



EMPLEO DE TRES DIFERENTES MEZCLAS DE SOLVENTES, DURANTE EL PROCESO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA DE RUTINA.

Garrido-Fariña German Isauro

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología. Km. 2.5 Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, San Sebastián Xhala Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx CP 54740. Teléfono: 56 23 18 46. E-mail: isaurogafa@yahoo.com.mx



INTRODUCCIÓN

La inclusión en parafina de rutina requiere de la sustitución del alcohol absoluto por un solvente y la infiltración en la parafina [1]. En este estadio de la técnica de inclusión en parafina de rutina (TIPR), se pueden emplear reactivos que terminan con la deshidratación de los tejidos y sirven como solvente de la parafina durante la infiltración [2]. En general se emplean reactivos intermediarios, de enlace o “aclaramentes”, los cuales son miscibles con el alcohol absoluto y son disolventes de la parafina [2, 3, 4, 5, 6]. Los reactivos intermediarios que más se han usado por su eficacia al ser solventes de la parafina, son en general: benceno, tolueno, xileno, éter, cloroformo, acetona, tetracloruro de carbono, salicilato de metilo y esencias naturales como el aceite de cedro [1, 2, 5, 7]. En general todos los reactivos intermediarios, tienen ventajas y desventajas, las esencias naturales que se pueden emplear, no endurecen las piezas, pero no se eliminan completamente de los tejidos, son caras, no se aprecia el aclaramiento y su proceso resulta largo y complicado [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9]. Un reactivo intermediario ideal, deberá tener como características principales: ser miscible con diferentes tipos de alcoholes, disolver a los diferentes medios de inclusión, infiltrar rápidamente cualquier tipo de tejido, desplazamiento homogéneo del alcohol absoluto, aclaramiento observable, suavizar o evitar el endurecimiento de las piezas, permitir que el medio de infiltración lo desplace completamente y que puedan permanecer por tiempo indefinido en el solvente (1, 4, 7).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se midió el tiempo de aclaramiento en muestras para las tres mezclas empleadas, siendo en promedio: XB 40-50 min, XT 40-60 min y XCL 20-40 min, observando mayor velocidad en la última mezcla. El olor de la mezcla XCL no fue perceptible. En el trabajo piloto se observó que las mejores condiciones resultantes sobre las muestras con diferente fijación, fue con la mezcla de XCL. En el trabajo con muestras de ave y diferentes fijadores, aclarando con XCL las variables observadas para cada fijador evidencian que el formol amortiguado presenta un comportamiento más homogéneo y facilita el corte y montaje, figura 4 y 5. El XCL permite infiltrar piezas deshidratadas hasta R-OH de 96° o industrial de 98-99, durante toda la noche o dos horas. Las preparaciones no presentan diferencias con las que se deshidrataron hasta R-OH absoluto, figura 6.

La mezcla de XCL fue empleada con éxito para recuperar muestras que con un proceso deficiente se contrajeron e incluso se separaron de la parafina de su bloque de inclusión, permitiendo hacer de estas muestras, preparaciones permanentes aceptables figura 7.



Figura 1. Constantes en cuatro técnicas de fijación. Se empleó la mezcla XCL, para el TIPR.

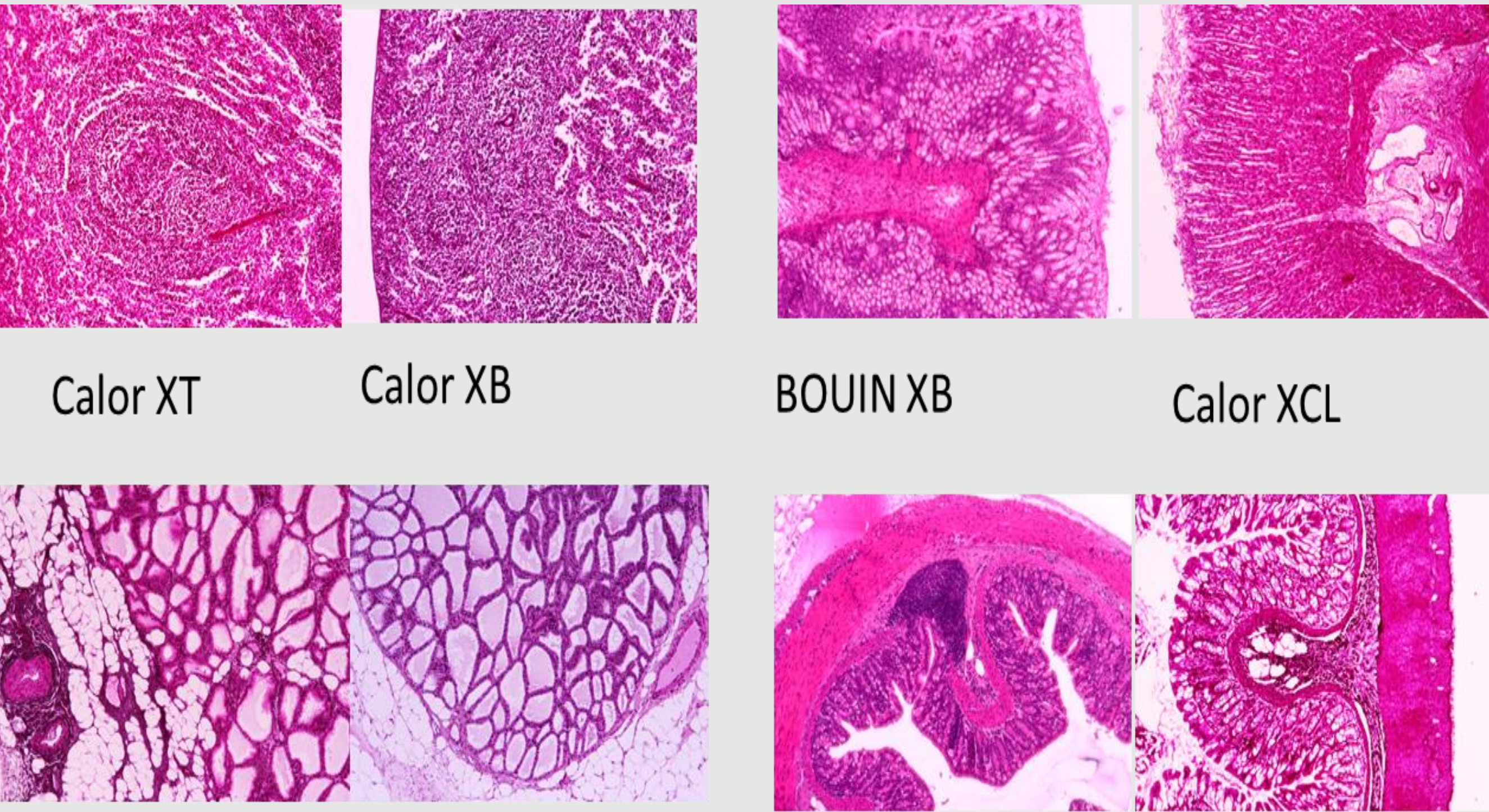


Figura 2. Órganos de Cuyo procesados con diferentes fijadores y mezclas de enlace.

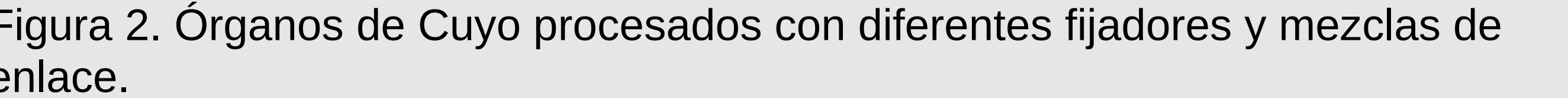


Figura 2. Órganos de Cuyo procesados con diferentes fijadores y mezclas de enlace.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Carleton, H. M.; (1957). Histological technique. 3ª edición Oxford University Press; London; 162pp.
2. Gabe, M.; (1976) Histopathological techniques, Masson, Springer-Verlag; Paris.
3. Sampedro, J. (1952). Técnica Micrográfica y Organográfica Microscópica. 8ª ed.; México; 515 pp.
4. Kingsbury, B.F.; Johannsen, O.A.; (1935). Histological technique; 1a Ed. J. Wilby & Sons.London;142 pp.
5. Krajian, A., A.; Gradwohl, R. B. H.; (1952); Histopathological technic; 2a Ed.Mosby Co. EUA; 361 pp.
6. Mc Manus J.; Mowry R.; (1960). Staining Methods, histologic and histochemical; Hoeber Int.Tokio Japon.
7. Lillie, R. D.; (1954). Histopathologic Technique and Practical Histochemistry. Mc Graw-Hill. EUA.; 501 pp.
8. Martoja, R. y Martoja, M. P.;(1970). Técnicas de Histología Animal. Toray - Masson, España. 350 pp.
9. Stör P. H.; (1890). Manuel technique d'histologie. G. Steinhell Editeur. Paris; 340 p.
10. Carson, F., L. (2015). Histotechnology. A self instructional text. 4ª ed.; ASCP; Singapur; 352 pp.

OBJETIVO GENERAL

Observar durante la TIPR, el comportamiento de tres mezclas de solventes y las consecuencias técnicas de su aplicación en diferentes tejidos.

METODOLOGÍA

Se emplearon las siguientes mezclas de solventes: Xileno-Benceno (XB), Xileno-Tolueno(XT) y Xileno-Cloroformo (XCL), de forma paralela con los procesos de rutina con xileno y monómero de estireno. En el trabajo piloto se aplicaron las tres mezclas en muestras de Cuyo *Cavia porcelus*, dos ejemplares adultos y clínicamente sanos figura 2. Se obtuvieron muestras de los órganos blanco y fueron fijados: con calor, formol amortiguado, Tellyelinsky y Bouin, las cuatro técnicas de fijación se procesaron aplicando las tres mezclas de solventes durante la TIPR. En ave codorniz *Coturnix coturnix*, la fijación se realizó con calor en solución Ringer para ave, formol amortiguado y la mezcla de Bouin y solo se empleó la mezcla de XCL para la TIPR figura 3. Los bloques fueron cortados a 4 µm de grosor, montados de rutina en portaobjetos y teñidos con Hematoxilina-eosina. Durante el corte de las muestras de ave, se observaron las siguientes características del bloque: dureza o resistencia al corte, friabilidad del tejido, elasticidad del corte, higroscopicidad o hidratabilidad del tejido durante el corte, distensión del corte, empleando para la calificación: cero no apreciable, 1 poco, 2 moderado y 3 muy apreciable figura 1. También se observó la duración del olor de los solventes en el tejido a lo largo de 7 y 14 días después de corte sin sellar el bloque.

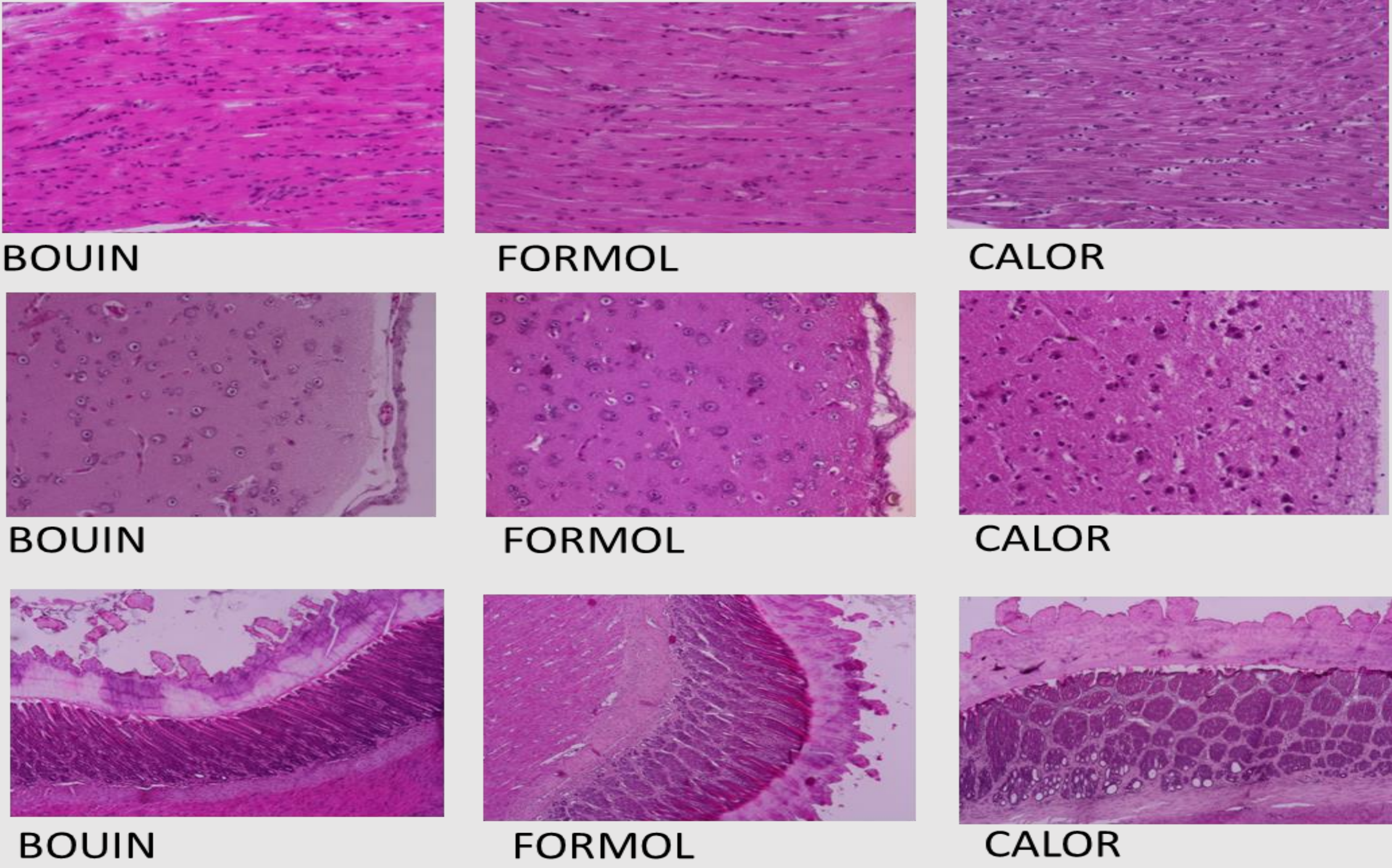


Figura 3. 3 órganos de codorniz con diferentes fijadores y procesados con XCL.

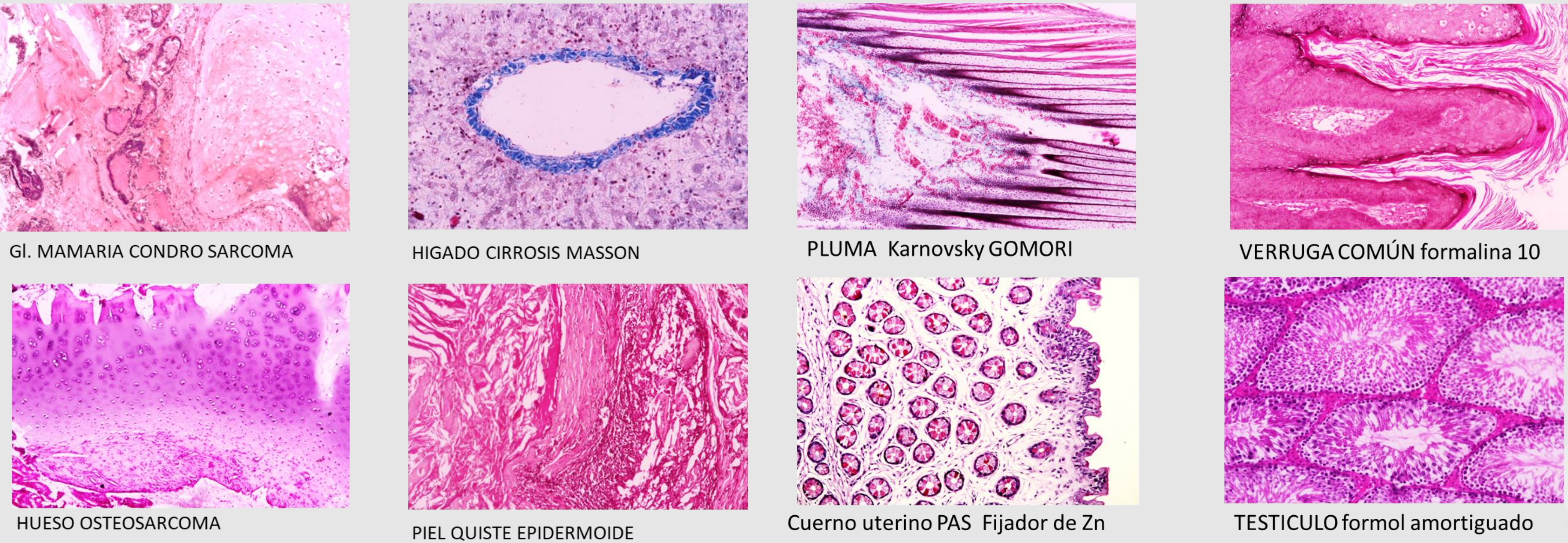


Figura 4. Diferentes muestras para diagnóstico procesadas con XCL.

Figura 5. Diferentes muestras procesadas con XCL

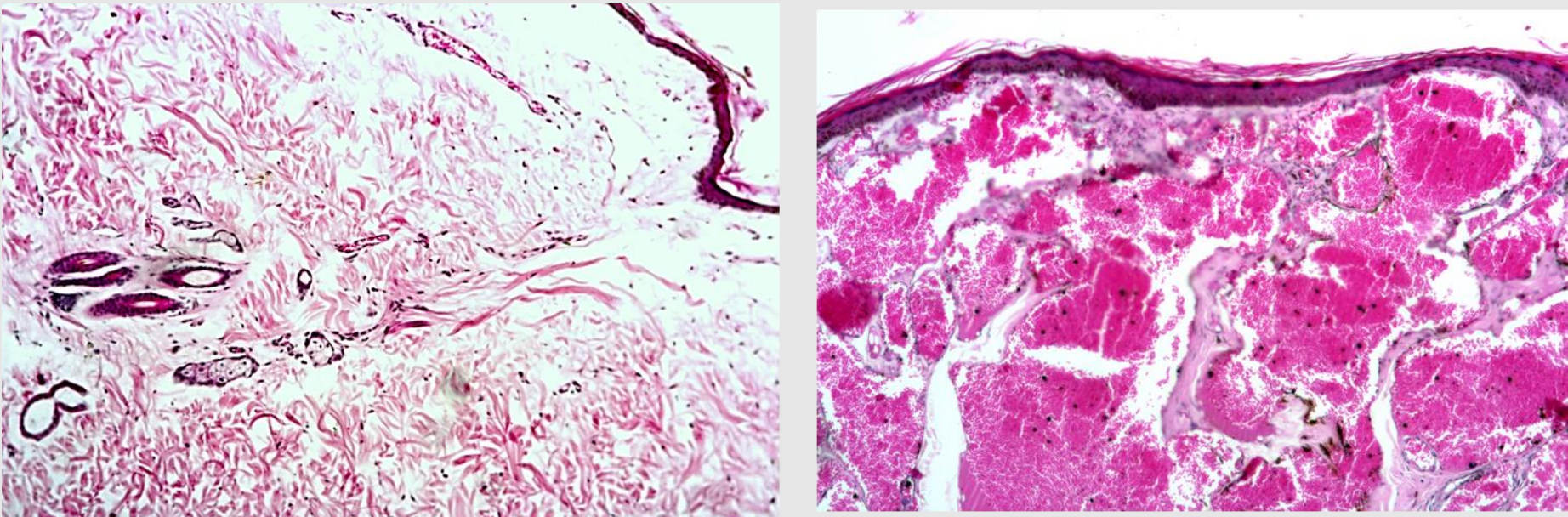


Figura 6. El XCL permite infiltrar piezas deshidratadas hasta R-OH de 96° o industrial de 98-99, durante toda la noche o dos horas. Las preparaciones no presentan diferencias con las que se deshidrataron hasta R-OH absoluto.

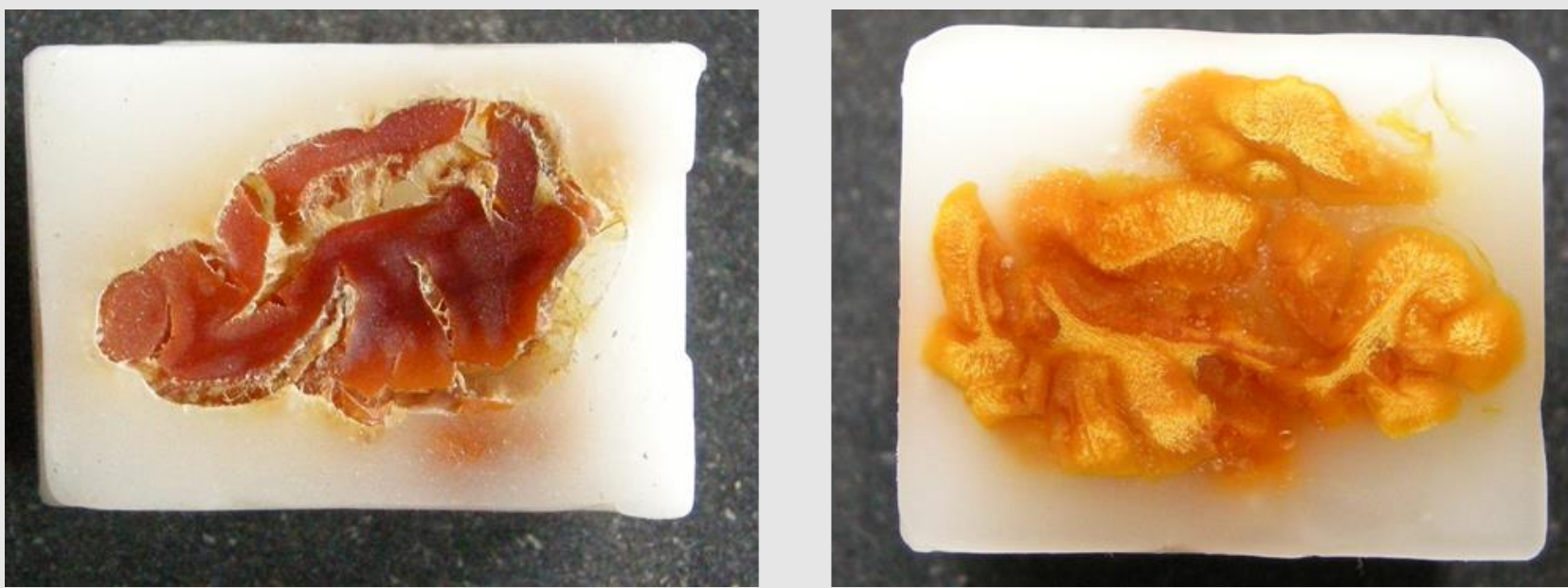


Figura 7. La mezcla de XCL fue empleada recuperar muestras con un proceso deficiente, contraídas y separadas de la parafina de inclusión. La mezcla XCL permite hacer con estas muestras preparaciones permanentes aceptables..

CONCLUSION

El proceso de aclaramiento fue denominado así porque en este paso del proceso, el aumento en el índice de refracción de las muestras es muy aparentemente visualmente, estos agentes o reactivos para “desalcoholizar” las piezas son un paso fundamental para obtener un resultado adecuado [10]. No existe en la literatura, referencias en las que se recomiende el uso de mezclas de solventes. En este trabajo se evidencia que las mezclas ayudan al proceso de muestras difíciles de procesar, particularmente XCL, ya que aumenta la velocidad de infiltración y aclaramiento perceptible, no dejan rastros de alcohol, permiten la infiltración de parafina rápidamente, suavizan muestras difíciles como neoplasias o con diferentes densidades, pueden permanecer de toda la noche hasta 15 días, sin provocar daños o dificultades para el proceso. Por otro lado, las capacidades tintoriales, para histoquímica e inmunohistoquímica, así como para recuperación de DNA intacto, no se ven modificadas de ninguna forma.