

TEMA 21

EL MICROTOMO.

1. CONCEPTO Y TIPOS DE MICROTOMOS:

El **microtomo** es un instrumento de precisión, diseñado para realizar cortes extremadamente finos de tejidos previamente incluidos en parafina u otros medios, que permitan su análisis microscópico en estudios diagnósticos e investigativos.

Todos los micrótomos son de construcción rígida diseñados para:

- Sujetar con firmeza el bloque de tejido.
- Fijar la cuchilla de forma estable.
- Controlar con precisión el avance del tejido hacia la hoja de la cuchilla para obtener cortes de espesores regulados.

En el caso del tejido **incluido en parafina** las secciones se cortan habitualmente entre **3-5 micras**.

Dependiendo del tipo de microtomo el avance se produce del bloque hacia la cuchilla o al revés.

5 tipos básicos de microtomos, denominados según su mecanismo:

- De balanceo.
- Rotatorio.
- En base de trineo.
- De deslizamiento.
- De congelación.

De este grupo de micrótomos, algunos han sufrido modificaciones que les han permitido adaptarse a nuevos sistemas de inclusión, los englobaremos dentro del grupo básico y comentaremos las modificaciones sufridas.

Los micrótomos están formados por 3 partes fundamentales:

- Un **portabloques** o **portamuestras**. La **pinza** es también universal que permite doble posibilidad de posicionamiento vertical u horizontal, **palanca de fijación** rápida y **orientación** en todos los ejes del espacio.

- Un **soporte para la cuchilla**. Nos encontramos con sistemas universales de cuchillas desechables.

Las cuchillas pueden ser de **diferentes materiales** que hacen que aquellas muestras que se presentan más difíciles por su dureza se conviertan en un acto cómodo y fácil, como las de **carburo de tungsteno**.

Este **portacuchillas** fija las cuchillas desechables.

- Un **sistema de avance mecánico** que nos permitirá seleccionar distintos avances en micras para proceder desde el desbastado al corte, al mismo tiempo un **sistema de retorno** en cada pasada para que al volver no roce el bloque con la cuchilla.

- **Microtomo de BALANCEO:**

Es uno de los diseños más anticuados y sencillos, con un escaso mantenimiento. No se utiliza en la actualidad.

La cuchilla permanece inmóvil mientras el bloque de tejido se mueve mediante un sistema oscilante.

Ventajas:

- Ligero.
- Sencillo
- Escaso mantenimiento.

Inconvenientes:

- Necesita un bloque pequeño.
- Las secciones se realizan en un plano curvo.
- No realiza secciones seriadas.

- **Microtomo ROTATORIO (Minot):**

Acción rotatoria de la rueda de mano que produce un movimiento de corte.

Cada movimiento de rotación del brazo o rueda del micrótopo se traduce en otro del portabloques arriba y abajo frente al filo de la cuchilla.

Este movimiento continuado produce el avance automático del porta bloques.

El bloque está fijo mediante un portabloques, pudiéndose orientar de diversas maneras frente a la cuchilla.

Ventajas:

- Pesado y estable.
- Secciones seriadas.
- Permite cambios de ángulo de la cuchilla.
- Permite cortar bloques de mayor tamaño.
- La cuchilla es grande y transfiere menos vibración.

También denominado **tipo Minot**. Podríamos decir que es el instrumento más utilizado hoy en día en un laboratorio de anatomía patológica.

Es el sistema de corte que más ventajas y calidad nos ofrece, es la base sobre la cual se han creado otro tipo de micrótopos.

Existen **microtomos electrónicos**, que tienen como características:

- Posibilidad de avanzar manualmente el bloque hasta el borde de la cuchilla.
- Tiene un cambio instantáneo entre las funciones de desbastado y corte de secciones.
- Motorización de diversas funciones, incluida la velocidad de corte, recuento de secciones, espesor de corte y distancia de avance.
- Bandeja de residuos desmontable y profunda.
- Parada de emergencia: impide que el suministro eléctrico llegue al motor.

Dentro del **tipo Minot**, existen otros microtomos como el **microtomo para plásticos** (resinas, metacrilatos).

Para obtener resultados uniformes y de calidad deberemos trabajar con **micrótopos especiales**, con algunas modificaciones:

- Selección de configuraciones: para seleccionar el corte de parafina o plástico.
- Monitorización de funciones en pantalla.

- Control de avance y rebobinado del espécimen.
- Portabloques especial, nos permite fijar el bloque con mayor fuerza, impidiendo su vibración.
- Motorizado, con un motor de avance con velocidad variable.
- Cuchillas con filo de tungsteno.
- Retracción del bloque después del corte.
- Hasta 3 modos de corte.

Como **características** de estos micrótomos:

- Robustez y versatilidad.
- Complementos para cada tipo de inclusión en plásticos.

La obtención de cortes de bajo espesor incluidos en plástico es mucho más laboriosa que los de parafina, pero la calidad en la imagen resultante es superior en el plástico.

Hay una necesidad en histopatología de disponer de sistemas de inclusión, corte y tinción, que permitan aumentar la resolución de la microscopía óptica sin tener que recurrir necesariamente a la microscopía electrónica.

● **Microtomo de TRINEO:**

Se diseñó para secciones de grandes bloques tisulares (órganos completos como el cerebro).

El **bloque se desplaza horizontalmente** hacia atrás y adelante, contra una **cuchilla horizontal fija**.

Entre cada movimiento de corte, el avance del objeto determina el espesor de la sección, el grosor de los cortes es escogido por el manipulador.

Es una máquina pesada, muy estable, no sujeta a vibración.

La **cuchilla** tiene un tamaño más grande de lo normal, 24 cm de longitud, de forma en cuña.

Su sujeción nos permite variar el ángulo.

Ventajas:

- No existe restricción en el tamaño del bloque.
- Gran estabilidad.

Inconvenientes:

- Manipulación más lenta.

● **Microtomo de DESLIZAMIENTO:**

El **bloque permanece fijo** y la **cuchilla se mueve horizontalmente** sobre él produciendo un movimiento de traslación de la cuchilla en dirección al bloque.

Diseñado para **inclusiones en celoidina**, también nos permite cortar tejidos **incluidos en parafina**.

El desplazamiento de la cuchilla sobre raíles le confiere **inestabilidad** al movimiento y por tanto transmite vibraciones. Esto hace que sea un **micrótomo en desuso**.

El portabloques permite sujetar el bloque pudiendo orientarlo en los diferentes planos del espacio.

La cuchilla junto con el portacuchillas dispone de mandos que sujetan, orientan e inclinan y además facilitan el encaramiento con la pieza a cortar.

Ventajas:

- Mecanismo sencillo.
- Cortes sobre tejidos de gran tamaño.
- Cortes de inclusiones en celoidina.

Inconvenientes:

- No obtenemos cortes seriados.
- Vibraciones.

● Microtomo de CONGELACIÓN:

Existen varios tipos de microtomos de congelación (Sartorius y Leitz).

Estos microtomos van conectados a una **bombona de CO₂** para que sea posible la congelación de la pieza.

Presenta un **brazo** en el que por medio de unas pinzas se **sujeta la cuchilla**, el brazo se desplaza en plano horizontal de delante hacia atrás por deslizamiento.

Posee una **platina** donde **fijamos el tejido** permitiéndonos manipular su altura, y por ella circula el CO₂.

La cuchilla se desplaza en dirección al bloque describiendo un movimiento de rotación.

El portabloques de los microtomos de congelación no es orientable.

Este micrótopo ha sido sustituido por el criostato, y **no se usa**.

● CRIOSTATO:

Es un **micrótopo de rotación tipo Minot** introducido en una cámara de congelación que nos permite mantener el interior a -23 °C.

La temperatura del portabloques y de la cuchilla será igual a la del tejido, al estar cerrada la cámara no perderemos la temperatura para un corte preciso.

La totalidad del microtopo se encuentra inclinado para facilitar la manipulación.

Peculiaridades que nos facilitan la labor: mecanismo antienrollamiento del corte, zonas de congelación rápida, etc.

Tanto en el microtopo de congelación como en el criostato, la finalidad es el **diagnóstico rápido** (biopsias intraoperatorias) de material enviado por el quirófano con carácter urgente, así como para aquellos estudios que precisen de realizar **técnicas histoenzimáticas, inmunofluorescencia e inmunohistoquímicas**.

● ULTRAMICROTOMO:

Para **estudios de ultraestructura**, utilizado en **microscopía electrónica**, este micrótopo toma como referencia el tipo Minot añadiéndole una serie de modificaciones que le permitirán obtener **cortes más finos**.

La inclusión del tejido se realiza en **polímeros**. Con una precisión de **20-60 nanómetros** (1000 nm= 1 micra).

El ultramicrotopo necesita una **inclusión en resina** y fabricación de unas **pirámides o moldes cónicos**.

Dispone de **avance automático** de distintas velocidades, posee una **lupa** para facilitarnos la visión del proceso de corte, las **cuchillas** que se utilizan son de **vidrio desechables** o de **diamante**, el avance y retroceso del portabloques está motorizado, mientras que la **cuchilla es fija**, estando montada en un brazo que sube y baja.

- **Tipo de cuchillas para microtomos:**

Dependiendo del tipo de inclusión, material y microtomo hay distintos tipos de cuchillas.

Hoy tenemos **cuchillas desechables** que van montadas sobre el portacuchillas.

Existen distintos **tipos de portacuchillas** tal como los que fijan las cuchillas desechables presionando con una pletina con tornillos, otros de liberación rápida e incluso portacuchillas magnéticas.

Hablaremos de las **cuchillas no desechables**, aunque en algunos casos se hayan sustituido por las desechables (cortes en parafina), en otros como cortes en plástico o celoidina permanecen.

Las cuchillas tienen perfiles distintos, según el vaciamiento de la hoja se designan con las letras A, B, C, D (Las cuchillas de **hoja muy vaciada** permiten hacer los cortes más delgados, pero también vibran con mayor facilidad que las cuchillas de **hoja gruesa**).

Las hojas de **cara plana tipo C**, más robustas, se reservarán para cortar materiales duros.

Las cuchillas con **bisel tipo D** sólo se emplean en casos especiales (huesos).

La **orientación de la cuchilla** con relación al plano de corte es variable según el modelo y el tipo de inclusión.

El filo de corte de una cuchilla debe ser una línea recta formada por la convergencia de dos planos, las facetas de corte o bisel.

En el caso de cortes de material **incluido en plástico**, lo ideal es disponer de dos **cuchillas de tungsteno**, una de ellas reservada para los cortes finos y la otra para desbastar.

El ángulo de las facetas puede variar de 18° a 35°.

2. **MÉTODO DE CORTE (orientación de los bloques y técnica de corte):**

Comenzamos aproximando la pieza al filo de la cuchilla con el mando manual y cuando comprobamos que ya contactamos con el bloque colocamos el automático.

Al principio conviene que la velocidad de corte sea lenta.

Si la cuchilla está en perfectas condiciones y el bloque está bien confeccionado, los cortes saldrán casi estirados sobre la cuchilla y serán totalmente transparentes.

Al igual que ocurre con los cortes de parafina, que presentan una cara mate y otra brillante, los cortes de plástico también presentan estas diferencias en sus superficies.

Es la cara brillante la que debe ponerse en contacto con la superficie del agua y la que se apoya en el portaobjetos.

El no seguir esta norma, probablemente dará problemas a la hora de conservar los cortes adheridos al porta, despegándose con mucha frecuencia.

Los cortes, perfectamente estirados en el agua, se recogen con portaobjetos limpios.

Se escurre el agua y se secan en una **placa calefactora a 60-80°C**.

No será necesario utilizar portas desengrasados. Tampoco precisamos tratar el porta con adhesivos, como gelatina o albúmina.

Los cortes **se adhieren al porta por calor**, soportan perfectamente la mayor parte de los reactivos y tan solo suelen despegarse cuando se tratan durante algún tiempo con alcohol de 70°.

Una vez secos, los cortes estarán dispuestos para su tinción inmediata.

PASOS:

1. Colocación del bloque

- Fijar el bloque en el porta-bloques con orientación adecuada.
- Asegurar que la superficie de corte quede paralela a la cuchilla.

2. Desbastado

- Se eliminan las primeras capas del bloque para exponer la zona de interés.
- El grosor de desbastado es de 10-15 micras.

3. Corte fino

- Se ajusta el micrótopo para obtener cortes de 3-5 micras.
- Se recoge la tira de cortes seriados con pinzas y se coloca en el baño de flotación.

4. Estiramiento y Montaje

- Los cortes se calientan en un baño de agua a 45°C.
- Se montan en portaobjetos con la cara brillante hacia abajo.
- Se secan en estufa a 60°C durante 20 minutos.

3. TÉCNICAS DE CORTE SOBRE BLOQUES DE PARAFINA:

El micrótopo utilizado para los cortes de tejido incluido en parafina es el rotatorio o tipo Minot.

Para realizar unos buenos cortes hay que tener en cuenta varios factores:

- Temperatura.

Los bloques se seccionan mejor si están a baja temperatura. La baja temperatura tiene el efecto de uniformar la consistencia del bloque, lo que asegura un corte uniforme y fino. El bloque se debe encontrar a una temperatura 10 °C para conseguir la dureza suficiente que nos permita obtener cortes finos de 4µ.

Formas de enfriar el bloque antes de cortarlo:

- Recipiente con cubitos de hielo.
- Dentro del frigorífico (el congelador fragmenta el bloque).
- Aplicando directamente sobre la superficie de corte, una vez desbastada, un cubito de hielo y consiguiendo un enfriamiento instantáneo.

- Filo de la cuchilla.

Una cuchilla se deteriora conforme aumentamos el número de bloques cortados, por ello es importante desbastar con un lado de la cuchilla dejando el otro para el corte fino.

- Ángulo de la cuchilla.

El ángulo de corte debe ser elegido según el tipo de tejido y fijarlo según la escala graduada del microtopo.

Cuanto mayor sea el ángulo mejor se cortan los **tejidos blandos**, y al contrario para **tejidos duros**.

La inclinación ideal de corte será de 10°-15°.

- Velocidad de corte.

La velocidad óptima varía con el tipo de tejido. Los **tejidos blandos** se cortan mejor a **baja velocidad** y los **duros** a una más **rápida**.

Si la velocidad es excesiva se producirá compresión, pero si es lenta el grosor del corte aumentará, no permitiendo obtener cortes homogéneos.

- **Humedad.**

En algunos casos en los que el tejido contiene sangre, requieren humedecer suavemente la superficie de corte, ya que tiende a producirse la fragmentación del tejido al corte.

- **DIFICULTADES en el corte:**

Siempre puede aparecer algún tejido que nos presenta dificultades, bien por la dureza del tejido o por la fragmentación del mismo:

- **Dificultades debidas a TEJIDOS DUROS:**

Si el enfriamiento del bloque, el afilado de la cuchilla o la disminución de la inclinación de la cuchilla no resuelven el problema, podemos utilizar una solución de **fenol 4%** durante 30-90 min, depositaremos el bloque poniendo en contacto la superficie de corte con este agente ablandante.

- **Dificultades por FRAGMENTACIÓN del bloque:**

Si la cierta humedad para los cortes que contengan sangre, no resultara efectivo siempre podremos **revestir con celoidina el bloque** como alternativa, en cada sección.

- **Estirado de los cortes:**

El estirado de los cortes se hará en el baño de agua caliente, a una tª aprox. 45°.

Una vez humedecida la cara interna de la tira de cortes, la depositamos en el baño y seleccionamos aquel corte que no posea arrugas, burbujas o cualquier otro artefacto.

Identificaremos con un lápiz en la zona esmerilada del porta el nº de biopsia.

- **Adherencia de los cortes:**

Colocaremos los portas con los cortes en una cestilla para proceder a su tinción en grupo.

El primer paso es introducirlos en una **estufa a 60° C** durante **20 min** o hasta que no quede ningún rastro de agua y la parafina comience a perder su homogeneidad.

Este paso es vital para que la adherencia sea eficaz, en técnicas de plata las soluciones amoniacales tienden a desprender los cortes del porta.

El siguiente paso es introducirlos en un teñidor automático o bien realizar la técnica de rutina de forma manual.

- **Técnicas de corte en MICROSCOPIA ELECTRÓNICA:**

Hoy día se fabrican **microtomos especiales** para obtener cortes finos que se llaman a menudo **ultramicrotomos** y muchos poseen mecanismos de avance térmico en los cuales el avance de la muestra se hace por el calentamiento del brazo que la sostiene.

El grosor de los cortes depende no sólo del calentamiento sino también de la frecuencia con que se corta y por eso en estos microtomos se usa un motor.

- **Cuchillas de VIDRIO:**

Existen máquinas para hacer cuchillas de vidrio, que obtienen excelentes cuchillas y no deben de faltar en ningún laboratorio.

La colocación de la cuchilla en el microtomo depende de su diseño, pero hay dos aspectos esenciales que a menudo causan problemas.

1. El filo que se ha obtenido al romper la diagonal del paralelogramo, debe de estar separado de la muestra.

2. Debe inclinarse la cuchilla hasta conseguir aproximadamente un ángulo de 5° entre la línea del desplazamiento de la muestra y el lado más cercano de la cuchilla.

➤ **Balsa de agua:**

Los cortes finos por debajo de 0'5μ es necesario que floten en agua detrás de la cuchilla conforme van obteniéndose.

Algunos microtomos tienen como accesorio balsas prefabricadas que se pueden adaptar a la cuchilla y que se llenan de agua.

Las **cuchillas de diamante** generalmente tienen ya incorporada la balsa.

➤ **Velocidad de corte:**

Para obtener cortes finos se necesita una velocidad de corte lenta.

Aquellos cortes que se han obtenido demasiado rápidamente, a menudo muestran ondas, mientras que los obtenidos a velocidades más lentas permiten que el plástico pase sin deformarse.

La velocidad de corte que se utiliza hoy día es aproximadamente de 1- 2 mm/seg.

Cuando los microtomos son manuales, se puede realizar todo el ciclo rápidamente, exceptuando el momento del corte.

Montaje de los cortes en la rejilla.

Una vez se tienen los cortes flotando sobre la superficie del agua, se deben pasar a la rejilla.

Un método lógico que se puede utilizar, es sumergir la rejilla en el agua por debajo de los cortes flotantes y levantarla horizontalmente, sacándola del agua.

El propósito de este método es conseguir colocar la tira de cortes deseada en el centro de la rejilla porque en algunos microscopios solamente se puede observar la parte central de la rejilla.

La inclusión de una biopsia se realiza en varios bloques y todos sufrirán los mismos pasos que a continuación detallamos.

Obteniéndose los cortes finos sólo de aquellos bloques que presentan las zonas de interés.

- **Tallado preliminar:** se piramida el bloque. Montamos el portabloques en el soporte de tallado que estará situado en el soporte de la cuchilla.

- Tallamos las aristas del bloque.

- **Cortes semifinos**, cortes de aproximadamente 1 micra utilizando el avance lento para su observación al microscopio óptico.

- **Tallado fino**, se realiza una vez que se selecciona la zona de tejido de interés.

- **Otras técnicas de corte:**

- **Corte con CELOIDINA:**

El microtomo usado para cortar tejidos incluidos en celoidina es el de **deslizamiento**, junto a una **cuchilla plana cóncava**.

La celoidina como método de inclusión es perfecta para rellenar órganos huecos y nos permite **cortes gruesos** de hasta 100μ.

El mayor inconveniente que nos encontramos en el corte con este método de inclusión, es el no poder realizar cortes inferiores a 12-14μ.

La cuchilla debe encontrarse en un ángulo agudo con respecto a la superficie del tejido.

La práctica nos permitirá obtener cortes de 10 a 12 micras de espesor, con estos cortes se pueden llevar a cabo todos los trabajos de rutina.

- **Corte en material plástico:**

La inclusión de muestras biológicas en plásticos y resinas nos proporciona bloques de tejido en los que se han reducido al mínimo los artefactos provocados por la deshidratación, aclaramiento o las altas temperaturas de los baños de infiltración, obteniendo bloques de tejido con una morfología perfectamente conservada.

Es posible obtener cortes de 1-2μ.

El **glicol metacrilato** es un monómero que tiene la propiedad de ser **soluble en el agua**, una de las características ideales de un medio de inclusión.

Comparemos frente a los cortes obtenidos de la parafina:

Ventajas:

- Cortes mucho más finos.
- Mayor resolución óptica.
- Más comodidad en la tinción.
- No es preciso deshidratar los cortes.
- Igual o menor duración en la inclusión.

Inconvenientes:

- Microtomos especiales.
- Mayor dificultad al corte, al ser de bajo espesor.
- El coste de la técnica es mayor.
- Los productos son más nocivos para la salud.

Los resultados que se obtienen compensan por completo a los inconvenientes.

Es cierto que con cualquier microtomo se podrían obtener cortes de material incluido en plástico, sobre todo si queremos obtener resultados uniformes, es necesario recurrir a **microtomos especiales**, con características básicas como:

- Brazo portabloques con gran fuerza.
- Motor con velocidad de corte variable.

Características opcionales como:

- Sistemas antivibratorios.
- Accesorios específicos para cuchillas de vidrio.
- Retracción automática del bloque después del corte.

La manipulación de este tipo de microtomo en su esencia es como en los de parafina.

4. PRECAUCIONES PARA EVITAR ACCIDENTES:

- **Riesgos asociados al uso del microtomo:**

- Cortes accidentales con cuchillas extremadamente afiladas.
- Lesiones por movimientos repetitivos (uso prolongado del microtomo manual).
- Inhalación de vapores tóxicos (formol, xileno).

- **Medidas de seguridad:**

- Uso obligatorio de guantes resistentes a cortes.
- Manejo de cuchillas con pinzas, evitando contacto directo.
- Desactivación del microtomo antes de cambiar cuchillas.
- Limpieza inmediata de residuos en la estación de trabajo.

5. SEGREGACIÓN DE CUCHILLAS:

- Cuchillas **desechables**: contenedores específicos para material punzante.
- Cuchillas **reutilizables**: limpiarse y guardarse con protección.

6. MANTENIMIENTO DEL MICROTOMO:

El mantenimiento es clave para garantizar la **precisión** del corte y la **seguridad** del operador.

- **Limpieza diaria**

- Eliminación de restos de parafina con brochas y pinceles.
- Desinfección del portabloques y cuchilla tras cada uso.

- **Lubricación periódica**

- Aplicación de aceite lubricante en mecanismos de avance.

- **Revisión técnica anual**

- Ajuste y calibración del sistema de avance.
- Comprobación del estado de tornillos, rótulas y mecanismos internos.