




FIJACIÓN Y PROCESAMIENTO DE TEJIDOS
Luis E Ferrer Torres, MD FCAP


INTRODUCCIÓN

- o Mecanismo por el cual preservamos la morfología de los tejidos, su capacidad inmunoantigénica y los ácidos nucleicos.
- o Cada fijador tiene ventajas y desventajas
 - Achicamiento, hinchazón, endurecimiento
- o Tipos de fijadores
 - Físicos y químicos



FIJACIÓN –MÉTODOS FÍSICOS

- o Calor
 - Como método primario
 - o Poner una sección congelada en la laminilla
 - Como método secundario o auxiliar
 - o Acelera los métodos químicos de fijación y preparación de tejidos
- o Microondas
 - Como método secundario o auxiliar
 - o Acelera los métodos químicos de fijación y preparación de tejidos



FIJACIÓN –MÉTODOS FÍSICOS

- o Congelación en seco (freeze drying)
 - Congelamos el tejido en alguna sustancia congelante (nitrogeno líquido o acetona) y luego lo mantenemos en un vacío



FIJACIÓN –MÉTODOS QUÍMICOS

- o Tres categorías:
 - Fijadores coagulantes
 - Fijadores entrecrusantes (cross linking)
 - Fijadores compuestos

Coagulación: proceso químico por el cual convertimos una sustancia soluble en agua en insoluble




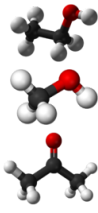
FIJADORES -COAGULANTES

- o Mecanismo de acción
 - Coagula (*hace insoluble en agua*) los compuestos básicos de lo que están hechas las células (proteínas).
 - EFECTO ADVERSO: causan pobre preservación de la ultraestructura (gránulos secretores, mitocondrias, etc.). No son buenos para microscopía electrónica.




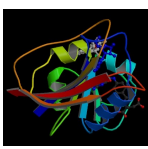
FIJADORES -COAGULANTES

- o Tipos:
 - Desidratantes
 - o Etanol (Citología y secciones congeladas)
 - o *IHQ+*
 - o Metanol (Romanowky's)
 - o *IHQ-*
 - o Acetona
 - o *IHQ+*, *IF+++*
 - Ácidos
 - o Ácido picrico (Bouin's)
 - o Ácido tricloroacético




FIJADORES DESIDRATANTES Y COAGULANTES

- o Mecanismo de acción
 - Sustituyen al agua de los tejido que rodea a las proteínas cambiando la estructura terciaria de las proteínas causando coagulación (denaturación de las proteínas)



FIJADORES -DESIDRATANTES Y COAGULANTES

- o Efecto adverso:
 - Estracción de los lípidos de los tejidos



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

- Mecanismo de Acción
 - Causan entrecrusamiento de las proteínas y de los ácidos nucleicos
- Categorías
 - Aldehídos
 - Formaldehído, glutaraldehído, hidrato de cloral, glioxal...
 - Sales metálicas
 - Mercurio, zinc
 - Otros metales
 - Tetraóxido de osmio



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

- FORMALDEHIDO
 - El fijador más utilizado
 - 10% (v/v) = 4% (w/v) neutralizada y amortiguada (neutralized and buffered) = 10% NBF
 - Proceso reversible (IHQ)



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

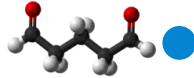
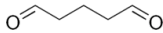
- FORMALDEHIDO
 - Si no disolvemos el formaldehído en una solución amortiguada (buffer) la formalina que se produce es **ácida**. La formalina ácida produce un precipitado color negro/marrón en la tinción de H&E.
 - Su efecto mayor es sobre las proteínas > ácidos nucleicos > lípidos >>> carbohidratos
 - Velocidad de penetración: 1 mm/h



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

o GLUTARALDEHÍDO

- Causa aún más entrecusamiento que la formalina
- Preserva mejor la ultraestructura
- Microscopía electrónica
- IHQ-
- No reacciona con los carbohidratos o lípidos
- Velocidad de penetración: 0.5 mm/h



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

o TETRAOXIDO DE OSMIO (OsO₄)

- Tóxico
- Su efecto mayor es el entrelasamiento de los lípidos y fosfolípidos (**membranas celulares**)
- Es electrón-denso
- Uso como fijador secundario en microscopía electrónica o para realizar tintes especiales de lípidos
- Velocidad de penetración: <1 mm/h



FIJADORES -ENTRECRUSANTES

o CLORURO DE MERCURIO

- Tóxico
- B5
- No se usan de rutina pero son mejores para la fijación de tejidos hematopoiéticos
 - o Sutuuido por sulfato de zinc
- Velocidad de penetración: 1 mm/h



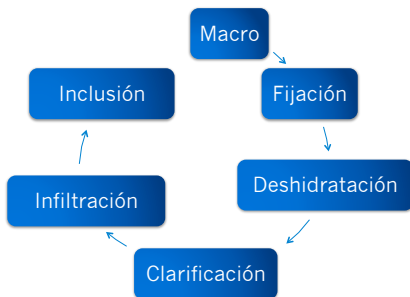
FIJADORES -COMPUESTOS

- o Formalin + etanol = formalina alcoholica
 - Preserva mejor los carbohidratos, causa menos achicamiento celular y menos endurecimiento
 - GWEF: ayuda a encontrar los nódulos linfáticos contenidos en tejidos grasosos

FACTORES QUE AFECTAN LA FIJACIÓN

- o Amortiguadores y pH
- o Duración de la fijación vs. tamaño del bloque
- o Temperatura
- o Concentración
- o Osmolaridad del fijador
 - Ideal 400-450 mOsm
 - 10% NBF 1500 mOsm
- o Aditivos
 - El fosfato que se usa en 10% NBF se precipita como sal. Puede dañar las procesadoras si no se limpian

PROCESAMIENTO DE TEJIDO RUTINA



DESHIDRATACIÓN

- Remover agua
- Proceso necesario para poder hacer la inclusión en medios no acuosos como la parafina
- Queremos remover el agua libre no el agua dentro de las células
- Demasiado deshidratación:
 - causa artefacto y endurecimiento
- Muy poca deshidratación:
 - Causa emblandecimiento
- Dos mecanismos de acción:
 - Por atracción
 - Por sustitución



AGENTES DESHIDRATANTES (ALCOHOL)

- ETANOL
 - Mejor de todos
 - Hidrofílico
 - Gradación de alcoholes de suma importancia en el procesamiento de los tejidos:
 - Reduce achicamiento de las células
 - Evita la formación de sales (interfieren con la microtomía) cuando el fijador esta en una base de fosfato
 - Regulado por agencias federales y locales
 - Sustituto: Reagent alcohol (alcohol etílico al 95% con metanol e isopropílico, estos aditivos lo hace no consumible por el ser humano)
 - Disposición regulada



AGENTES DESHIDRATANTES (ALCOHOL)

- METANOL
 - Uso como fijador
 - No como deshidratante
- ISOPROPANOL
 - Sustituto para etanol
 - ¡Precaución!
 - La EOSINA es insoluble no se debe de sustituir en la preparación de tintes especiales
 - Encoje y endurece menos que el etanol
- BUTANOL
 - Para procesar plantas y animales



AGENTES DESHIDRATANTES (ALCOHOL)

- o ACETONA
 - Uso como fijador
 - Achicamiento+++
 - Volátil
 - Hidrofilico

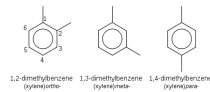


AGENTES CLARIFICANTES

- o Se les conoce así porque los tejidos se tornan transparentes cuando se exponen a los mismos
- o Tiene que ser afines tanto con el agente deshidratante (alcohol) como con el agente infiltrante (parafina)
- o Se les conoce como el agente "dealcoholizante"
- o Remueve el alcohol y prepara el tejido para la infiltración con parafina
- o Si no hay una buena clarificación no habrá una buena infiltración
- o Demasiada clarificación tiene un efecto parecido al de la deshidratación



AGENTES CLARIFICANTES




- o XYLENE
 - Mas utilizado
 - Se pone opaco (lechoso) cuando esta contaminado con agua
 - o Reemplazar inmediatamente
 - Endurece el tejido
- o TOLUENO
 - Endurece menos el tejido
 - Tolera más la presencia de agua
 - Las procesadoras automáticas condensan agua en la tapa que con los cambios de presión causan que le caiga agua al tejido durante los últimos pasos del procesamiento



AGENTES CLARIFICANTES

- BENCENO
 - Rápida evaporación
 - Difícil de mantener
 - Tóxico, carcinógeno
- CLOROFORMO
 - Lenta penetración al tejido
 - Rápida evaporación
 - Difícil de mantener
 - Tóxico
- ACETONE

AGENTES CLARIFICANTES



- LIMONENE (Sustituto de Xileno)
 - Endurecen el tejido
 - Contaminan la parafina
 - Alergias
 - Dificultad respiratoria
 - Dolor de cabeza
- HIDROCARBONOS ALIFÁTICOS
 - Alkanes
 - Nueva clase de agentes clarificantes
 - Cadenas cortas
 - Unas MARCAR mejores que otras...

INFILTRACIÓN

- Medio de soporte (embedding)
- PARAFINA
 - Mas común
 - Sustancia inerte
 - Derivado del petróleo
 - Varían en su punto (temperatura) de fusión [melting point]
 - IHQ usamos con bajo punto de fusión (55-58°C) protege antígenos buenas cintas
 - Demasiada infiltración causa achicamiento y endurecimiento

RECOMENDACIONES

- Procese o tenga protocolos distintos para las biopsias pequeñas y los tejidos grandes...