26.1 Técnicas para la detección de grasas.

Las grasas o lípidos, son sustancias orgánicas, insolubles en agua, pero solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, como acetona, éter, etc.

Desde el punto de vista químico se pueden distinguir:

- Lípidos simples.
- Lípidos complejos.
- Lípidos derivados.

Dentro de los lípidos simples encontramos las grasas neutras, saturadas e insaturadas.

Estas grasas o lípidos simples, se tiñen con el Sudan.

Dentro de los lípidos complejos nos encontramos con los fosfolípidos y glucolípidos que se tiñen con la técnica del Pas.

Dentro de los lípidos derivados nos encontramos con el colesterol o colessterina.

Existen varias técnicas para colorear y detectar los lípidos:

- Técnicas basadas en la solubilidad.
- Técnicas basadas en la observación con luz polarizada.
- Técnicas de tinción con colorantes solubles en grasa.
- Técnicas basadas en métodos histoquímicos.

Hay que tener en cuenta que los lípidos son sustancias solubles en ciertos disolventes orgánicos como el Alcohol, Benzol, Cloroformo, Toluol y Xylol.

Si realizamos las técnicas de rutina se van a disolver con lo que solo veremos los huecos, sobre todo en la inclusión en parafina, por lo que, para la realización de estos estudios, utilizaremos tejidos exclusivamente en congelación con el criostato.

Otro método para evitar el problema es incluir los tejidos en polietilenglicol.

Para la fijación previa se utiliza formol, aunque el mejor es el formol cálcico, porque los iones de calcio estabilizan los lípidos realizándose la fijación más eficazmente.

26.1.1 Coloración para las grasas neutras (lípidos homofásicos).

Estos colorantes actúan por mecanismos físicos de disolución, o sea, los colorantes tienen que ser más solubles en la grasa que el propio solvente del colorante.

Son técnicas de coloración progresiva, usándose colorantes que vayan disueltos en alcohol, alcohol/ acetona, o mezcla de alcohol/ agua.

Es una técnica inestable por la posible evaporación del disolvente, pudiendo provocar precipitados, dando error con falsos positivos.

Para evitarlo en lo posible hay que guardar el colorante en frasco herméticamente cerrado.

Emplear soluciones filtradas para evitar los precipitados. Agitar con cierta frecuencia durante la coloración. No prolongar la tinción más de 10 minutos. Los colorantes más empleados son Sudan III y IV, Rojo oleoso, Azul Nilo y Sudan Negro.

26.1.2 Técnica de Sudan III.

26.1.2.1 Método.

Se utilizan cortes en congelación de 8 a 10 micras. Hay que tener sumo cuidado con las precipitaciones. Se utilizan Sudan III en solución alcohólica (70°) saturada.

Se monta en medio acuoso.

25.1.1.1. Resultados.

- Lípidos en rojo.
- Núcleos según contraste (no es imprescindible).

26.1.3 Técnica de Sudan IV.

Es igual que la de Sudan III, se puede utilizar solo en solución saturada igual que el anterior o mezclándolo con Sudan III al 50%, si se utiliza solo dará mejores resultados disolviéndolo en una mezcla de alcohol / acetona.

26.1.4 Técnica de Sudan Negro.

Es la más selectiva, los cortes son fijados en formol, y se utilizan cortes de congelación.

Reactivos:

- Negro Sudan.
- Propilenglicol.
- Para contraste se puede utilizar rojo neutro.

Resultados:

- Núcleos en rojo.
- Lípidos y mielina en negro.

26.2 Técnicas para la identificación de glucógeno.

El glucógeno es un polisacárido que está compuesto por múltiples moléculas de glucosa.

Se sintetiza en las células hepáticas y aparte en el músculo estriado, en menor cuantía lo encontramos en el endometrio en la segunda fase del ciclo.

Para identificarlo existen dos tipos de técnicas:

- Histoquímicas que identifican los hidratos de carbono como el Pas.
- No histoquímicas como el Carmín de Best. El glucógeno es soluble en agua.

Como fijador idóneo es el alcohol de 80°.

Después de desparafinar, se pasa por el alcohol absoluto y se colodiona para evitar la solubilidad al hidratar.

Este colodionado que se retira con alcohol éter al 50% hace una malla que permite la entrada de líquidos e impide que salga el glucógeno.

En estas técnicas hay que hacer controles realizando una digestión por Tialina (enzima que descompone el glucógeno y está presente en la saliva) o por Maltasa (o diastasa que es una enzima del jugo intestinal purificada).

26.2.1 Técnica del PAS.

Reactivo: Generalmente se utiliza el reactivo Shiff comercial, pero como es una técnica muy utilizada nunca está de más recordar sus reactivos.

Preparación del Reactivo de Shiff:

1. Leucofuchina (Reactivo de Shiff).
2. Calentar 200cc de agua destilada hasta ebullición.
3. Apartar 100cc de agua y se disuelven 2gr de metasulfito sódico o potásico.
4. En los otros 100cc de agua, se disuelve 1gr de fuchina básica, agitar constantemente hasta llegar a una temperatura de 50°.
5. Añadir a la fuchina 1cc de ácido clorhídrico.
6. Mezclarle en metabisulfito.
7. Llevar al agitador con imán 2 o 3 horas.
8. Guardar en armario oscuro 24 horas.
9. Pasado este tiempo, añadir una cucharadita de carbón (opcional).
10. Filtrar y conservar en frasco topacio en nevera. Preparación del

Ácido Sulfuroso:

- Metabisulfito sódico al 10% 6cc.
- Ácido Clorhídrico, 1 normal (12cc de ácido clorhídrico puro y 800cc de agua destilada), se utiliza 5cc.
- Agua destilada 100cc. Resultado:
- Núcleos en azul.
- Glucógeno en rojo.

26.2.2 PAS Diastasa.

1. Desparafinar e Hidratar.
2. Poner los portar en cámara húmeda en estufa a 37°C, con diastasa (para destruir el glucógeno) durante 30min.
3. Lavar con agua destilada.
4. Proceder con la Técnica del PAS.

26.2.3 Carmín de Best.

Esta técnica no es histoquímica.

Utiliza una coloración regresiva, se pueden utilizar como fijadores el Bouin, Carnoy, y alcohol de 80°

Reactivos.

- Carmín.
- Cloruro potásico.

Resultados.

- Núcleos según contraste, por ejemplo. Hematoxilina. de Weigert, en azul- negruzco.
- Glicógeno en rojo.

26.3 Técnicas para identificar la Mucina.

Dentro de la célula (citoplasma) tenemos sustancias inespecíficas como la mucina.

Las técnicas para detectar la mucina pretenden identificar el moco.

Algunos de los colorantes básicos como la Hematoxilina, tiñen fuertemente a los materiales mucinosos.

Los colorantes meta cromáticos, son colorantes básicos o catiónicos que tienen la propiedad de teñir algunas estructuras tisulares de un color diferente a la propia sustancia colorante.

La técnica más antigua y que tiene muchas variantes es la del método de Mucicarmin de Mayer.

La técnica de la Tionina se utiliza para detectar mucosustancias ácidas.

26.3.1 Técnica de Mucicarmin de Mayer.

Lo ideal es utilizar Formol tamponado al 10% como fijador.

Reactivos.

- Hematoxilina. de Harris.

Para la solución de Mucicarmin:

- Carmín.
- Hidróxido de aluminio
- Alcohol.

La solución de trabajo consta de solución de Mucicarmin en agua destilada.

Resultados.

- Mucina en rojo.
- Núcleos en Azul.
- Cápsula de criptococo en rojo.

26.4 Técnicas para identificar la Fibrina.

Cuando el fibrinógeno se polimeriza por la acción de una enzima llamada trombina en presencia de calcio, se convierte en fibrina.

La fibrina se puede detectar con algún Tricrómico como es de Van Gienson que se da un color amarillo y el de Mallory que la tiñe de color rojizo, pero los tricrómicos no detectan la fibrina de forma específica.

El fibrinógeno es una glucoproteína plasmática muy rica en aminoácidos que son básicos como la Tirosina y muy rica en ciertos azúcares como la Hexosamina y ácido siálico.

En las enfermedades reumáticas, se han observado en las paredes de los vasos sanguíneos una sustancia parecida a la fibrina que se denomina fibrinoide, se cree que es fibrina en el último estadio de su desarrollo.

La fibrina y el fibrinoide se colorean con:

- Eosina en rojo.
- Van Gienson en amarillo.
- Pas son moderadamente positivos.
- PTAH (hematoxilina ácida fosfotúngstica de Mallory).

26.4.1 Técnica de Weigert.

Como colorante utiliza fundamentalmente la violeta de metilo o violeta de genciana.

Como este colorante es un derivado de la parafucsina, por lo general contamina al verde de metilo.

Como fijadores se utilizan.

- Formol al 10%
- Formol alcohólico.
- Carnoy o Alcohol absoluto. Reactivos:
- Eosina acuosa.

- Solución violeta de genciana en aceite de anilina.
- Solución Yodada de Gram.
- Solución aceite de Anilina-Xylol. Resultados:
- Fibrina y bacterias Gram en azul.
- Resto de tejidos en color rosado.

26.5 Técnicas de coloración para identificar el amiloide.

La sustancia amiloidea no está presente normalmente en el organismo, siendo insoluble en agua, alcohol, éter y ácidos fuertes.

En las coloraciones de rutina como al Hematoxilina- eosina, aparece de color rosado acelular y amorfo, que al corte se fracciona.

Los encontramos con mayor frecuencia en:

- Bazo.
- Hígado.
- Páncreas.
- Piel.
- Ganglios linfáticos.
- Riñón.

Cuando en el organismo se acumula esta sustancia se produce una enfermedad conocida como Amiloidosis primaria, y si va asociada a otras enfermedades de carácter inmunitario o neoplásicas se le denomina Amiloidosis secundaria.

Desde el punto de vista químico, las fibrillas amiloideas están compuestas por proteínas fibrosas de naturaleza diferente.

Se han descrito varios tipos de cadenas en relación con las proteínas fibrilares.

- Cadena AL (amiloide ligero), procede de la desnaturalización de cadenas ligeras de la molécula Inmunoglobulina.
- Cadena AA: derivada de un precursor de tamaño mayor (proteína SAA) que se produce en el hígado en condiciones patológicas.
- Cadena de transtiretina o proteína transportadora de tiroxina retinol (enf. Neurológicas hereditarias conocidas como Amiloidosis polineuropáticas)
- Cadenas degeneradas de beta-2-micro albumina, se relaciona con la hemodiálisis en las insuficiencias renales.
- Cadenas de proteína A4, como se depositan en el sistema nervioso central se le relaciona con la enfermedad de Alzheimer.

- Cadenas degeneradas de hormonas, se depositan en tumores endocrinos como en el carcinoma medular de tiroides.

Para la detección de la Amiloidosis, se pueden utilizar la técnica de Rojo Congo, y Tioflavina T.

26.5.1 Técnica de Rojo Congo.

Reactivos:

- Hematoxilina de Harris.
- Solución de Rojo Congo: Solución Madre:
- Rojo Congo, 1gr.
- Cloruro Sódico al 1% en alcohol de 80° 200cc.

Se agita hasta su disolución y se filtra. Este preparado, se conserva durante meses.

Solución de Trabajo:

- Solución Madre de Rojo Congo 100cc.
- Hidróxido Sódico al 1%, 1cc

Método:

1. Desparafinar e Hidratar.
2. Teñir con Hematoxilina durante 1 min.
3. Lavar en agua corriente, rápidamente.
4. Lavar en alcohol de 80°.
5. Teñir con Solución de Rojo Congo alcalino durante 20 min.
6. Deshidratar, aclarar y montar.

Resultado.

- Núcleo en azul. A
- Muloide y fibras elásticas en naranja rojizo.

26.5.2 La técnica de la Tioflavina T.

Se cree que la Tioflavina se une al amiloide por mecanismos físico- químicos.

Se colorea con hematoxilina para apagar en lo posible la fluorescencia espontánea que emite el tejido de fondo.

Reactivos:

- Hematoxilina. de Harris.
- Tioflavina T en solución acuosa.

Resultados:

- Amiloide en amarillo, hasta amarillo verdoso.