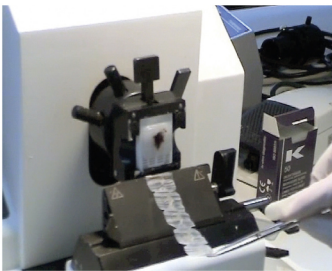
Bloque de parafina

Pasos

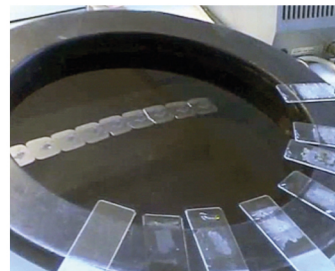
1. Poñer a mostra nun molde con parafina a 60 °C
2. Colocar a base do casete
3. Encher con parafina 60 °C e deixar arrefriar antes de retiralo do molde



5. Sección



Utilízase un micrótopo. Ao facer esvarar o bloque sobre a coitela obtense un corte. O cabezal avanza 3-5 microns e descende novamente sobre a coitela. As seccións de parafina adhírense entre si formando tiras de cortes. É importante que arrefría o bloque antes de cortalo para facilitar o proceso.



As tiras de cortes estíranse colocándoas sobre a auga a 45 °C nun baño termostático. Sepáranse e recóllense en portaobxectos. Nalgunhas técnicas (IHQ) utilízanse portaobxectos recubertos dun adhesivo como poli-l-lisina ou silano. Posteriormente déixanse secar en estufa (60 °C).

Inclusión en parafina

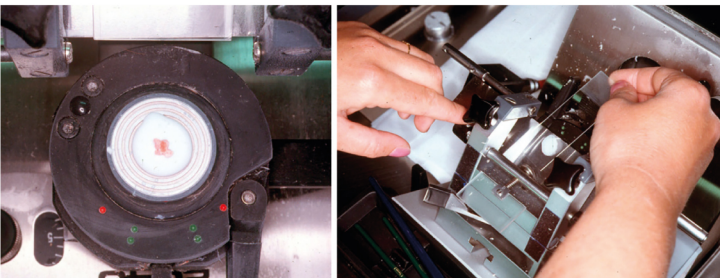
NON!



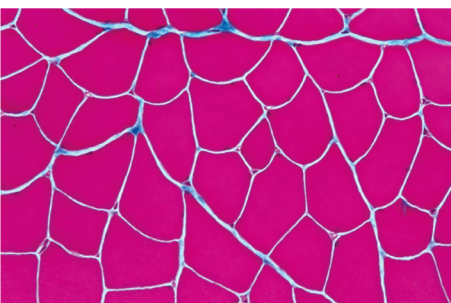
- Técnicas histoquímicas (a calor da inclusión destrúe a actividade enzimática)
- Músculo estriado esquelético (a inclusión artefacta as fibras e ademais para o diagnóstico precísanse técnicas histoquímicas)
- Biopsias intraoperatorias (ao non ter que fixar nin incluír, permiten dar o diagnóstico nun tempo de 10-15 minutos)
- Lípidos (o alcol e o xilol disolven as graxas)

Conxelación

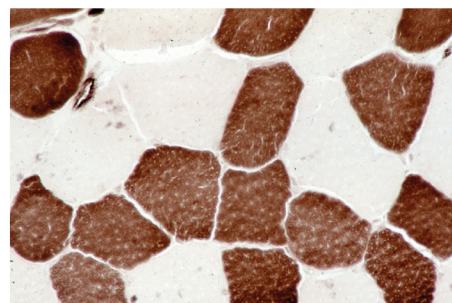
A conxelación da mostra realízase en vapores de nitróxeno líquido ou en isopentano (metilbutano) previamente arrefriado a -160 °C con nitróxeno líquido (-196 °C). A inmersión da mostra de tecido muscular debe ser rápida para evitar a formación de cristais de xeo, que tamén se formarían se se conxelase directamente en nitróxeno líquido.



As mostras córtanse nun crióstato (micrótopo nunha cámara fría)
A temperatura de corte no crióstato é de -20 °C



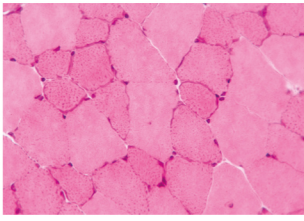
Con este procesamento hai menor retracción nos tecidos (na imaxe vese músculo esquelético tinguido co tricrómico de Masson).



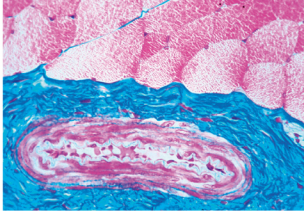
O músculo esquelético procésase por conxelación xa que é preciso facer técnicas histoquímicas (ATPase nesta imaxe) para identificar os diferentes tipos de fibras.

6. Tinguidura

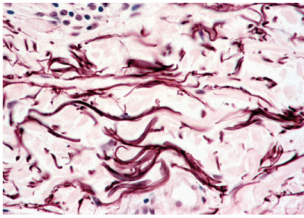
Técnicas de microscopia óptica convencionais



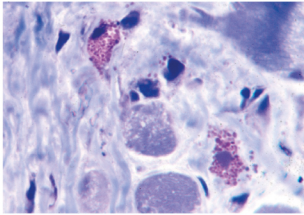
Hematoxilina-eosina (músculo estriado)
Hematoxilina: colorante básico natural (pau de Campeche), que tingue os núcleos (ADN) de violeta (núcleos basófilos).
Eosina: colorante ácido artificial (produtos de destilación da hulla), que tingue as proteínas citoplasmáticas de rosa-laranxa (citoplasmas acidófilos ou eosinófilos).



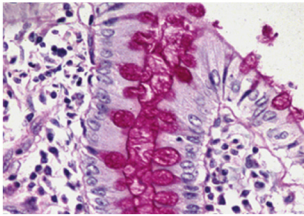
Tricrómico de Masson (músculo)
Vermello Masson: células musculares de cor vermella.
Azul de anilina: coláxeno azul.
Hematoxilina: núcleos de cor violeta.



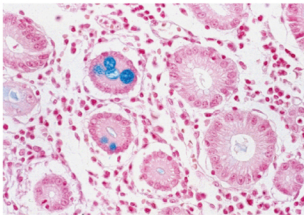
Orceína (tecido conxuntivo)
Orceína: fibras elásticas (marrón).
Contratinguidura: Giemsa: fibras de coláxeno de cor rosada, núcleos violeta.



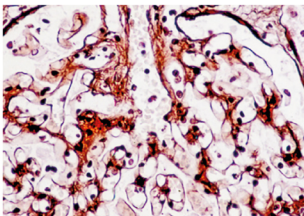
Azul de toluidina (tecido conxuntivo)
Tingue de cor azul a maior parte das estruturas. Os mastocitos tingúense de cor avermellada, virando a cor pola composición química dos seus gránulos (heparina).



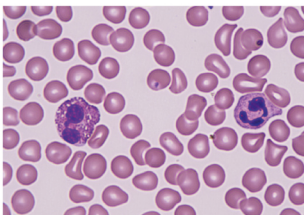
PAS (ácido periódico de Schiff) (intestino grosso)
Tingue os carbohidratos complexos de cor maxenta.
Neste caso, os mucopolisacáridos (glicosaminoglicanos), o glicocáliz e a membrana basal. Contratinguidura: hematoxilina.



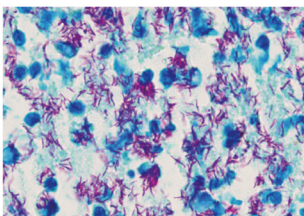
Azul de alcian (mucosa gástrica con metaplasia intestinal). Tingue os mucopolisacáridos ácidos de cor azul. Aparecen tinguidas as células calciformes na mucosa gástrica nunha metaplasia intestinal. Os mucopolisacáridos das células mucosas do epitelio gástrico son básicos e non se tinguen con azul alcian.
Contratinguidura: vermello nuclear.



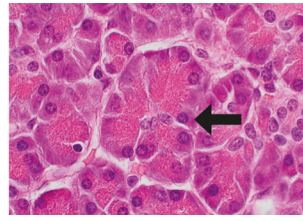
Prata metenamina (glomérulo renal)
Tingue de cor negra as membranas basais. Na imaxe tingue a membrana basal que rodea os capilares glomerulares.



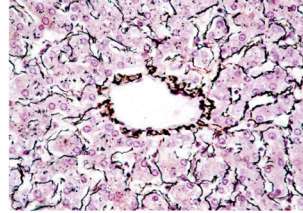
May Grünwald Giemsa, Wright (sangue)
Utilízanse para tinguir as extensións de sangue. Tingue de forma específica os gránulos dos granulocitos. Os glóbulos vermellos tingúense de cor rosa asalmoadá.



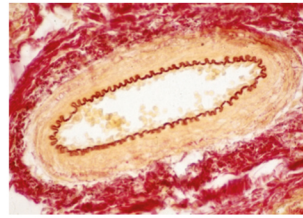
Ziehl-Neelsen
Tingue as bacterias ácido-alcohol-resistentes como os bacilos de Koch da tuberculose, que aparecen na imaxe con cor vermella.



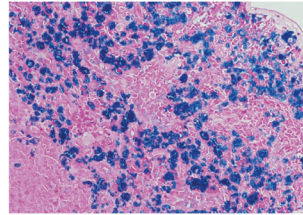
Hematoxilina-eosina (páncreas exócrino)
Nas células dos ácinos pancreáticos a hematoxilina tingue de violeta os núcleos e os citoplasmas basais circundantes (frecha) por ter abundante retículo endoplasmático rugoso (ARN). A eosina tingue de laranxa o citoplasma apical das células polo seu contido en gránulos con enzimas.



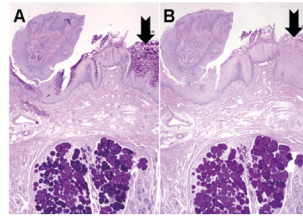
Reticulina (fígado)
Técnica arxéutica que tingue as fibras reticulares de cor negra. Contratinguidura: hematoxilina (alternativa: vermello nuclear).



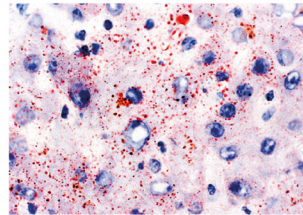
Orceína + Van Gieson (arteria muscular)
Orceína: fibras elásticas (marrón) na lámina elástica interna. Picrofucsina: células musculares de cor amarela e fibras de coláxeno de cor vermella.



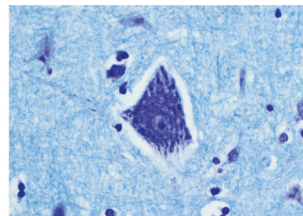
Técnica de Perls (ferro férrico) (bazo)
Tingue de cor azul os macrófagos que conteñen hemosiderina. Na imaxe do bazo atópanse na polpa vermella.
Contratinguidura: vermello nuclear.



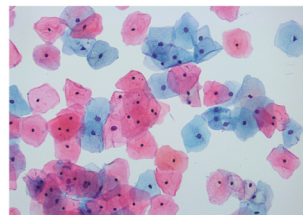
PAS (A) e PAS con diastase (B) (lingua)
(A). O PAS tinxe o glicóxeno no epitelio de revestimento (frecha) e as glándulas (mucopolisacáridos) de cor maxenta. (B). Incubando con diastase antes do PAS, o enzima dixire o glicóxeno que non se tingue (diastase sensible). Os mucopolisacáridos seguen a ser positivos (diastaserresistentes).



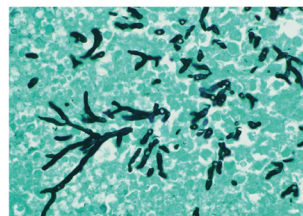
Vermello oleoso (fígado en conxelación)
Tingue os lípidos de cor laranxa a vermello.
Contratinguidura: hematoxilina.



Klüver-Barrera (sistema nervioso central)
Tingue a substancia de Nissl de cor violeta e a mielina de cor azul.

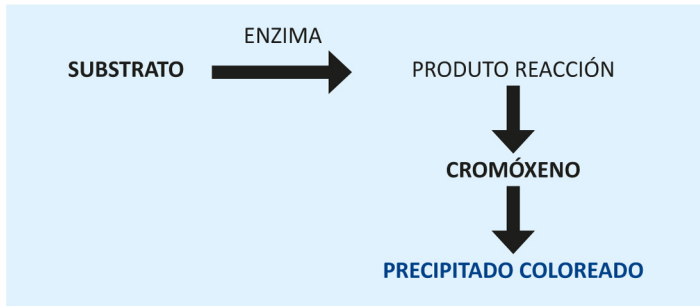


Papanicolaou (citoloxía do colo uterino)
Utilízase para tinguir as citoloxías. Nesta citoloxía tingúese o citoplasma das células das capas inferiores de cor azulada (cianófilas, polo colorante empregado: cianina), mentres que as superficiais tingúense en cor rosado (orangófilas, polo colorante empregado: orange G). Contratinguidura nuclear: hematoxilina.



Grocott
Tingue os fungos de cor negra.
Contratinguidura: verde luz.

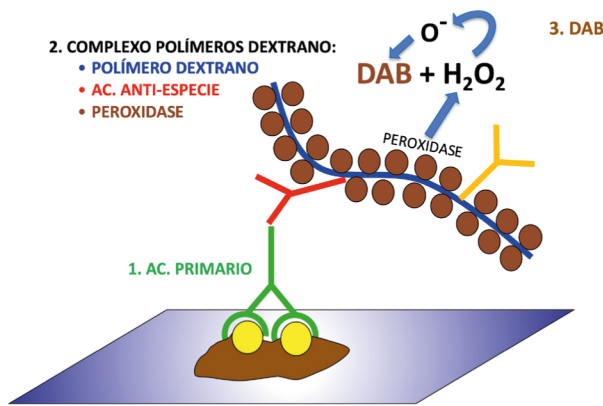
Histoquímica enzimática



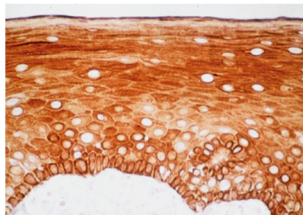
Esta técnica trata de analizar a presenza de enzimas nas células. Incúbase a mostra co substrato específico do enzima que se pretende demostrar. Se hai enzima, resulta un produto de reacción que, actuando sobre un cromóxeno, dá lugar a un precipitado coloreado.

Inmunohistoquímica (IHQ)

Técnica que permite detectar *in situ* compoñentes celulares (secuencias de aminoácidos = "antíxenos") por medio de anticorpos específicos. A súa observación realízase por medio de sistemas de detección enzimáticos (principalmente peroxidase).

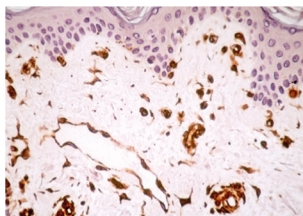


Resultado: A cor castaña reflicte a presenza da proteína. O patrón de tinguidura depende da súa localización, que pode ser citoplasmática, de membrana ou nuclear.



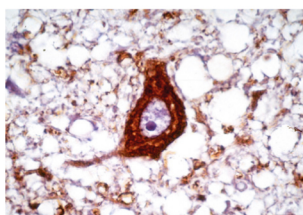
Citoqueratinas (pel)

Forman os filamentos intermedios do citoesqueleto. Son positivas unicamente as células epiteliais. Patrón citoplasmático.



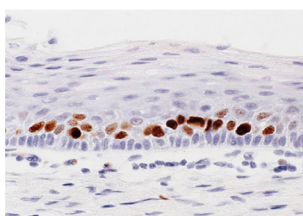
Vimentina (pel)

Constitúe os filamentos intermedios das células de orixe mesenquimal. Na imaxe son positivos os fibroblastos, pero tamén as células endoteliais (pola súa orixe mesenquimal). Patrón citoplasmático.



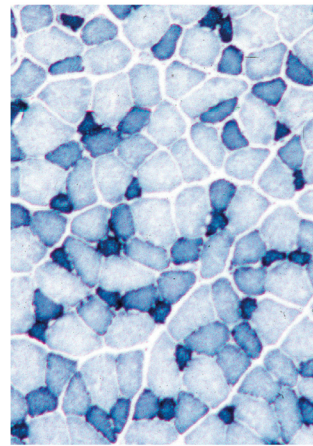
Neurofilamentos (sistema nervioso central)

É o filamento intermedio das neuronas. O patrón é citoplasmático e aparece no corpo celular e nas súas prolongacións (axóns e dendritas)



Ki67 (mucosa oral)

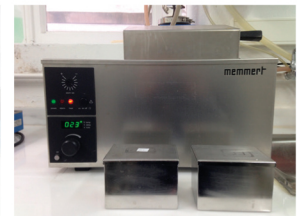
É unha proteína relacionada coa proliferación celular. O patrón é nuclear e aparece nas células que teñen capacidade para dividirse.



Succinato-deshidroxenase (SDH) (músculo estriado).

Para realizar técnicas histoquímicas non se pode fixar nin incluír a mostra porque se destrúe a actividade enzimática (cortes de conxelación).

No músculo utilízase para identificar os tipos de fibras. SDH tingue de cor azulada as fibras musculares en relación coa cantidade de mitocondrias: fibras vermellas (tipo 1) (azul intenso), fibras brancas (2B) (escasamente tinguidas) e intermedias (2A).

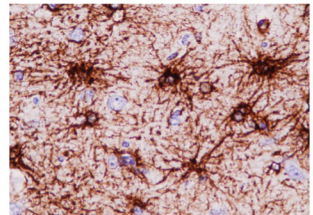


Recuperación ou desenmascaramento de epítomos

A fixación en formol forma enlaces que dificultan o acceso do anticorpo ao antígeno (epítipo). A recuperación de epítomos lévase a cabo por medio de calor que rompe os enlaces do formol, permitindo o acceso do anticorpo. Realízase en microondas ou baño termostático, empregando tampón citrato (pH 6) ou tampón tris-EDTA (pH 9).

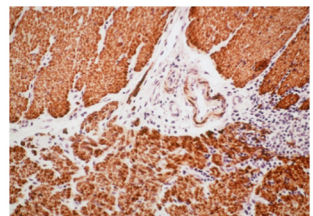
Etapas da técnica IHQ

1. Incubación co anticorpo (AC) primario específico da secuencia de aminoácidos.
2. Incubación co complexo de polímeros de dextrano que se une ao anticorpo primario por medio de anticorpos antiespecie e que incorpora peroxidase.
3. Incubación con H₂O₂ (substrato da peroxidase) e diaminobencidina (DAB) (cromóxeno). Esta etapa é unha reacción histoquímica que revela a peroxidase.



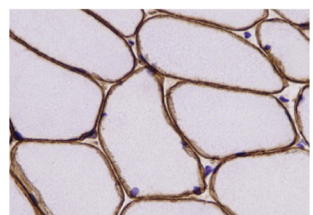
Proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (sistema nervioso central)

É o filamento intermedio dos astrocitos. Patrón citoplasmático.



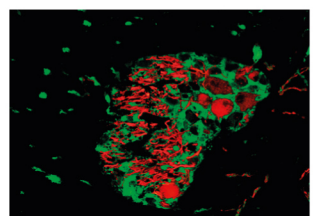
Desmina (músculo intestinal)

É un marcador de todo o tecido muscular (na imaxe vese no músculo liso intestinal, pero tamén é positiva no músculo estriado (esquelético e cardíaco). Patrón citoplasmático.



Espectrina (músculo esquelético)

É unha proteína asociada á membrana das células que se une á actina (na imaxe vese a positividade de membrana nas células musculares esqueléticas).



Dobre inmunofluorescencia para S100 e neurofilamentos (ganglio mientérico).

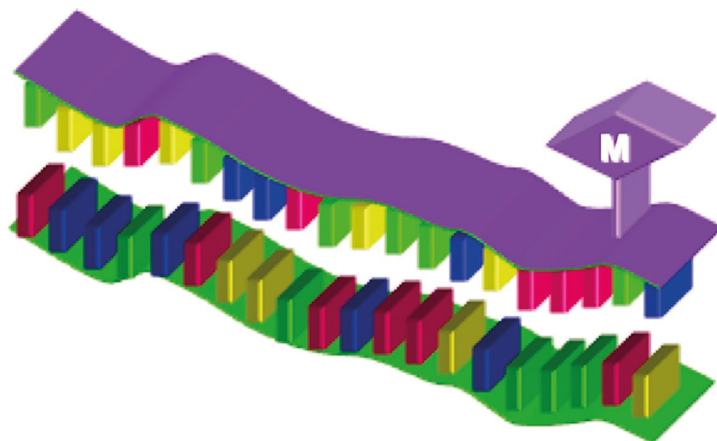
Os marcadores son fluorocromos. Neste caso empregouse Alexa 488 para S100 (células satélite, verde) e cianina 3 para neurofilamentos (neuronas, vermello)

Hibridación in situ (HIS)

O propósito da técnica é revelar nos núcleos a presenza dunha secuencia determinada de nucleótidos (secuencia diana), que pode corresponder a ARN ou ADN (neste caso hai que separar previamente as dúas cadeas mediante calor).

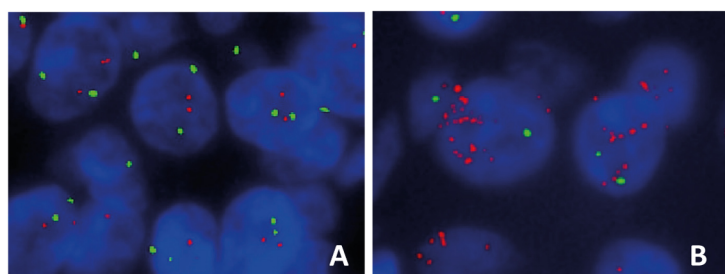
A ferramenta de traballo da HIS son as sondas, que consisten en secuencias de nucleótidos con bases complementarias (C-G, A-T/U) da secuencia diana. As sondas deben levar asociado un marcador para que poidan ser visibles en microscopía. O marcador poden ser substancias para estudo con microscopía de fluorescencia (FISH), ou substancias detectables con anticorpos (biotina, digoxigenina, dinitrofenilo ou fluoresceína), para estudo con microscopía óptica (HIS cromoxénica), na que pode empregarse amplificación con prata (SISH por Silver-ISH), ou tamén poden utilizarse fluorocromos para estudo con microscopía de fluorescencia.

HER2 é un receptor de membrana que pode sobreexpresarse en tumores, conferíndolles agresividade. A determinación de HER2 para emprego de terapias diana anti-HER2 realízase con IHQ. En casos con resultado non concluínte por IHQ, debe analizarse o estado do xene HER2 mediante HIS (empregarase a terapia en caso de amplificación). Cómpre analizar o número de sinais de HER2 e do centrómero do cromosoma 17 (onde se atopa tal xene) empregando un cóctel de dúas sondas.



Emprégase habitualmente FISH en microscopía de fluorescencia ou SISH en microscopio de luz visible, que ten a vantaxe de permitir un estudo morfolóxico máis sinxelo que no campo escuro do FISH.

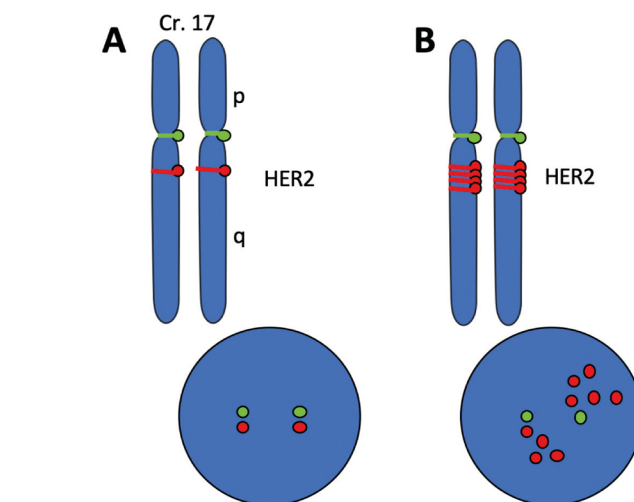
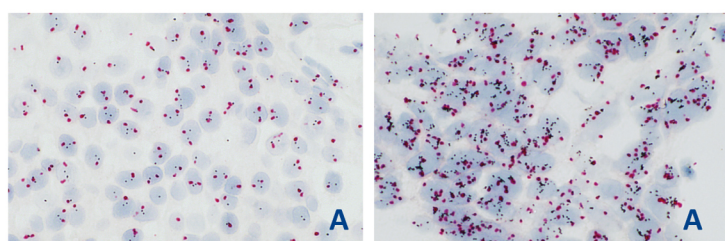
En FISH, a sonda que recoñece o xene HER2 está marcada cun fluorocromo vermello (vermello Texas) e a do centrómero do cromosoma 17, cun fluorocromo verde (fluoresceína).



FISH (cancro de mama)

A. Tumor sen amplificación HER2. Nos núcleos (contrastados en azul con DAPI) atópase o mesmo número de sinais vermello (dous sinais do xene HER2/núcleo) que verdes (dous sinais do centrómero 17/núcleo).

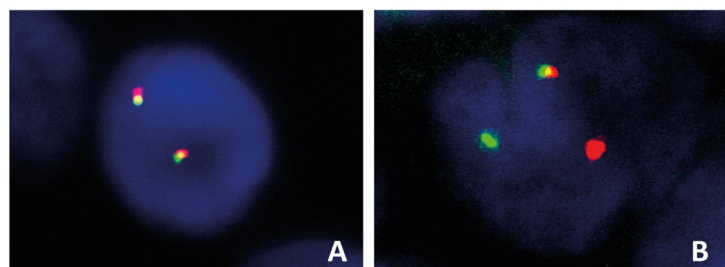
B. Tumor con amplificación HER2. Os núcleos presentan un número maior de sinais vermello que verdes (se a razón entre ambos é ≥ 2 o caso considérase amplificado).



SISH (cancro de mama). No caso do SISH o centrómero aparece vermello (Fast red) e o xene HER2 negro (amplificación con prata).

A. Tumor sen amplificación HER2. Nos núcleos (contrastados en violeta con hematoxilina) aparecen dous sinais negros correspondentes ao xene HER2 e dous vermellos do centrómero 17.

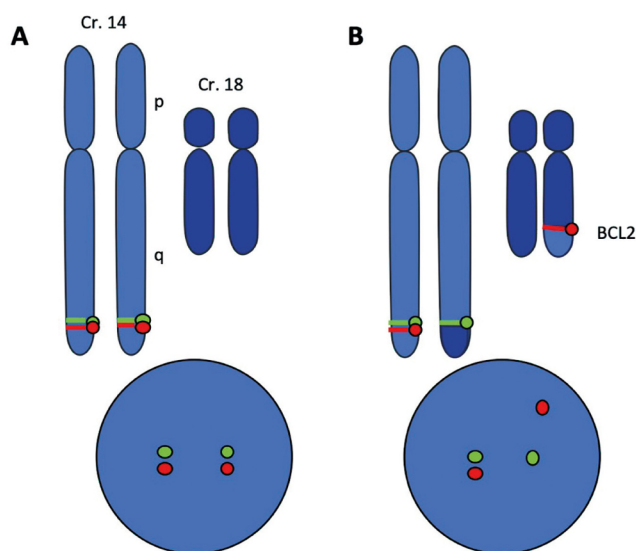
B. Tumor con amplificación HER2. Os núcleos presentan maior número de sinais negro que vermellos.



FISH (linfoma). Neste exemplo móstrase unha translocación con FISH.

A. Nos linfomas sen translocación ambos os sinais (verdes e vermellos) están xuntos.

B. Nos linfomas foliculares hai unha translocación do xene BCL2 desde o cromosoma 14 ao cromosoma 18 polo que algún dos sinais aparecen separados: t(14;18).



Microscopia electrónica (ME)

A microscopia electrónica baséase na menor lonxitude de onda dos electróns respecto aos fotóns, o que diminúe o límite de resolución (distancia mínima á que dous puntos contiguos se distinguen individualmente).

$$LR = 0,61 \lambda / AN \quad (\text{Abbe, 1873})$$

$$LR \approx 1/2 \lambda$$

Onde **LR** é o límite de resolución, **λ** a lonxitude de onda da fonte de iluminación e **AN** a apertura numérica da lente.

Simple vista: 0,2 mm

MO luz visible: $1/2 \times 0,4 \mu\text{m} = 0,2 \mu\text{m}$

ME: $1/2 \times 0,005 \text{ nm} = 0,0025 \text{ nm}$ (límite de resolución teórico, na práctica: 0,2 nm)

Un microscopio electrónico posúe unha columna na que se fai o baleiro (o aire substitúese por nitróxeno 50%). Na parte superior está o cátodo (filamento de tungsteno que emite os electróns) e por baixo, o ánodo (discoidal). Entrambos establécese unha diferenza de potencial de 60 kV, que acelera os electróns que percorren a columna atravesando a mostra e impactan sobre a pantalla de observación. A mostra intercálase no feixe de electróns, que se vai amplificando por medio de tres lentes (bobinas electromagnéticas): condensadora, obxectiva e proxectora.

Procesamento da mostra para ME

1. Fixación: glutaraldehído ao 2,5% en tampón cacodilato sódico (24 h). O glutaraldehído penetra moi lentamente e por iso as mostras han ser moi pequenas.

2. Talladura: cubos de 1 mm de lado.

3. Posfixación en tetróxido de osmio, que se fixa aos lípidos das membranas.

4. Inclusión: resinas sintéticas (a mostra deshidrátase con acetonas). Colócanse as mostras no extremo inferior do molde (cápsula de xelatina) e échese coa resina que se polimeriza na estufa.

5. Talladura das cápsulas: as cápsulas tállanse para darlles forma de pirámide coa mostra no vértice (por iso, as cápsulas chámanse tamén pirámides).

6. Corte semifino: Cun ultramicrotomo (Fig. 2, esquerda) faise primeiro un corte semifino de $1 \mu\text{m}$ de grosor (Fig. 3) para seleccionar unha cápsula da que se fará o corte ultrafino. O corte faise con coitelas de vidro (Fig. 2, dereita) e a coloración deste con azul de toluidina.

7. Corte ultrafino (100 nm): Faise con coitelas cun fío de diamante. As seccións recóllense sobre grellas de metal (cobre ou níquel) que serven de soporte (Fig. 4).

8. Contraste: Os cortes ultrafinos contrástanse con acetato de uranilo e citrato de chumbo para poder ver as células co microscopio electrónico.

Microscopia electrónica de transmisión.

O feixe de electróns atravesa a mostra. Nalgúns puntos os electróns quedan detidos polos metais pesados empregados no procesamento e non chegan á pantalla deixando unha zona escura (electrodensa). Se os electróns atravesan a mostra dan lugar a unha zona clara na pantalla (electronlucente).

A figura 5 mostra un adipocito branco. O vacúolo lipídico central (os lípidos nestas mostras non se disolven) é electronlucente, mentres que o núcleo que aparece á dereita e o bordo citoplasmático son electrodensos.

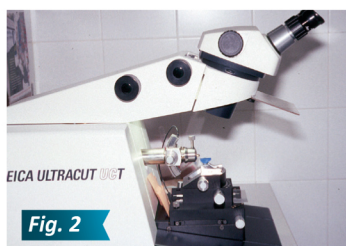
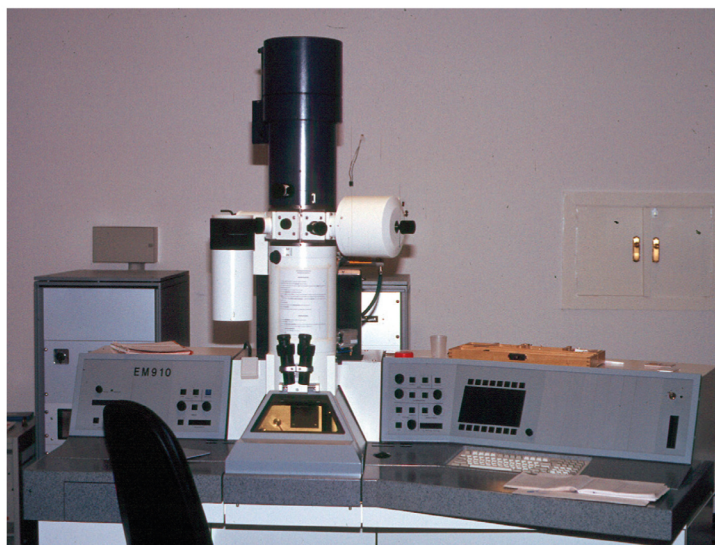


Fig. 2

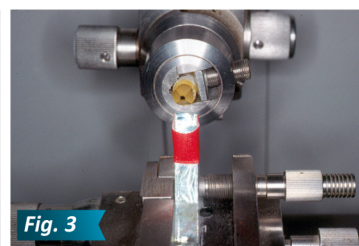


Fig. 3

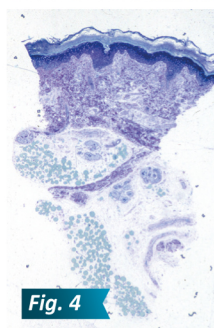


Fig. 4

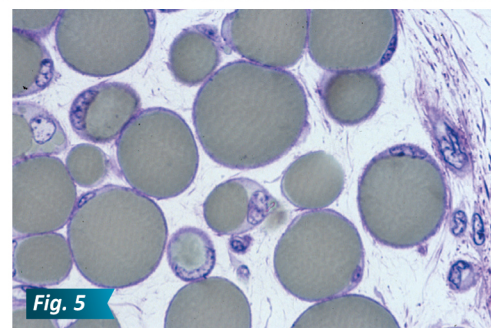


Fig. 5

