

PRACTICA Nº 2. La técnica histológica (2): Preparación del material para ser cortado.

(Joaquín De Juan Herrero©)

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Principales pasos de la técnica histológica:

En la figura 1, de nuevo se recogen los diferentes procedimientos que se pueden llevar a cabo en el ámbito de la **histología**. De todos ellos los remarcados en rojo son los procedimientos más habituales en los **laboratorios de histología y de anatomía patológica**. La práctica anterior se dedicó a describir los diferentes modos de **obtener el material** (punto 1 de la figura 1) y a la **fijación** del mismo (punto 2 de la figura 1). En esta práctica nos ocuparemos de las manipulaciones a las que el material de estudio debe ser sometido para obtener **cortes histológicos** capaces de ser **observados con el microscopio**. Tales pasos son los números 4 y 5 de la figura 1, adjunta.

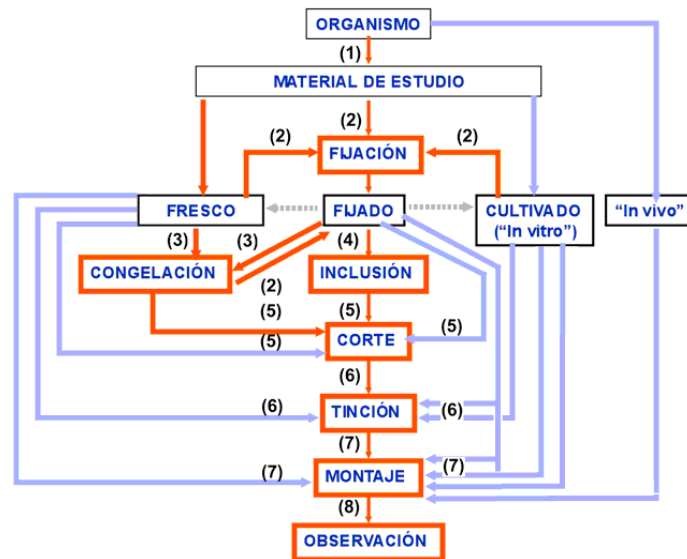


Figura 1: Principales procedimientos de la técnica histológica. A partir de muestras frescas de organismos (1), fijadas (2) o procedentes de cultivos celulares, la técnica histológica puede seguir diferentes caminos, dependiendo de los objetivos que nos propongamos. En esta práctica nos centraremos en la inclusión (4) y corte (5) del material.

2. CONCEPTOS GENERALES SOBRE LA INCLUSIÓN:

2.1. Concepto de inclusión:

El procedimiento de **inclusión** (*embedding*, en inglés) o incrustación consiste en sumergir la pieza a estudiar en un medio líquido (**medio de inclusión**) que tras penetrar en el seno de los tejidos y sus células, se solidifica adquiriendo una dureza y consistencia homogéneas para que la pieza pueda ser cortada. De esta forma se obtiene un **bloque** (Figura 2) formado por el medio de inclusión y la pieza incrustada en su interior, ambos solidificados.

En la mayoría de las inclusiones el medio **infiltra** la pieza, penetrando en su interior, incluidas las células. Es decir, penetra allí donde hay huecos, especialmente donde hay agua a la que sustituye. Cuando el medio de inclusión no infiltra a la pieza, sino que la **engloba** rodeándola, se habla de **encastración**. La gelatina suele utilizarse como medio para esta forma de inclusión.

Ahora bien, en general, los medios de inclusión no son miscibles con el agua por lo que para poder **infiltrar** la pieza y penetrar hasta el interior de sus células y otros elementos tisulares, el agua deberá ser extraída, mediante el procedimiento conocido como **deshidratación**.

El procedimiento de **inclusión** consta de cuatro fases claramente definidas: **deshidratación**, **diafanización** o aclaramiento e **infiltración** y realización de **bloques**.

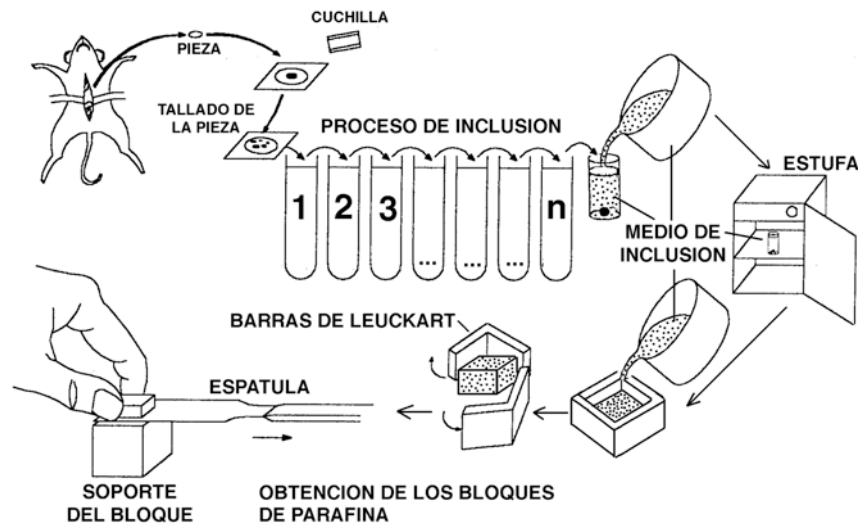


Figura 2: Diferentes fases en el proceso de inclusión en parafina de una pieza histológica. El proceso va desde la obtención del material y tallado de la pieza, la deshidratación, la diafanización e infiltración, hasta la realización del "bloque". (De Juan 1999).

2.2. Deshidratación:

En su fase líquida, los medios de inclusión pueden o no ser solubles en agua. En el primer caso difunden en aquella y la sustituyen. En el segundo caso es preciso extraer primero el agua (deshidratación) y sustituirla por un solvente adecuado al medio de inclusión. La deshidratación tiene como misión extraer el agua de la pieza y endurecerla y por lo tanto aumentar su consistencia. Entre las sustancias capaces de realizar este proceso se encuentran aquellos solventes orgánicos con gran afinidad por el agua como son las **series crecientes de: alcohol etílico, alcohol isopropílico, propanol, acetona**, etc.

Antes de iniciar su deshidratación, la pieza debe ser **lavada con agua** para arrastrar cualquier traza del fijador. En la figura 2 el lavado estaría representado por los tres primeros tubos que estarían llenos de agua. En los tres tubos siguientes se encontraría el solvente orgánico (generalmente alcohol etílico o acetona), en concentraciones crecientes, encargado de extraer el agua de las células y tejidos a la que irá sustituyendo progresivamente. Esto determinará que las células y los tejidos de la pieza se encuentren empapados en el disolvente orgánico (alcohol etílico, p.ej.).

2.3. Diafanización o aclaramiento:

Una vez deshidratada la pieza, y para que el medio de inclusión penetre, se necesita sustituir el agente deshidratante (alcohol etílico, p.ej.) por otro líquido intermedio (benzol, p.ej.) en el que sea soluble aquel. Se trata de los denominados agentes **diafanizadores** o aclaradores, llamados así por que dan un aspecto translucido o transparente a la pieza. Entre ellos merecen destacarse los siguientes: **benzol, xilol, toluol, cloroformo, aceite de cedro, esencia de clavo y óxido de propileno**. Estos productos deben usarse poco tiempo pues hacen quebradiza a la pieza. En la figura 2 el **aclarado o diafanización** estaría representado por otros tres tubos (resumidos en el tubo n) con el agente diafanizador (**benzol**, p.ej.).

2.4. infiltración:

A) Concepto de infiltración:

La infiltración consiste en la penetración del medio de inclusión en el interior de los tejidos y las células de la pieza estudiada, disolviéndose en el agente diafanizador hasta sustituirlo. Este procedimiento se utiliza tanto para microscopía óptica como electrónica de



transmisión, con algunas diferencias que se irán matizando.

B) Medios de inclusión:

Entre los medios de inclusión más utilizados tenemos:

a) Parafina:

Es una sustancia formada por cadenas alifáticas de carbono, saturadas con H, cuya fórmula general es (C_nH_{2n+2}) , donde n es el número de átomos de carbono. Su punto de fusión y ebullición se sitúa entre 45° y 60° C, dependiendo de la longitud de sus cadenas que pueden oscilar entre C_{22} hasta C_{28} .

La **parafina** o **cera de parafina**, a temperatura ambiente, es un sólido con aspecto de cera de color blanco, inodoro e insípido. Es insoluble en agua, pero soluble éter, benceno, xileno y tolueno, así como algunos ésteres. La parafina no se afecta por los reactivos químicos más comunes, pero se quema con facilidad. Es el medio de inclusión más utilizado en los laboratorios de histología y de anatomía patológica.

b) Paraplast:

Mezcla de parafina muy pura con diferentes polímeros. Su coloración es muy blanca y funde a 57° C. Tiene la peculiaridad de no fragmentarse y no necesitar ser enfriada para ser cortada con el microtomo. Su uso es el mismo que el de la parafina, aunque menos generalizado.

c) Celoidina:

Insustituible para incluir ciertos materiales como ojos, vasos, embriones, etc. Se trata de **dinitrito de celulosa** o **colodión** y se obtiene por acción del ácido nítrico diluido sobre la celulosa. Es ideal también para cortar grandes piezas.

d) Gelatina: Es una sustancia semisólida, incolora y transparente formado por el colágeno obtenido por la cocción del tejido conectivos de los despojos animales (pequeños fragmentos de hueso y cartílago). No se precisa de la deshidratación cuando se utiliza la gelatina. Es especialmente útil en el estudio del tejido adiposo. Produce escasa retracción de los tejidos.

e) Plásticos y resinas:

Utilizados especialmente para obtener cortes muy finos. Si los cortes son para su observación en el **microscopio electrónico** de transmisión, deben ser muy finos (entre 60 y 100 nm) por lo que se les denomina **cortes ultrafinos** (*thin sections*, en inglés). Si son para su observación con **microscopio óptico**, se habla de **cortes semifinos** (*semithin sections*, en inglés) y su espesor oscilará entre 0,5 μ m y 1 μ m.

Entre los medios de inclusión más utilizados tenemos:

- **Para incluir a bajas temperaturas:** Glicol metacrilato o 2-hidroxietil metacrilato, Lowicryl K4M, Lowicryl HM20.

- **No miscibles en agua:**

Epoxy resinas: Epon 812, Araldita, Maraglas, Quetol 651, DER 334, DER 332 y Spurr.

- **Miscibles en agua:** LR-White.

C) Pasos más importantes en la infiltración:

Una vez que el material ha sido deshidratado y diafanizado, debe sumergirse en el medio de inclusión que deberá estar en estado líquido.

a) Realización de bloques de parafina para microscopía óptica:

- En las inclusiones habituales, para microscopía óptica, el medio de inclusión habitual es la **parafina** que debe calentarse por encima de su punto de fusión y mantenerla en estado líquido en dispensadores especiales o en el interior de una estufa (Figura 2).

- Para comenzar la **infiltración**, la pieza debe sumergirse en una mezcla de concentración decreciente de diafanizador y creciente de parafina, para terminar sumergida en parafina pura líquida, en la que permanecerá unas 24 h.

- Una vez infiltrada la pieza, se realizará el **bloque** usando diferentes tipos de **moldes**: de papel, metal o plástico. En esta etapa, la parafina, fuera de la estufa, comienza a solidificarse por lo que hay que actuar con rapidez y orientar la pieza en el fondo del molde.

- Una vez confeccionado el **bloque** e identificado, con los correspondientes códigos (letras, números, fechas, etc.) escritos con lápiz en papel, se dejará enfriar y se almacenará hasta el momento de obtener cortes de las muestras.

a) Realización de bloques de plástico o resina para cortes semifinos y ultrafinos:

- En las inclusiones habituales, para obtener cortes semifinos o ultrafinos (microscopía electrónica), el medio de inclusión utilizado es un plástico o resina, en estado líquido a la temperatura ambiente.

- Para comenzar la infiltración, la pieza debe sumergirse en una mezcla de concentración decreciente del diafanizador y creciente de la resina o plástico, para terminar sumergida en una solución pura de resina o de plástico, en la que permanecerá unas 24 h, en un movimiento rotatorio constante.

- Una vez infiltrada la pieza, las muestras se colocan en moldes (de plástico, silicona o capsulas de gelatina) y se identificarán, con los correspondientes códigos (letras, números, etc.), escritos con lápiz en papel. Para conseguir la polimerización de la resina o plástico, los bloques se introducirán durante unas 24 horas en una estufa a 50-60°C.

- Una vez endurecido el bloque se sacará de la estufa y se almacenará hasta el momento de obtener cortes de las muestras.

3. PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CORTES HISTOLÓGICOS:

3.1. Procedimientos para obtener cortes histológicos:

Estos procedimientos tienen como objetivo producir cortes o secciones de la muestra, lo más finas posible, para poder ser observadas con el microscopio de transmisión. Los cortes se obtienen con aparatos especiales denominados **microtomos** (de *micro*, pequeño y *tomos*, cortar), aunque en los primeros tiempos de la histología los cortes se hacían a mano usando cuchillas (**cortes a mano alzada**, figura 3A). Para algunos cortes de material botánico se pueden emplear los denominados **micrótomos de mano** (Figura 3B).

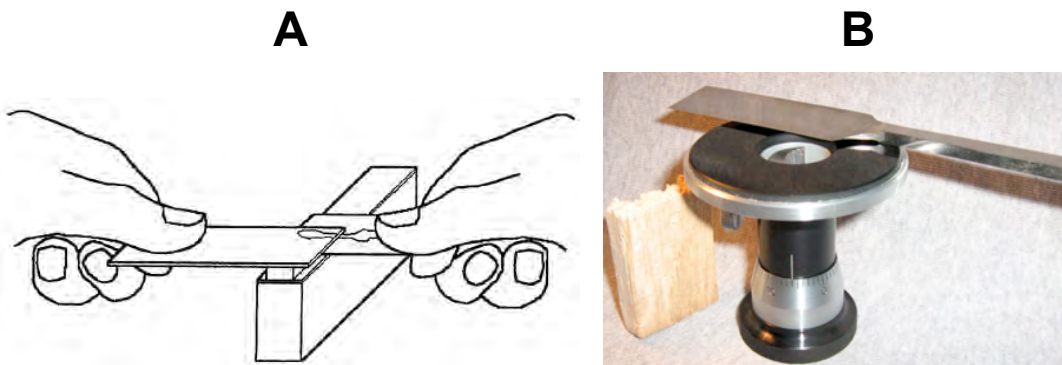


Figura 3: A) Corte a mano alzada. B) Microtomo manual para realizar cortes en plantas.

Todos los **micrótomos no manuales** o **mecánicos** tienen los mismos elementos básicos: 1) un **portabloques** en el que se apoya el **material** o el **bloque** que se va a cortar, 2) un **portacuchillas** en el que se sujeta la **cuchilla**, 3) un **mecanismo de avance** que permite la aproximación del bloque hacia la cuchilla o viceversa.

Respecto al **mecanismo de avance** existen varios tipos de microtomos, dependiendo de cual es el elemento móvil (el portaobjetos o la cuchilla), cual es la trayectoria del movimiento (horizontal o vertical) y cómo se mueve la cuchilla (sin vibración o vibrando, oscilando o balanceándose).



A) tendiendo al elemento móvil:

Podemos encontrar dos variantes de microtomos:

a) Microtomos tipo Leitz (ver la figura 5A):

En ellos, es la cuchilla la que se queda fija, mientras que el bloque se desplaza.

b) Microtomos tipo Heidelberg (ver la figura 5B):

En ellos la cuchilla es la que se mueve, mientras que el bloque queda fijo.

B) tendiendo a la trayectoria del movimiento:

Podemos encontrar dos variantes de microtomos

a) Microtomos de rotación (ver la figura 5):

En ellos el portabloques se mueven rectilíneamente, de arriba a bajo y viceversa, en sentido vertical (perpendicular al suelo). Este movimiento, resulta de la transformación, a través de engranajes, del movimiento circular de una manivela lateral al microtomo.

b) Microtomos de deslizamiento (ver la figura 6 A y 6B):

En ellos la cuchilla o el portabloques se mueven rectilíneamente en sentido horizontal o paralelo al suelo. Podemos, a su vez distinguir dos variantes:

- *Microtomo tipo Leitz o de portabloques deslizante (ver la figura 6A):* en él, se moviliza el portabloques sobre la cuchilla, permaneciendo ésta fija.

- *Microtomo tipo Reichert-Jung o de cuchilla móvil (ver la figura 6B)* e él, se moviliza la cuchilla sobre el portabloques que permanece fijo.

C) Atendiendo a como se mueve la cuchilla:

En la inmensa mayoría de los microtomos la cuchilla permanece fija y lo que se desplaza es el portabloques. En estos casos la cuchilla apenas presenta vibraciones lo que permite una baja presencia de artefactos.

Sin embargo existen microtomos en los que la cuchilla es la que se desplaza sobre la pieza, con un cierto grado de vibración en ella. Tal es el caso del **vibratomo** (Figura 8), microtomo que utiliza esta estrategia para seccionar el material fresco o fijado, sin incluir ni congelar.

3.2. Tipos de microtomos mecánicos o no manuales:

Dependiendo de cómo hayamos obtenido el material (Figura 1) y de lo que se espere y desee obtener de él, al observar los cortes, la muestra deberá ser cortada con uno u otro tipo de microtomo de los que a continuación se describen.

A) Microtomos de congelación:

Si la forma de obtener los cortes es congelando la pieza, se puede hacer utilizando las siguientes variedades de microtomos:

a) Microtomo de congelación tradicional (Figura 4A):

Microtomo que enfría la pieza produciendo nieve carbónica, al liberar CO₂ de una botella cargada con éste gas. Una vez congelada la pieza, los cortes se obtienen deslizando horizontalmente, la cuchilla sobre la superficie de la pieza congelada. Los cortes obtenidos con este microtomo son demasiado gruesos para la histología convencional (de 20 a 30µm), siendo difícil obtener cortes menores de 10µm. Actualmente se usa poco, salvo para algunos estudios histoquímicos, de neurohistología o de carácter estructural con necesidad de cortes gruesos.



Figura 4: A) Micrótomo de congelación Tipo Leitz 1213. (1) Mecanismo de sujeción a la mesa de trabajo. (2) tubo de conexión la botella de CO₂. (3) Llave de paso para el gas. (4) Porta cuchillas con dos tornillos de sujeción de la cuchilla. (5) Rail de deslizamiento de la cuchilla. (6) Eje de giro de la cuchilla. (7 y 8) Tornillo de avance (7) y palanca (8) para subir y bajar la platina (9) en la que se deposita y congela la muestra. (10) Manubrio para deslizar la cuchilla sobre la pieza congelada. (11) Cuchilla. B) Modelo de criostato.

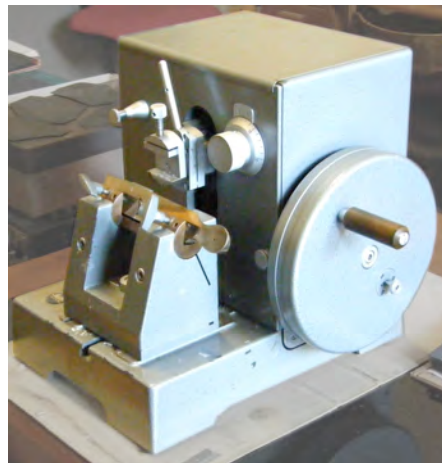


Figura 5: Micrótomos de tipo Minot o de rotación o micrótomo para cortes seriados. Este micrótomo es uno de los más utilizados en los laboratorios de histología y anatomía patológica. Obsérvese como la cuchilla permanece fija y es el portabloques el que se mueve de arriba abajo y de atrás a delante, movido al girar la rueda lateral.

b) Criostato o criotomo (Figura 4B):

Otra forma de micrótomo de congelación es el **criostato** o **criotomo** en el que se alcanzan bajas temperaturas (-20°C). Consta de un micrótomo de tipo Minot, incluido en una cámara de congelación. Permite realizar cortes de hasta 2 µm, mucho más delgados que los del micrótomo de congelación.

Con ambos aparatos podemos obtener cortes tanto de material fijado como fresco.

B) Microtomos para bloques de parafina:

Para cortes de parafina se pueden utilizar dos tipos diferentes de micrótomos:

a) Microtomos de rotación (Figura 5):

Son microtomos del tipo Leitz (de cuchilla fija) mejorados, conocidos como

micrótomos de tipo Minot o de rotación o micrótomo **para cortes seriados** (Figura 5). Este micrótomo es uno de los más utilizados en los laboratorios de histología y anatomía patológica. Se caracteriza porque la **cuchilla** permanece fija mientras que el **portabloques**, colocado verticalmente, se mueve de arriba a bajo, delante del filo de la cuchilla, a la vez que se produce el avance de aquel hacia ésta. Los cortes de parafina suelen tener un espesor entre 4 y 6 μm . Los movimientos también pueden ser realizados por un pequeño motor eléctrico.

b) Microtomos de deslizamiento (Figuras 6A, 6B y 7):

En ellos el movimiento que produce el corte es un deslizamiento horizontal, de avance y retroceso, de la porción móvil del micrótomo (cuchilla o portabloques) sobre unas guías metálicas. Se utilizan poco, generalmente para obtener cortes de material "encastrado" (no incluido) en gelatina, o incluidos en celoidina. Es difícil obtener cortes menores de 8 micras.

Existen tres tipos:

a) Microtomo tipo Leitz o de portabloques deslizante (Figura 6A):

En él, se moviliza el portabloques sobre la cuchilla, permaneciendo ésta fija y por lo tanto con menos vibraciones que en los que es la cuchilla la que se desliza.

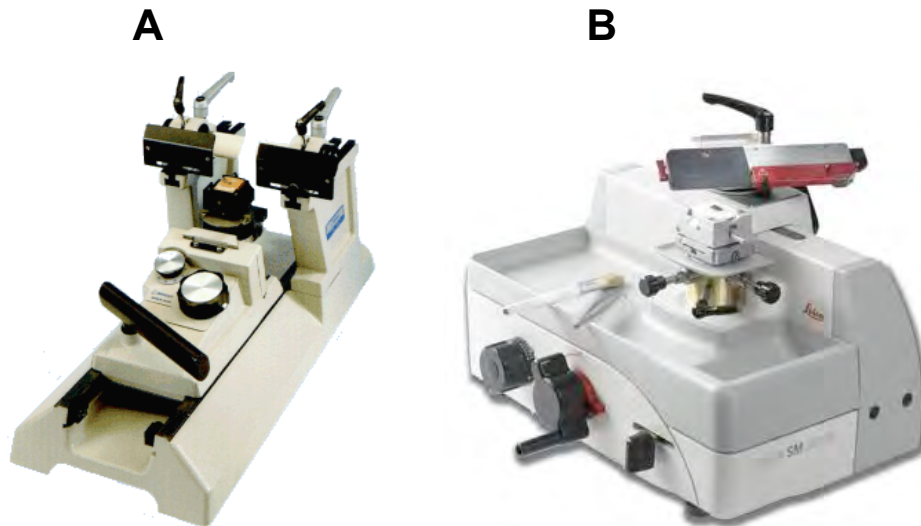


Figura 6: A) Microtomo de portabloque deslizante B) Micrótomo de cuchilla deslizante Leica SM2010 R.

b) Microtomo tipo Reichert-Jung o de cuchilla móvil (Figura 6B):

En él, se moviliza la cuchilla sobre el portabloques que permanece fijo. Presenta mayor vibración que el anterior.

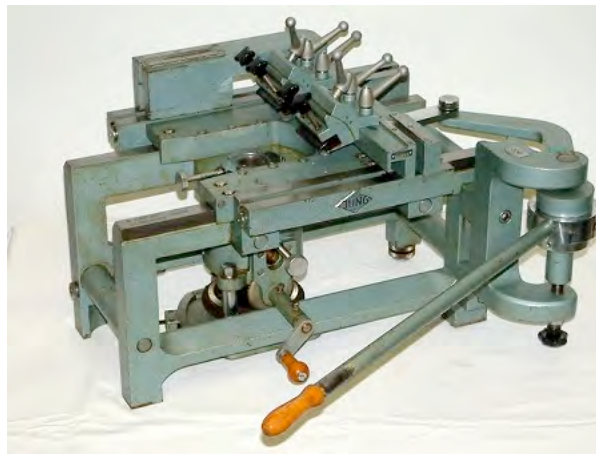


Figura 7: Microtomo Tétrander para órganos enteros y grandes piezas.

c) Microtomo tipo Tétrander (Figura 7):

Es una variante del anterior y se usa para la obtención de grandes cortes, procedentes de piezas voluminosas (cerebro entero, riñón entero, etc.).

C) Microtomos para bloques de resinas y plásticos (Ultramicrotomo):

Cuando los cortes que se obtienen están por debajo de los 100 nm se habla de **cortes ultrafinos** y se usan en microscopía electrónica de transmisión. Los cortes de 0,5-2 μ m se denominan **cortes semifinos**. Ambos tipos, se obtienen con micrótomos de alta precisión o **ultramicrotomos** (Figura 8A), a partir de material incluido en resinas sintéticas o en plásticos. El ultramicrotomo, es una transformación del micrótomos tipo Minot con importantes mejoras. Entre ellas, el fino avance térmico del portamuestras hacia la cuchilla, lo que permite obtener cortes ultrafinos. El movimiento del portamuestras es automático y en general todo el instrumento está finamente monitorizado. Dado el pequeño tamaño de las piezas la observación de los cortes se controla mediante una lupa estereoscópica.

A



B



Figura 8: A) Ultramicrotomo de la casa Leica. B) Vibratomo Leica VT1000 S

D) Vibratomos:

El vibratomo (Figura 8B) es una forma de micrótomos que nos permite obtener finas rodajas de tejido tanto fresco como fijado. En este caso la pieza no debe ser incluida ni congelada. La cuchilla va penetrando en el tejido gracias a una vibración controlada de aquella. De esta manera se pueden obtener finas rodajas de tejidos frescos, mantenidos "vivos" mediante líquidos fisiológicos, lo que permite realizar estudios "in vitro" como: registros electrofisiológicos, estudios bioquímicos y moleculares, etc. Igualmente permite una mejor preservación molecular y estructural del espécimen al no ser congelado, fijado ni incluido. Es ampliamente utilizado en estudios inmunohistoquímicos.

3.3. Cuchillas para la obtención de cortes de microscopía óptica:

Las cuchillas de los micrótomos son un elemento fundamental en la microscopía y presentan una gran variedad de variedades atendiendo al tipo de material a cortar, al tipo de microscopio utilizado y a otros aspectos relacionados con la práctica habitual del laboratorio (económicos, funcionales, preventivos, etc.). Dentro de las cuchillas de micrótomos podemos encontrar las siguientes variedades:

A) Cuchillas desechables (Figura 9A):

Son las que más se utilizan en la actualidad. Como su nombre indica se trata de cuchillas que o bien una vez utilizadas son eliminadas o tras un pequeño número de usos.



Figura 9: A) Cuchillas desechables para microtomo. B) Cuchilla permanente

B) Cuchillas permanentes (Figura 9B): Son cuchillas de acero que a diferencia de las anteriores, tras una larga serie de cortes, se pueden afilar y volver a utilizar, así por muchos años. Existen cuatro tipos básicos de cuchillas para los micrótomos empleados en la obtención de cortes de microscopía óptica (Figura 10):

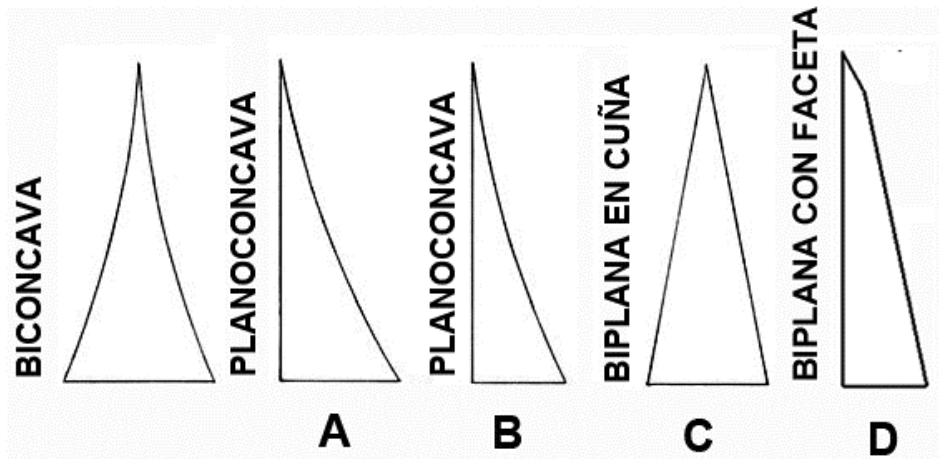


Figura 11: Tipos de cuchillas para la obtención de cortes de microscopía óptica. En el texto se recogen sus aplicaciones.

a) Bicóncava en ambas caras (Figura 10):

Para cortar bloques de parafina blanda en el micrótomos de balanceo o de rotación.

b) Planocóncavas (Figuras 10A y 10B):

Dentro de este grupo hay dos variantes de **tipo A y B**, según sea mayor o menor el grado de concavidad de la cara no plana. La de tipo A se emplea para cortar bloques de parafina en el micrótomos de deslizamiento, mientras que las de tipo B se utilizan para cortar bloques incluidos en celoidina.

c) Biplanas en cuña (Figura 10C):

También denominadas en cuña o de **tipo C**. Se emplean indistintamente para realizar cortes de criostato o cortes de parafina con el micrótomos de tipo Minot. De los cuatro, es el tipo más utilizado.

d) Biplana con faceta o chaflán (Figura 10D):

Llamada también con faceta o de tipo D. Se emplea sobre todo para cortar tejido congelado con el micrótomos de congelación (con gas carbónico), o cuando el material a cortar es muy duro. En este tipo de cuchillas se puede distinguir más claramente (Figura 11) los ángulos de la cuchilla: el **ángulo $\alpha 1$** , formado por la prolongación de los planos de ambas caras, con un valor en torno a los 20 grados, el ángulo de bisel o chaflán (**ángulo α**), formado por la convergencia de las caras que determinan el filo de la cuchilla. Este ángulo es algo

mayor y puede variar según el tipo e intensidad del afilado, siendo un valor óptimo el situado entre 27 y 31 grados y, finalmente, el ángulo formado por el eje de la cuchilla y la superficie de corte, recibe el nombre de **ángulo β** (Figura 11).

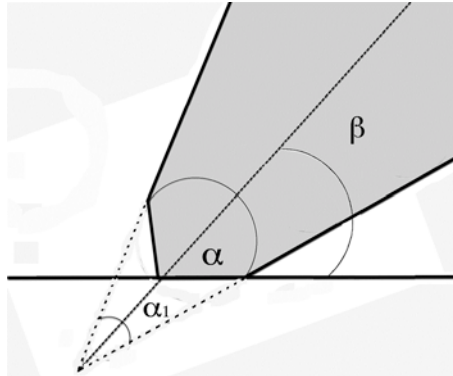


Figura 11: Principales ángulos las de cuchillas empleadas en la obtención de cortes para microscopía óptica. El ángulo α_1 es el formado por las dos caras de la cuchilla. El ángulo α es el formado por las dos facetas que determinan el filo de la cuchilla. El ángulo β es el establecido entre el eje de la cuchilla y la superficie de corte (línea horizontal en el dibujo).

3.4. Cuchillas para la obtención de cortes de microscopía electrónica:

Las cuchillas convencionales para los ultramicrotomos son de vidrio (Figura 12-1) o de diamante (Figura 12-2A). Dado que las técnicas de microscopía electrónica son muy especializadas aquí solamente comentaremos los aspectos más relevantes.

Tanto en las cuchillas de vidrio como en las de diamante, el filo de corte es muy pequeño, de apenas unos milímetros. En el caso de las de vidrio (Figura 12-1E), alrededor del filo se coloca una **cinta flexible** para construir una pequeña **piscina** que se llenará de agua para recoger los cortes (semifinos o ultrafinos) producidos. Las piscinas también pueden ser de plástico. Las cuchillas de vidrio se construyen en el propio laboratorio fracturando barras de vidrio (Figura 12-1A) con un aparato especial (maquina de hacer cuchillas). Actualmente también existen en el mercado cuchillas de tungsteno (Figura 12-2B), mucho más duraderas que las de cristal y más baratas que las e diamante.

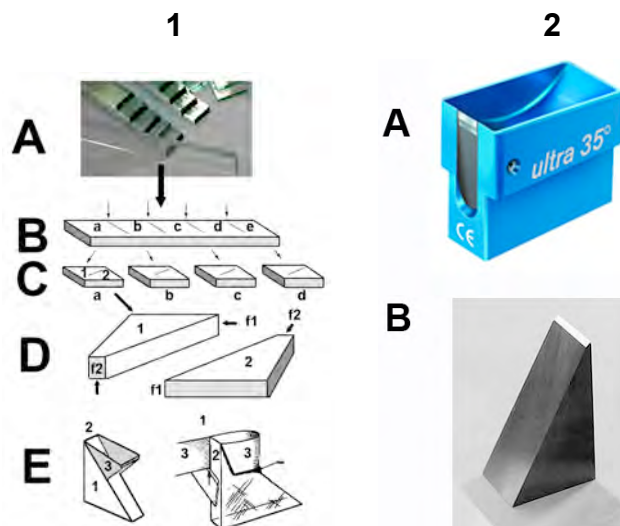


Figura 12: (1) Proceso de construcción de cuchillas de vidrio. A partir de barras de vidrio (1A y 1B) y con ayuda de una maquina de hacer cuchillas, aquellas son fracturadas en varios fragmentos cuadrados (1B) que a su vez se fracturan en sendas cuchillas triangulares (1C y 1D) a las que se les añade la "piscina" (número 3 en 1E). Cada cuchilla tiene solo un filo bueno (f1 en 1D) para cortar. (2ª). Cuchilla de diamante. (2B) cuchilla de tungsteno.

Las cuchillas de diamante (Figura 12-2A) vienen construidas de fabrica. Básicamente es un soporte metálico, con piscina incluida, en la que se encuentra pegada una minúscula cuchilla de diamante artificial. Habitualmente los cortes semifinos se realizan con cuchillas de vidrio que tienen muy corta duración, aunque son más baratas. Los cortes ultrafinos se realizan

con cuchillas de diamante que son mucho más caras aunque más duraderas.

3.5. Otros sistemas de corte:

Además de los descritos existen otros sistemas de corte del material estudiado por la histología pero de escasa aplicación en nuestros medios. Entre ellos podemos destacar el **microtomo de sierra** para cortar materiales muy duros como el diente y el hueso. Con el se pueden obtener cortes a partir de 30 μm .

Otro microtomo interesante es el **microtomo láser** con el que se pueden obtener cortes entre 10 y 100 μm .

4. OBTENCIÓN DE CORTES A PARTIR DE BLOQUES DE PARAFINA

Una vez incluido el material y realizados los bloques se puede pasar a obtener los cortes. Este procedimiento, es diferente en material incluido en parafina que en piezas incluidas en resinas o plásticos para su observación con el microscopio electrónico de transmisión (Figura 13). Dado que las técnicas de microscopía electrónica son demasiado especializadas para los objetivos de estas prácticas, dedicaremos este apartado únicamente a describir brevemente la obtención de cortes de parafina.



Figura 13: (a) Obtención de cortes seriados de bloques de parafina. (b) Obtención de cortes seriados de bloques de resinas o plásticos. Obsérvese que las tiras de cortes flotan en la superficie del agua de la piscina y que son "pescados" con una rejilla metálica de 3 mm de diámetro.

4.1. Principales etapas en el proceso de obtención de cortes:

Las descripciones que siguen son a modo orientativo y su clara exposición se vera de manera práctica en el laboratorio.

A) Retallado del bloque:

Consiste en eliminar el exceso de parafina que rodea a la pieza incluida que vamos a cortar. Una vez retallado, se puede guardar en un frigorífico a 4° C, nunca a temperaturas inferiores a 4°C pues la parafina cristalizaría y los cortes saldrían defectuosos.

B) Fijación al portabloques:

En la actualidad, los bloques se realizan sobre soportes de plástico. Si no se dispone de este sistema se pueden montar sobre soportes metálicos o de madera con superficie estriada. Para la adhesión entre el bloque y el soporte se utiliza parafina líquida.

C) Colocación del bloque y portabloque en el microtomo:

Una vez colocados en el brazo del micrótopo, se orienta la pieza, de tal suerte que el filo de la cuchilla esté paralelo a la superficie del bloque.

D) Orientación de la cuchilla:

Antes de comenzar a cortar, se orienta bien la cuchilla micrótopo y se devasta



el bloque (se realizan una serie de cortes gruesos seriados hasta que empieza a cortarse la muestra). Para ello hay que tener en cuenta la existencia de cuatro ángulos de control de la incidencia del bloque sobre la cuchilla: ángulo de inclinación ($I = 10-15^\circ$), ángulo de libre ($L = 5-8^\circ$), ángulo de corte ($C = 60^\circ$) y ángulo arrastre ($L =$ complementario del ángulo de corte).

E) Selección del espesor de corte:

Entre 4 y 6 μm

F) Realización y obtención de las secciones

7) Estirado de los cortes y confección de las preparaciones

8) Secado de las preparaciones:

En estufa a 37°C durante 24 horas o a 60°C durante 10 a 20 minutos.

4.2. Problemas en la obtención de cortes a partir de bloques de parafina:

En general derivan de una mala orientación de la cuchilla, por lo tanto lo más importante es aprender a orientar la cuchilla. Sin embargo podemos hacer, desde un punto de vista metodológico, los siguientes grupos de problemas:

A) Defectos de los instrumentos:

- a) De la cuchilla (mal afilado, mala orientación, ...)
- b) Del microtomo (estropeado, de baja calidad, ...)

B) Defectos del bloque:

- a) Mala inclusión
- b) Material muy duro

C) Defectos ambientales:

- a) Altas temperaturas
- b) Vibraciones, ...)

5. ACTIVIDADES A REALIZAR EN EL LABORATORIO:

5.1. Visionado y análisis de un video sobre la inclusión y corte de las muestras.

5.2. Inclusión de una muestra histológica fijada:

El alumno, siguiendo las instrucciones del profesor, realizará una **inclusión ultrarápida** de la muestra fijada por él, en la práctica anterior. Para ello seguirá los pasos del protocolo adjunto en el ANEXO.

El alumno tomará nota de los procedimientos realizados y dibujará aquellos aspectos de la pieza incluida que considere de interés para su posterior observación a través del microscopio.

5.3. Visita a los laboratorios de investigación del Departamento:

En este recorrido, el alumno podrá conocer en directo los diferentes tipos de microtomos empleados en la técnica histológica.

5.4. Trabajo independiente del alumno :

Una vez terminada la práctica, con ayuda bibliográfica, el alumno realizará en su portafolios, una breve descripción de sus actividades en la practica, especialmente de los siguientes puntos: a) procedimiento de inclusión, procedimiento de corte, c) dudas y sugerencias.



ANEXO

TECNICA ULTRA-RAPIDA PARA INCLUSION EN PARAFINA *

(1) Tallar la pieza con el bisturí o una hoja de afeitar, obteniendo cortes muy finos de espesor (1 mm aproximadamente).

2) Introducir las piezas en un frasco con agua y lavar durante **3 minutos**. Con una pipeta Pasteur extraer el agua y repetir este pase dos veces más, es decir la pieza deberá permanecer un total de **9 minutos** en agua. A partir de este momento la pieza permanecerá en éste frasco del que se extraerán y se le añadirán los correspondientes líquidos.

3) Extraer el agua con una pipeta Pasteur. Con una pinza, extraer la pieza del frasco y secarla suavemente con papel de filtro. Introducirla de nuevo en el frasco y añadirle alcohol de 70 durante **5 minutos**.

4) Con una pipeta Pasteur extraer el alcohol de 70 y añadir alcohol de 90 en el que la pieza permanecerá durante **5 minutos**.

5) Con la pipeta Pasteur extraer el alcohol de 90 y añadir alcohol de 96 en el que la pieza permanecerá durante **5 minutos**. Repetir este pase dos veces más, es decir la pieza deberá permanecer un total de **15 minutos** en alcohol de 96.

6) Con la pipeta Pasteur extraer el alcohol de 96 y añadir alcohol de 100 en el que la pieza permanecerá durante **5 minutos**. Repetir este pase dos veces más, es decir la pieza deberá permanecer un total de **15 minutos** en alcohol de 100.

7) Con la pipeta Pasteur extraer el alcohol de 100, del último paso y añadir benzol o xilol en el que la pieza permanecerá durante **5 minutos**. Realizar este pase una o dos veces más hasta que la pieza aparezca translúcida (diafanización).

8) Con la pinza, extraer la pieza del frasco e introducirla en los pocillos con parafina fundida y colocarlos en la estufa hasta el momento de hacer los bloques en la siguiente práctica (**24 h**).

9) Tras un periodo de tiempo entre 1 y 24 horas, extraer las piezas de la parafina (calentar previamente a la llama las puntas de la pinza para que no se solidifique la parafina) y realizar los bloques que deberán dejarse reposar hasta que se solidifiquen totalmente.

*En condiciones normales las inclusiones son mucho más largas aunque los tiempos óptimos, varían de un tipo de pieza a otra. Para hacer una buena inclusión los tiempos empleados son mucho más largos, del orden de 2 horas en cada pase de alcohol. En el alcohol absoluto es donde más tiempo deben estar. En el benzol o el xilol deben realizarse dos pases de unos 20 minutos cada uno. En la parafina conviene hacer dos pases: uno de 6 horas, en parafina blanda y otro de 12 a 24 en parafina dura.