HISTOLOGIA: METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

TECNICAS **HISTOLOGICAS**

Dra. Carolina Vadillo
Cátedra II - Histología y Embriología
Cursado 2019

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

DEFINICION:

Se denomina Técnicas histológicas a una serie de operaciones a que se somete una materia organizada, a fin de que sea posible su estudio por medio del microscopio, posibilitando la observación de estructuras no visibles al ojo humano.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Metodología de estudios:

- Examen inmediato
  o in vivo.

- Examen mediato
  o post-mortem.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

-Examen inmediato o in vivo:

1) Al estado fresco.
2) Examen con coloración vital.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

-Examen mediato o de post-mortem:

Este es el método que se utiliza en forma universal, el cual es interpretado de la misma forma en todos los laboratorios y exige la muerte de las células para ser estudiadas.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Pasos de la Técnica Histológica Corriente

1)Obtención del Material Biológico.
2)Proceso de Fijación.
3)Proceso de Inclusión.
4)Obtención de Cortes.
5)Proceso de Coloración.
6)Montaje Final.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

1)Obtención del Material Biológico.

-Biopsias quirúrgicas.
-Material obtenidos de necropsias.
-Utilización de animales de laboratorio.
-Estudios experimentales en animales o vegetales.
-Frotis o extendidos.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

1)Obtención del Material Biológico:

-Biopsias : es la forma mas frecuente, de obtener las muestras para ser estudiadas. Se toma un fragmento de tejido u órgano de un ser vivo.

Puede ser: incisional ,excisional, por sacabocado, por punción y absorción, por raspado por trepanación.-

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

2)Proceso de Fijación:

Este método trata de interrumpir el desarrollo de los procesos orgánicos fijando y conservando de la manera mas semejante al estado en que se encontraban los tejidos en vida.
Si no se actúa rápido la materia puede sufrir los procesos de post-mortem(autolisis-putrefacción).

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Clasificación de los fijadores:

- **Químicos**
  - **-Simples**
    - formol al 10%(+++++)
    - glutaraldehido(M.E.)
    - acetona
    - tetroxido de osmio (M.E)
    - alcohol absoluto, etc
  - **-Compuestos o mezclas fijad.**
    - liq. de fleming
    - liq. de zenker
    - liq.de Bouin

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

FIJADORES

Dentro de los fijadores el mas utilizado es el Formol, que es un fijador simple.
En el comercio se lo obtiene al 40%.

Formol: se emplea en solución al 10%
(es decir se debe diluir 10 partes de formol y 90 partes de agua).

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Clasificación de los fijadores:

FISICOS

- **-Desecación.(Tec.bioquímicas)**
- **-Calor seco y calor húmedo.**
- **-Frio**
- **-Congelación y desecación.**

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

REGLAS PARA UNA BUENA FIJACION

-El material debe ser cortado en pequeños y delgados trozos para facilitar la penetración del liquido fijador.

-La relación del volumen entre el objeto a fijar y el fijador debe ser de 1 a 20.

-El material biológico debe estar en total contacto con el fijador.

-El tiempo de fijación varia, en promedio con 24 hs es suficiente.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

3) Proceso de Inclusión:

Para obtener cortes delgados y uniformes es necesario que las piezas adquieran una dureza determinada .

Los cortes pueden ser obtenidos por dos procedimientos fundamentales:

-a) Previa congelación del material.

-b) Previa inclusión del material en parafina.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

3) Proceso de inclusión:

El método por excelencia es la **inclusión en parafina.**

Los medios o sustancias de inclusión pueden ser : Solubles en agua (celoidina-gelatina-etc) o Insolubles en agua (parafina).

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

3) **Proceso de inclusión**:

Dado que se utiliza Parafina , que es insoluble en agua , requiere de la previa extracción de la misma del material a procesar.

Por lo tanto la inclusión costa de los siguientes pasos: _____

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

3) Proceso de Inclusión:

-DESHIDRATACION del material.

-ACLARACION del material.

-IMPREGNACION EN PARAFINA del material

-CONFECCION DEL TACO O BLOQUE.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

DESHIDRATACION:

-En este paso se trata de extraer el agua de todo el tejido para que la parafina ocupe su lugar.

-Se utilizan alcoholes en concentración crecientes: 70º-80º-96º-100º.(1/hora en c/ alcohol).

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

ACLARACION:

Luego de deshidratada la pieza , se coloca en un liquido llamado Intermediario (por la propiedad
de disolver la parafina).
Líquidos intermediarios: cloroformo, toluol, xilol y benzol.
El tiempo varia según la sustancia usada y el tamaño de la pieza, entre 1 y 3 hs.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

IMPREGNACION EN PARAFINA:

-La parafina se encuentra en estado solido.
-Su punto de fusión varia entre 45º a 60º.
-Las piezas luego de ser aclaradas se colocan en estufa en una mezcla de parafina liquida y líquido intermedio durante 1 hora, y luego pasan a parafina sola durante 4 horas, por lo menos, para que el material se impregne totalmente .

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

CONFECCION DEL TACO:

-Luego de los pasos realizados anteriormente viene la inclusión definitiva de la pieza para posteriormente realizar los cortes y la coloración.
-Se utilizan moldes especiales de metal llamados: barras de Leuckart, donde se vierte parafina líquida a 60º C.
Allí se coloca la muestra orientándola para realizar el corte adecuado.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

4) Obtención de los cortes

-MICROTOMOS

- -DESLIZAMIENTO
- -TETRANDER
- -DE PARAFINA TIPO MINOT
- -ULTRAMICROTOMO
- -CRIOTOMO.

MATERIAL EN PROCESO DE CORTE CON MICROTOMO



HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

-MONTAJE DEL CORTE.

-PORTAOBJETOS EN ESCALERILLAS SE COLOCAN EN LA ESTUFA PARA MEJORAR SU FIJACION.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

5) Proceso de coloración

-Es el proceso por el cual un cuerpo toma color bajo la acción de un colorante y no desaparece con continuos lavados.
-Las estructuras biológicas de los preparados histológicos tienen poco contraste y esto no permite que se vean en el microscopio.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

5) Proceso de coloración

COLORANTES:

Son todas aquellas sustancias que pueden comunicar su color a otro cuerpo.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

5) Proceso de coloración

CLASIFICACION DE COLORANTES.

1-Naturales -Animales -Carmin

-Vegetales -Hematoxilina

-Orceina

-Azafran

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

CLASIFICACION DE COLORANTES.

2-Artificiales -Acidos: sales con base incolora y acido coloreado.

Ej. EOSINA.

-Básicos: sales con base coloreada y acido incoloro.

Ej.AZUL DE METIL.

-Neutros: sales con base y acido coloreados.

Ej.EOSINATO DE AZUL DE METILENO.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

CLASIFICACION DE COLORANTES.

3-Indiferentes:

-No forman sales.
-Tiñen aquellas sustancias que tienen poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante.
Ej. Sudan III, Rojo escarlata.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

CARACTERISTICAS DEL MATERIAL BIOLOGICO.

-Sustancias basófilas .
-Sustancias acidófilas.
-Sustancias neutrófilas.
-Sustancias azurófilas.
-Sustancias osmiófilas.
-Sustancias argirófilas.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

La técnica por excelencia utilizada para coloración de preparados histológicos es la que se realiza con:

HEMATOXILINA Y EOSINA.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Procedimientos para colorear la muestra:

a) Desparafinización e hidratación del corte. (benzol o xilol-alcohol decreciente 100º-96º-80º-70º-agua destilada).
b) Coloración propiamente dicha. Hematoxilina-virado en agua corriente-eosina-virado en agua y luego se continua con el ultimo paso de la técnica:

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

6) Montaje final:

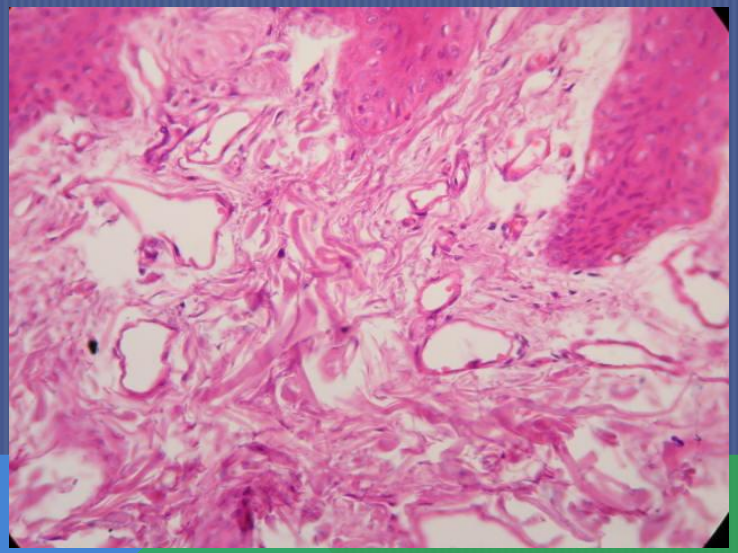
Al terminar la coloración ,el preparado queda totalmente hidratado y debe ser deshidratado

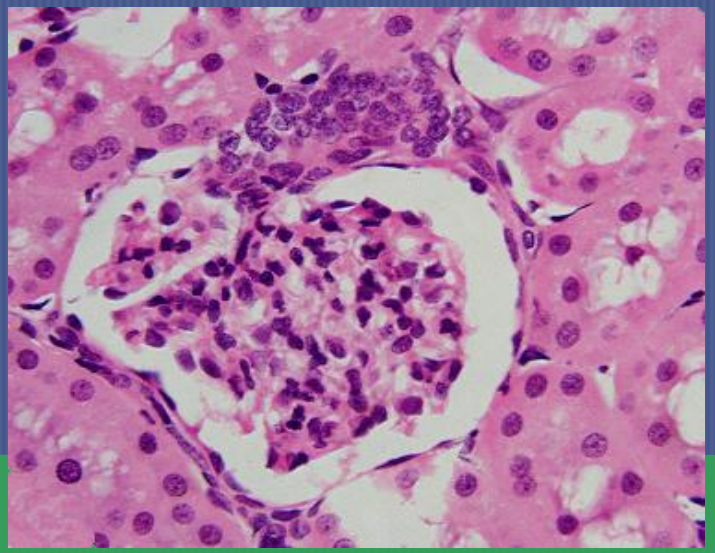
a)Deshidratación: alcoholes en forma creciente, 70º-80º-96º-100º.

b)Homogenización o aclaración: benzol o xilol.

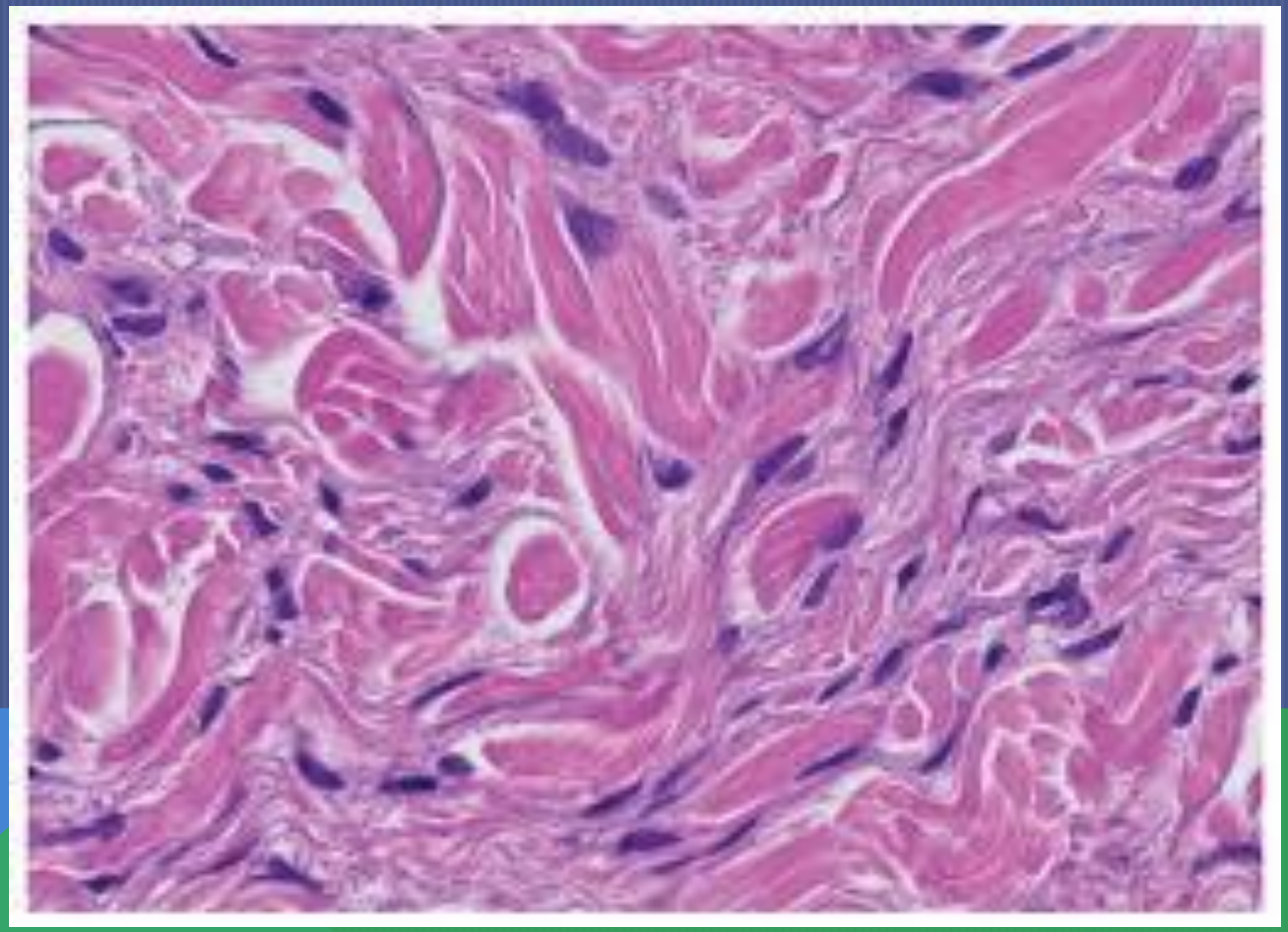
c)Colocación de cubreobjetos.

COLORACION CON HEMATOXILINA/EOSINA TEJIDO CONECTIVO Y GLOMERULO RENAL.

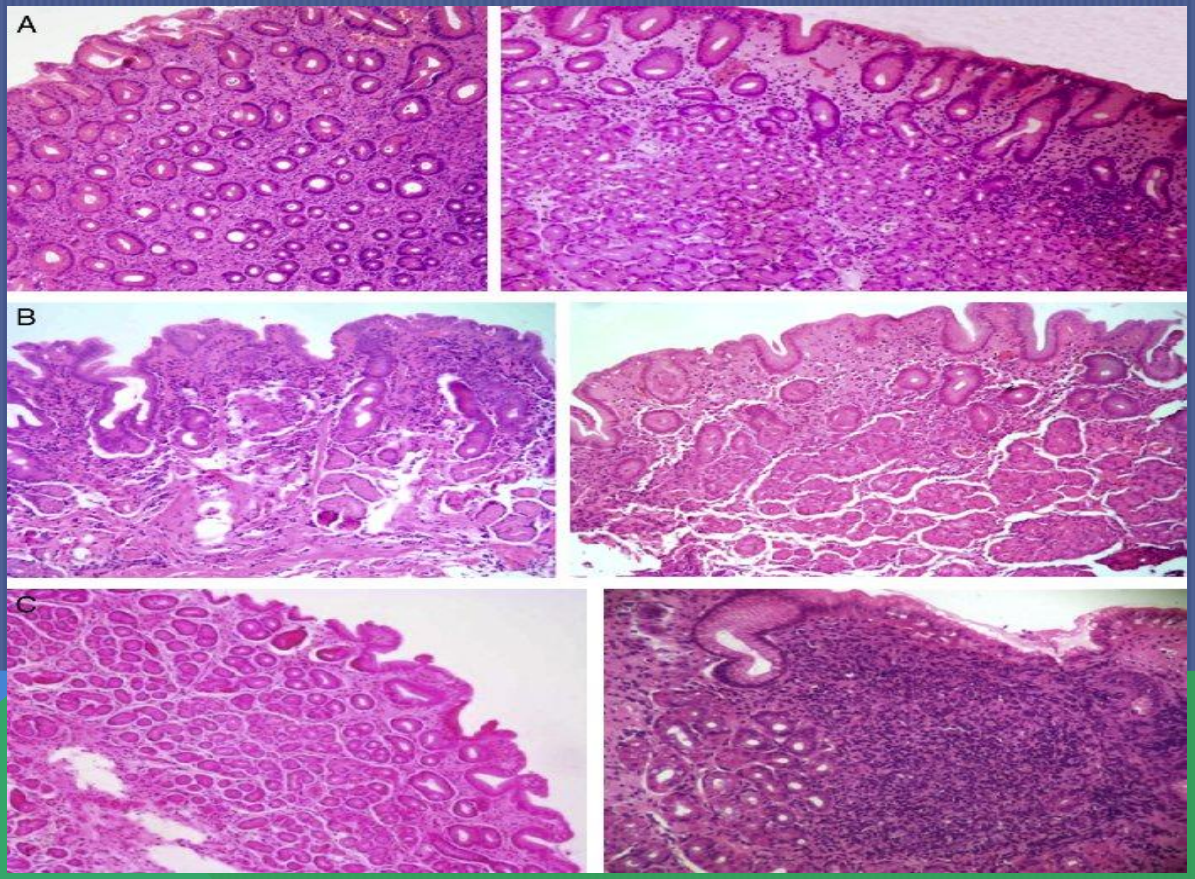




TEJIDO CONECTIVO: HEMATOXILINA/EOSINA



MUCOSA GÁSTRICA TEÑIDA CON HEMATOXILINA/EOSINA

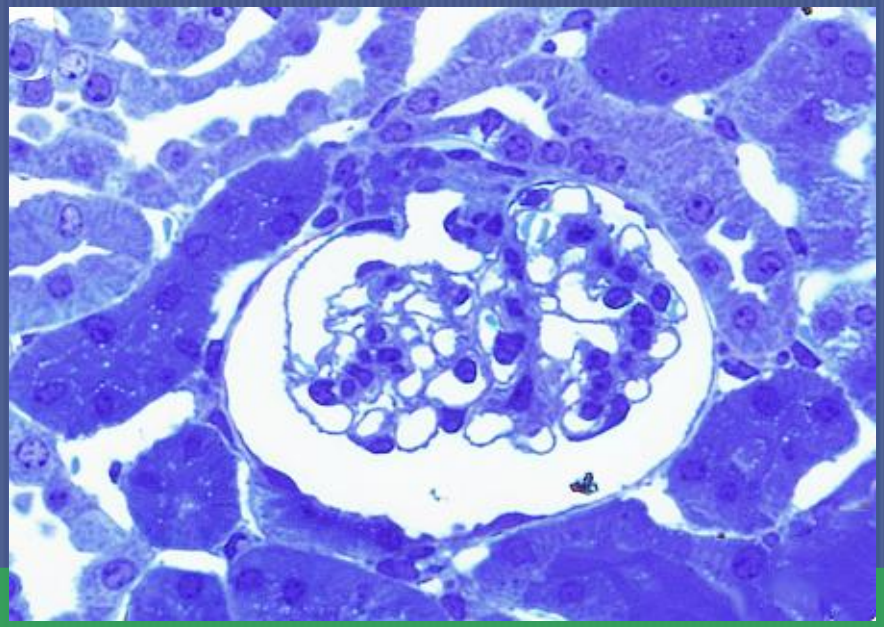


HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

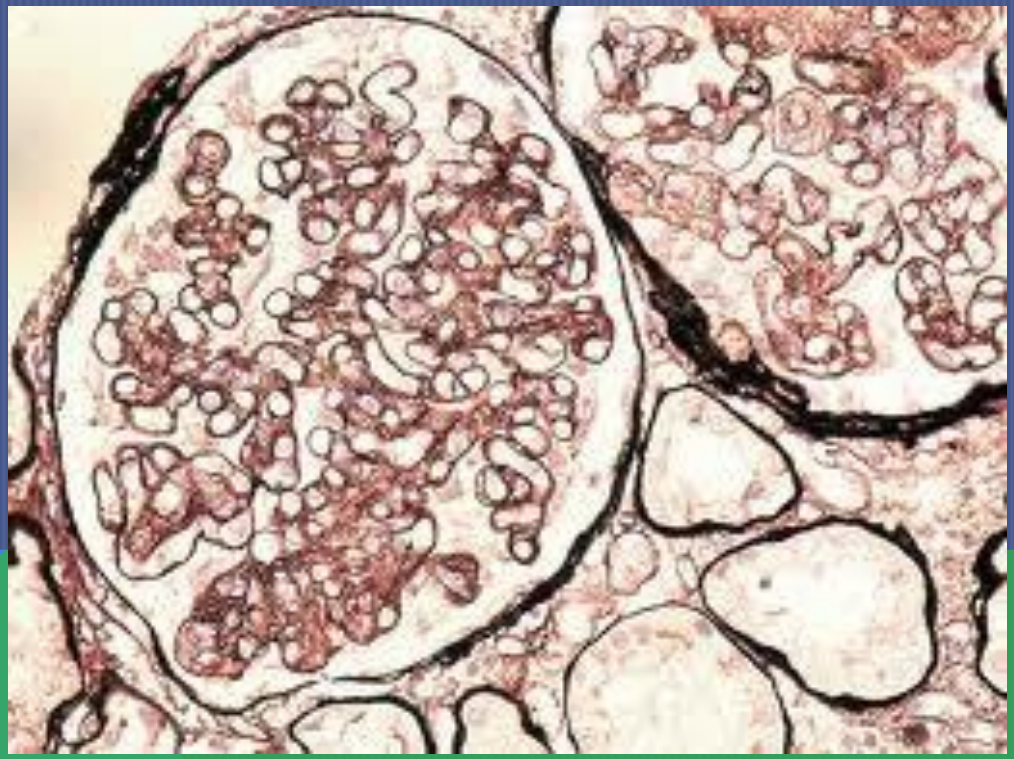
Coloraciones especiales:

-Técnica de Papanicolaou.
- “ Tricrómica de Masson.
- “ de Impregnación Argéntica.
-Coloración de May Grumwald Giemsa.
-Sudan III.

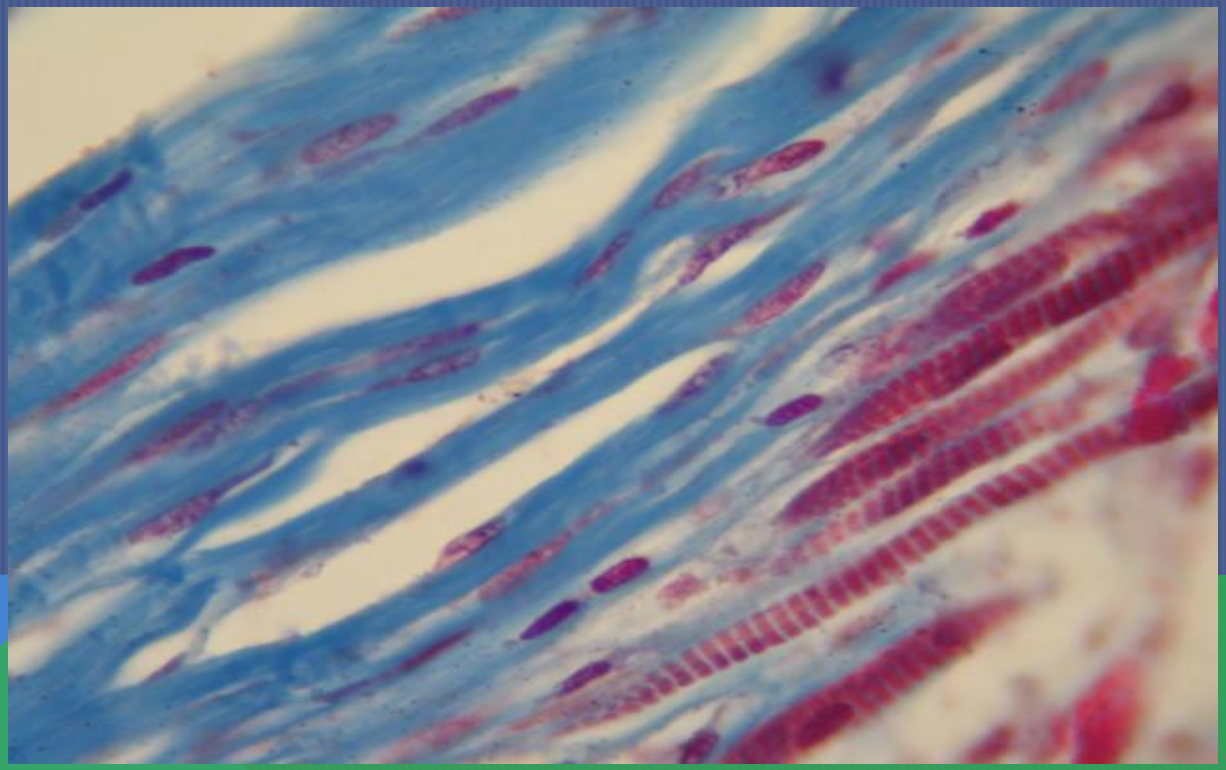
GLOMÉRULO RENAL TEÑIDO CON AZUL DE TOLOUDINA



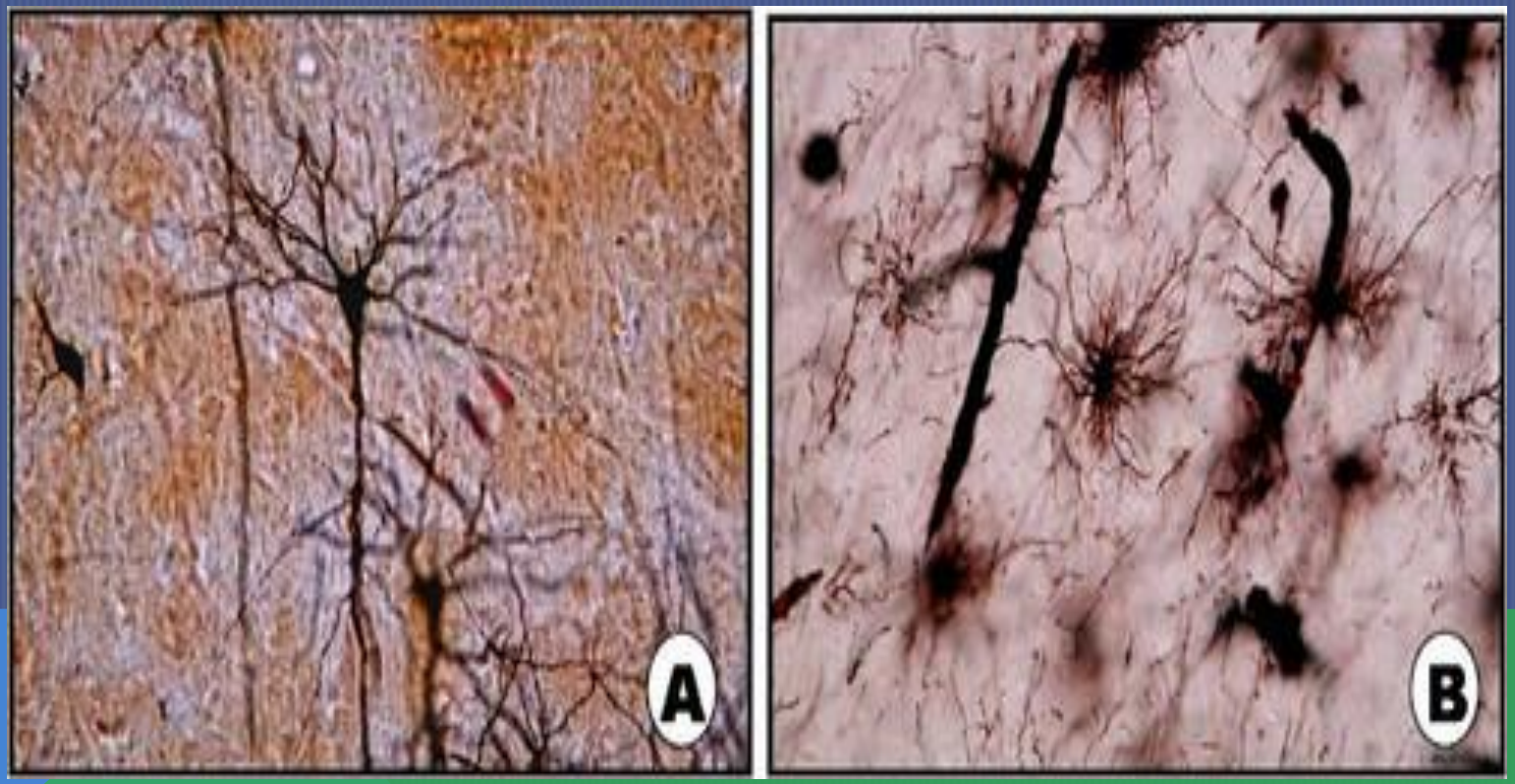
GLOMERULO RENAL – PLATA – METENAMINA PARA MEMBRANA BASAL



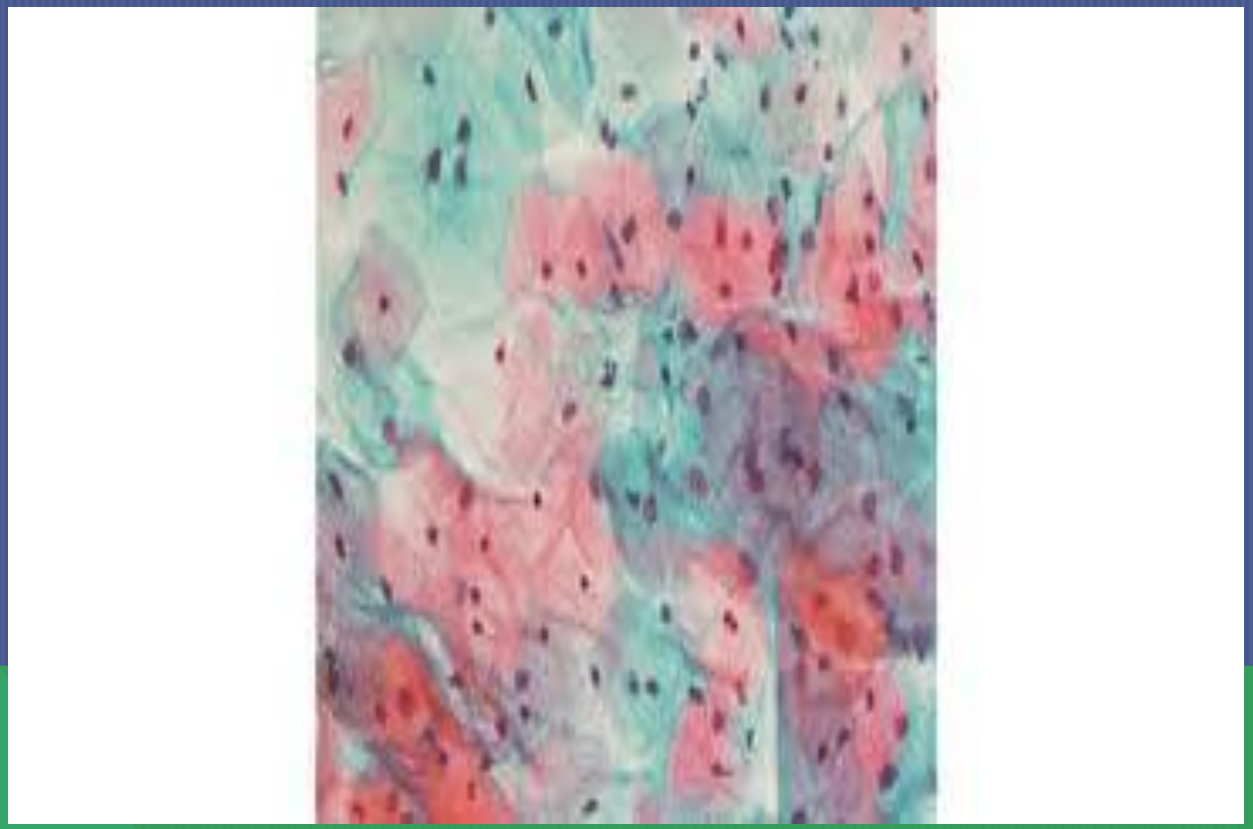
TEJIDO CONECTIVO : COLORACIÓN DE TRICROMICA DE MALLORY PARA FIBRAS DE COLAGENO.



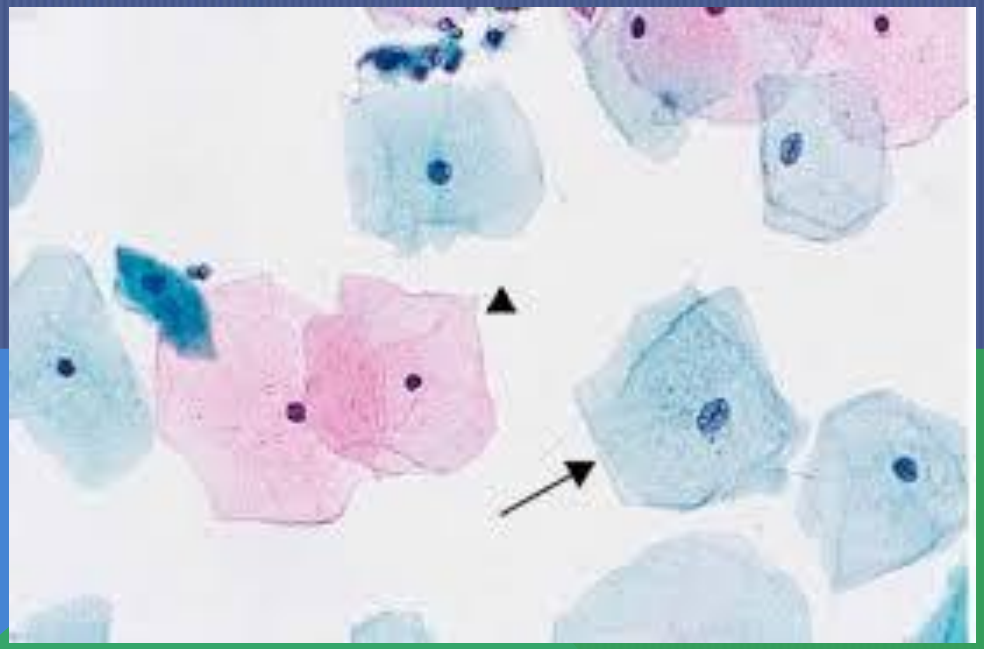
SISTEMA NERVIOSO- IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA



TECNICA DE PAPANICOLAOU-CITOLOGIA EXFOLIATIVA GINECOLOGICA

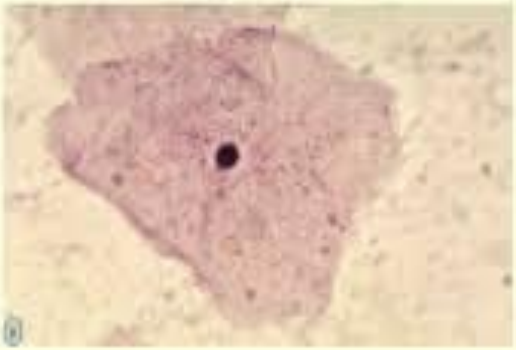


TECNICA DE PAP- CELULAS EPITELIALES DE CUELLO UTERINO

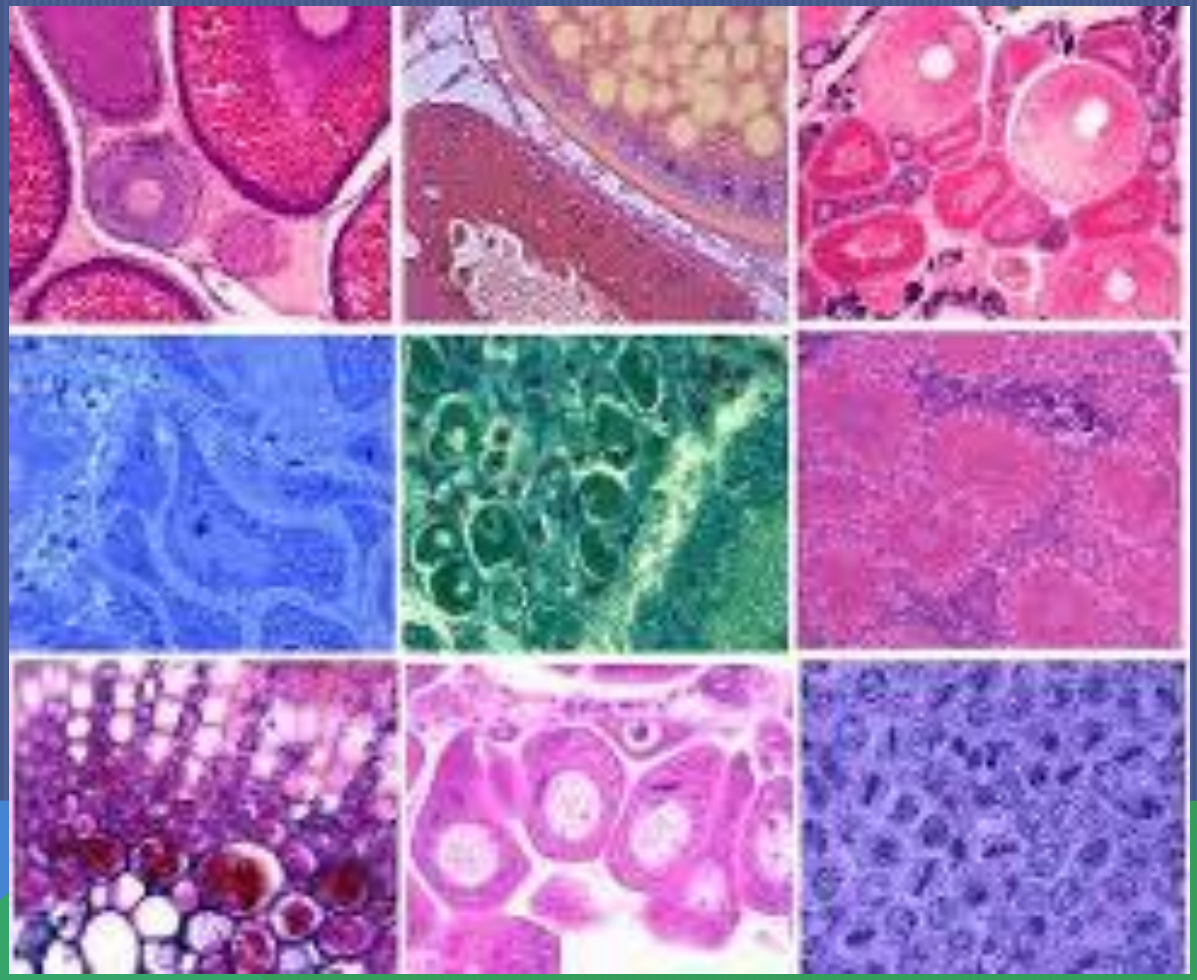


CITOLOGÍA EXFOLIATIVA CERVICAL

- Células superficiales. Poligonales, delgadas, grandes, citoplasma claro y transparente, sin pliegues, núcleo pequeño y denso, picnótico.
- Las más superficiales son eosinófilas y las más profundas cianófilas. No son cornificadas.



COLORACIONES ESPECIALES DE DIFERENTES TEJIDOS



ATENCIÓN !!!!!!!!!!!!



HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

Tecnicas de Preparación para Microscópio Electrónico.

-Muestra: fragmento menores a 2 mm.
-Fijador: Glutaraldehido. Tetroxido de Osmio.
-Impregnación: resina epoxi.
-Corte: ultramicrótomo .Grosor:0,1um.
-Coloración: metales pesados.
-Uso: morfología subcelular -ultraestructuras.

HISTOLOGIA:METODOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGIA

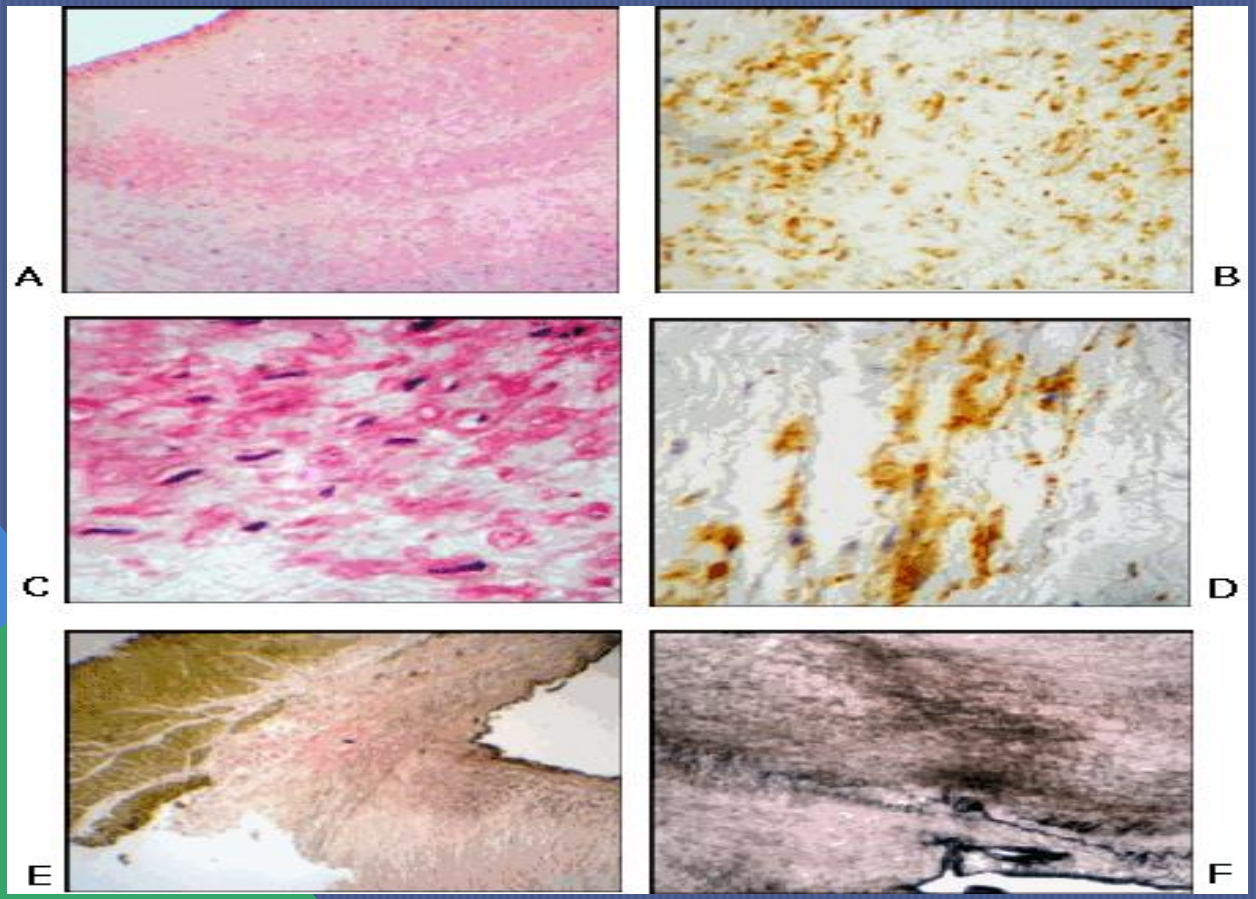
Métodos Inmunohistoquímicos

-La Inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que revela la existencia de distintas proteínas en las muestras de tejidos, las cuales nos permiten conocer no sólo el origen o el linaje de diferentes células, sino también su funcionalismo.

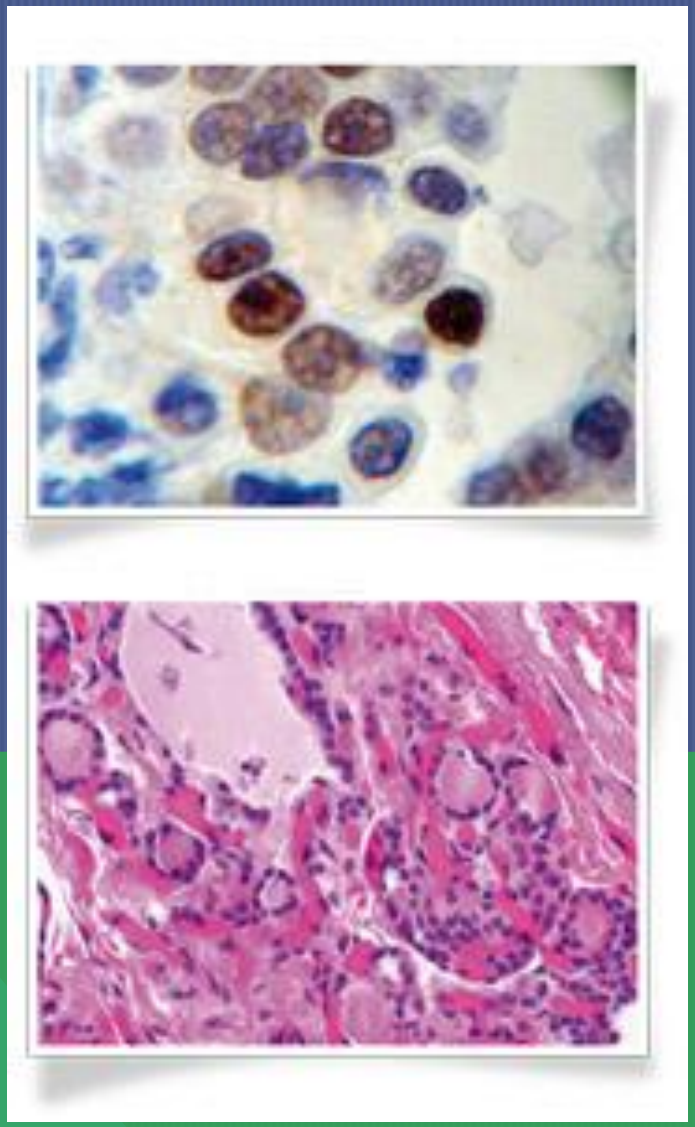
PARA QUE SE UTILIZA?

-DIAGNOSTICO DIFERENCIAL DE NEOPLASIAS.
-METASTASIS DE ORIGEN DESCONOCIDO.
-TIPIFICACION DE LINFOMAS
-RECEPTORES HORMONALES Y DETECCION DE ONCOGEN EN CANCER DE MAMA.
-MARCACION DE TEJIDOS ESPECIFICOS, PARA ESTUDIOS Y TRABAJOS CIENTIFICOS.

TECNICAS DE INMUNOMARCACION- ACTINA MUSCULO LISO Y VIMENTINA PARA FIBROBLASTOS.



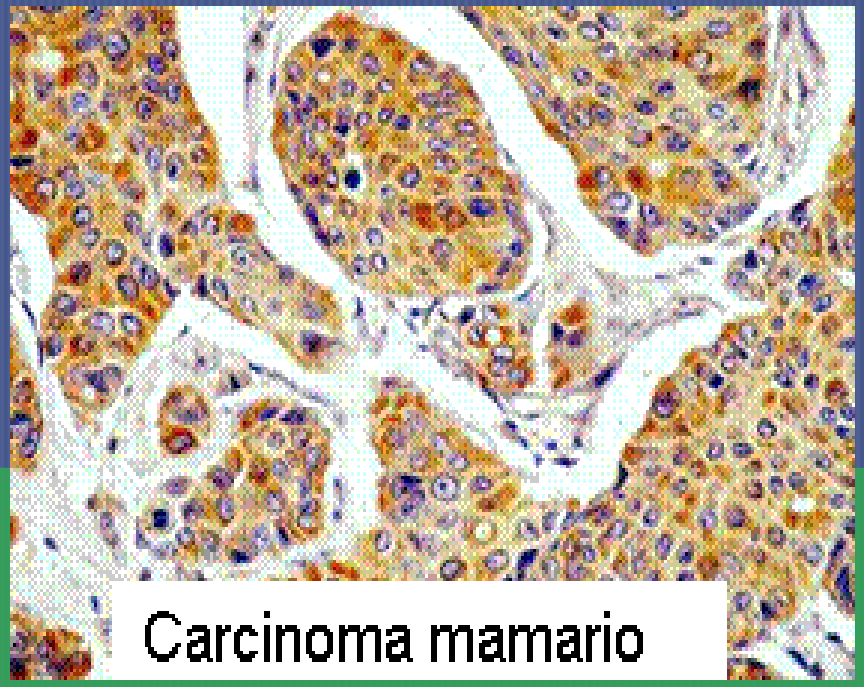
TECNICAS DE INMUNOMARCACION VERSUS TINCION HEMATOXILINA /EOSINA



COLORACION H/E VERSUS INMUNOMARCACION EN CORTE DE TEJIDO MAMARIO.



Teiido mamario normal



Carcinoma mamario

MICROSCOPIO OPTICO

UN MICROSCOPIO ES UN INSTRUMENTO QUE SE UTILIZA PARA AUMENTAR EL TAMAÑO DE UNA IMAGEN Y PERMITE VER MAS DETALLES DE LO QUE SERIA POSIBLE A SIMPLE VISTA.

EN EL CASO DE NUESTRA MATERIA, ES UN ELEMENTO DE SUMA IMPORTANCIA YA QUE ESTUDIAMOS COMPONENTES Y ESTRUCTURAS DE TEJIDOS Y ,ORGANOS NO DETECTABLES POR LA RESOLUCIÓN DEL OJO HUMANO- 0,2MM.


ocular
cabezal
portaobjetivos
brazo
objetivo
tornillo carro móvil
platina
tornillos
macrométrico
diafragma
micrométrico
condensador
tornillo
condensador
base

MICROSCOPIO OPTICO

SISTEMA MECANICO

-BASE O PIE
-BRAZO
-PLATINA
-PINZAS
-TORNILLO MACROMÉTRICO
-TORNILLO MICROMÉTRICO
-REVOLVER
-TUBO

MICROSCOPIO OPTICO

SISTEMA ÓPTICO

-FOCO Y LUZ FUENTE
-CONDENSADOR
-DIAFRAGMA
-OBJETIVOS
- OCULARES



BIENVENIDOS !!!!!!!!!!!!!!!

MUCHAS GRACIAS POR SU ATENCION !!!!!!!!!

CATEDRA II HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA AÑO 2019

DRA.CAROLINA VADILLO