

TÉCNICA HISTOLÓGICA

CÉSAR EDUARDO MONTALVO ARENAS

Agosto de 2010.

INTRODUCCIÓN.

Parece factible que, si deseamos estudiar una célula o una asociación de ellas, para conocer su estructura morfológica microscópica y deducir, en lo posible sus funciones, bastaría examinarlas a través de los instrumentos que amplían imágenes de los objetos observados (*microscopios fotónicos y electrónicos*); este procedimiento no es factible de realizar; al intentar hacerlo se presentan serias dificultades en la manipulación de los especímenes y el inicio de los procesos propios de desarreglo molecular (*autólisis*) y celular que suelen presentarse después que las células y los tejidos abandonan su hábitat natural. Por lo tanto, es necesario utilizar una serie de procedimientos y artificios que nos permitan describir, comprender y analizar la estructura microscópica de las células, tejidos y órganos.

Se denomina **TÉCNICA HISTOLÓGICA** al conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos a través de los microscopios fotónicos y electrónicos.

PROCEDIMIENTOS INMEDIATOS O VITALES

Permiten la observación y el estudio de protozoarios, células sanguíneas, células descamadas o disociadas, células en cultivo de tejidos; estructuras muy delgadas y translúcidas como la membrana peritoneal de animales pequeños o epidermis de vegetales, granos de polen etc. suspendidas en los líquidos de su hábitat natural o solución salina balanceada. Para una observación óptima suele utilizarse tipos especiales de microscopios fotónicos como el de campo oscuro o el de contraste de fases: *observación al estado fresco*.

En ciertos casos, cuando se requiera destacar alguna estructura celular o tisular se pueden emplear colorantes inocuos para la vida de las células, no modifican la estructura de ellas ni interfieren en sus funciones. A este procedimiento se le conoce como *coloración vital*.

Para el estudio de las manifestaciones vitales de las muestras suelen emplearse una serie de microinstrumentos que facilitan la introducción, al interior de las células, de sustancias o la extracción de ciertos componentes mediante microinyectores, micropipetas, microelectrodos o instrumentos que emiten haces sumamente delgado de radiaciones de alta energía (rayos laser).



Fig Tec. de tinción: Micromanipulación mecánica (microelectrodos que atraviesan la membrana celular)

COLORACIÓN VITAL Puede ser de dos tipos:

1. **Coloración intravital**, consiste en la administración de colorantes vitales a través de las vías digestiva o intratraqueal; mediante inyecciones sanguíneas, linfáticas, subcutánea, o intraperitoneal. Las soluciones de uso más frecuente son: **tinta china**, **carmin de litio**, **azul tripan** (partículas colorantes que demuestran la capacidad fagocítica).
2. **Coloración supravital**, En este procedimiento se emplean colorantes que se aplican a células o tejidos provenientes de organismos vivos. Se demuestran: **mitocondrias** con el **verde de Jano**, los **gránulos de las células cebadas** con el **rojo neutro**, la **sustancia granulofilamentosa de los reticulocitos** con el **azul brillante de cresyl**, **ramificaciones nerviosas** con el **azul de metileno**; o el **ADN** y el **ARN** de las células con **naranja de acridina** (empleando el microscopio de fluorescencia).

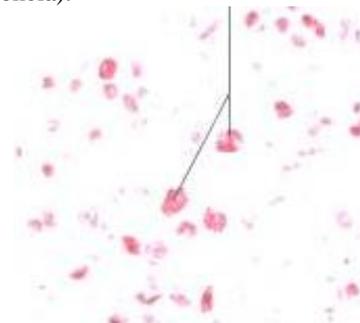


Fig Tec. de tinción 1: Tinción supravital de macrofagos de tejido conectivo por agregado de Carmin de litio a una preparación de Tejido Vivo.

PROCEDIMIENTOS MEDIATOS O POSTVITALES

Tienen por finalidad preparar células, tejidos y órganos procedentes de seres en los que los procesos vitales se han detenido y es necesario conservar la estructura que tenían en vida.

De manera general, para alcanzar este objetivo es necesario realizar los siguientes pasos:

- Toma de la muestra
- Fijación
- Inclusión
- Microtomía
- Coloración o tinción
- Montaje

A) TOMA DE LA MUESTRA

La calidad y la fidelidad con que una célula o un tejido muestren una imagen al microscopio, con las características morfológicas que poseían cuando estaban con vida, dependen esencialmente de la prontitud y el cuidado que se aplicó para obtener la muestra a ser procesada mediante los pasos mencionados anteriormente.

Existen diversos procedimientos que permiten obtener muestras de tejidos y órganos para conseguir preparaciones histológicas de buena calidad. Estos son:

- a) **Mediante la biopsia:** (del griego bios = vida y ophis = visión), consiste en la toma de un fragmento de tejido u órgano de un ser vivo. realiza a través de una operación quirúrgica hecha expofesamente o durante la intervención quirúrgica efectuada en pacientes y corroborar así un diagnóstico de una determinada lesión. La biopsia puede ser:
- ❖ incisional
 - ❖ excisional
 - ❖ por sacabocados
 - ❖ por punción y absorción
 - ❖ por raspado
 - ❖ por trepanación

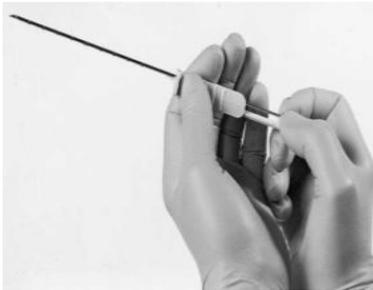


Fig Tec de tinción: Aguja de biopsia incisional (el embolo se retrae al insertar la aguja)

El estudio de células de superficies epiteliales de renovación constante (mucosas bucal, gástrica, vaginal, uretral), se realiza a través de la **Citología Exfoliativa**. En otros casos células obtenidas mediante punción (células sanguíneas o de la médula ósea) se extienden en una lámina portaobjetos para hacer los “**frotis**”, colorearlas y examinarlas.

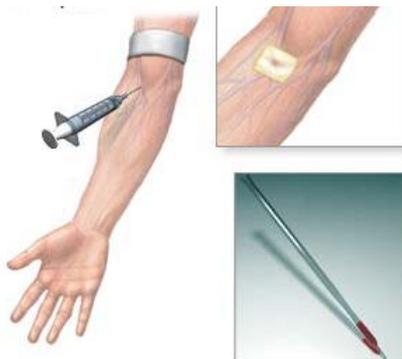


Fig Tec. de tinción: Punción

- b) **mediante la necropsia**, las muestras se obtienen de seres muertos: En este caso es recomendable que los tejidos y órganos se obtengan inmediatamente después de producida la muerte.

Recomendaciones para la toma de las muestras.

Los tejidos y los órganos provenientes de biopsias y necropsias se seccionan empleando bisturís o navajas de afeitar nuevos, sin hacer presión sobre ellos. No es recomendable el uso de tijeras para cortar los tejidos pues éstas ocasionan compresiones y jalonamientos de los tejidos y órganos que distorsionan su estructura microscópica. El tamaño de las muestras no debe exceder de 10 mm por lado con un grosor de 5 mm.

B) FIJACION.

Es un procedimiento cuya finalidad, al aplicarlo es

Detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos.

Esto se consigue inmovilizando (por coagulación o precipitación) las moléculas proteínicas e inhibiendo principalmente las enzimáticas haciéndolas insolubles. Esta acción garantiza la integridad de las células y tejidos; se efectúa por mediante agentes químicos denominados **fijadores**.

Los fijadores se clasifican en dos grandes grupos:

- a) **Oxidantes:** el tetraóxido de osmio (ácido ósmico), el bicromato de potasio, ácido crómico, bicloruro de mercurio o “*sublimado corrosivo*”, ácido pícrico, ácido acético.
- b) **Reductores:** el formaldehído, el glutaraldehído, el alcohol etílico, el alcohol metílico.

La **acción oxidante o reductora** de los fijadores le confieren a las células ciertas condiciones que posibilitan una mejor aplicación de las sustancias colorantes, por ejemplo: el **alcohol etílico absoluto** conserva el glucógeno, el **bicloruro de mercurio** provoca que las anilinas colorean de manera más brillante a las fibras colágenas, el **bicromato de potasio** facilita la coloración de las mitocondrias, el **ácido acético** permite una mejor tinción de los núcleos, el **cloruro de calcio** conserva e insolubiliza parcialmente a los lípidos.

Los fijadores son:

- a) **Gaseosos:** como el formaldehído
- b) **líquidos:** como el ácido acético, al alcohol etílico, la acetona, etc.
- c) **sólidos:** como el bicloruro de mercurio, el bicromato de potasio, etc.

Condiciones de un buen fijador.

Una sustancia fijadora para que ejerza de manera eficiente y adecuada sus funciones debe poseer las siguientes condiciones:

- ❖ **Matar inmediatamente a las células**, impidiendo la aparición de los procesos autolíticos. Para tal fin el fijador debe poseer:
Un buen **poder de penetración**, que en contados instantes se introduzca con rapidez en el espesor de la muestra
Un buen **poder de difusión**, que no fije sólo la porción superficial de la muestra sino que alcance las porciones más profundas de la misma.
- ❖ **Producir cierta dureza a los tejidos** sin que se provoque excesiva retracción o hacerlos quebradizos y friables.
- ❖ **Debe de ser de fácil manipulación.**
- ❖ **No debe disolver componentes celulares.**
- ❖ **Que sea fácil de conseguir y que sea barato.**

Las soluciones fijadoras suelen ser *fijadores simples*, o *fijadores compuestos* (mezclas fijadoras) en las que utilizan más de una sustancia fijadora.

Ejemplo de fijador simple:

Formol o formalina. Está considerado como la sustancia fijadora de mayor uso en los laboratorios que realizan técnica histológica. El formol comercial consiste en una solución acuosa del gas formaldehído al 39 - 40%. Se presenta como un líquido claro, incoloro, que emite vapores sumamente irritantes para la conjuntivas y la mucosa respiratoria. Su acción fijadora se ejerce coagulando las proteínas.

Es un fijador que posee un **buen poder de penetración y difusión**. Mantiene de manera adecuada la estructura y facilita la coloración posterior de los componentes celulares y tisulares. Endurece bien las muestras. Conserva bastante bien a las grasas.

Se le emplea en una solución al 10% (10 del formol comercial y 90 partes de agua)

El tiempo de fijación de las muestras, dependiendo del tamaño de ellas, debe ser de 24 a 48 horas como mínimo y si es posible, en refrigeración.

Fijadores compuestos.

Una sola sustancia fijadora difícilmente reúne todas las condiciones para ejercer una buena fijación, por lo tanto es aconsejable usar mezclas fijadoras a través de las cuales se acrecientan las cualidades de un fijador y se atenúan sus defectos y desventajas.

A continuación se presentan algunos ejemplos de fijadores compuestos o mezclas fijadoras que se emplean con mayor frecuencia:

❖ **Formol - fosfato (formol tamponado):**
- solución de formaldehído (37% a 40%)-----100 ml
- agua destilada ----- 900 ml
- fosfato de sodio monobásico (NaH₂PO₄ - H₂O)----4.0 gr
- fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄)-----6.5 gr

Suele emplearse como un fijador de rutina, al igual que el formol al 10%. Posee un pH de 6.8 a 7.0 aproximadamente. Es ligeramente hipotónico.

❖ **Formol - bicloruro de mercurio.**
- solución de formaldehído (37% a 40%)-----150 ml
- agua destilada-----850 ml
- bicloruro de mercurio-----50 gr

Es recomendable usarlo para fijar tejidos hematopoyético y linfaticoreticular. El material nuclear se fija de manera precisa y nítida. Facilita la tinción de fibras colágenas y células conjuntivas mediante el empleo de colorantes que tienen como base a las anilinas. Se utiliza para los tejidos en los que se aplicará técnicas inmunohistoquímicas. Los tejidos no deben mantenerse mucho tiempo en fijación (no más de 48 horas) porque se endurecen demasiado. HgCl₂ es una sustancia que corroe el instrumental metálico. Antes de aplicar una tinción es necesario eliminar los pigmentos precipitados del bicloruro de mercurio en los tejidos.

❖ **Formol - cloruro de calcio.**
- solución de formaldehído (37% a 40%)-----100 ml
- cloruro de calcio-----10 gr
- agua destilada-----900ml

Se recomienda fijar las muestras en esta solución cuando se desean preservar lípidos, especialmente fosfolípidos: Antes de obtener los cortes, las muestras se incluyen en gelatina o se congelan directamente para seccionarlas con empleando microtomos de congelación o el criostato.

❖ **Líquido fijador de Bouin.**
- solución acuosa saturada de ácido pícrico-----750 ml
- solución de formaldehído (37% a 40%)-----250 ml
- ácido acético glacial----- 50 ml

Es un buen fijador de uso rutinario. Tiene un buen poder de penetración y de difusión. Ofrece resultados satisfactorios con ciertos tricrómicos como el de Masson. Pueden fijarse piezas de un centímetro de grosor y dos o tres centímetros de longitud. Se le emplea con resultados óptimos en la fijación de embriones y fetos pequeños pues ejerce cierto poder descalcificante. Dependiendo del volumen de la muestra, el tiempo de fijación será de 12, 24 a 48 horas.

Antes de la inclusión, es conveniente eliminar el ácido pírico de las muestras (tíne de color amarillo intenso a los tejidos)El lavado se hace con una solución de alcohol etílico al 70% a la que se añaden algunas gotas de una solución al 5% de carbonato de litio. El lavado finaliza cuando el alcohol litinado ya no muestra color amarillento.

❖ Líquido fijador de Zenker (Solución madre o stock)
- bicloruro de mercurio-----50 gr
- bicromato de potasio-----25 gr
- agua destilada -----1000 ml

La solución “madre” se puede guardar durante mucho tiempo. Cuando a ella se le añade ácido acético forma el

❖ Líquido de Zenker (solución de trabajo):
- solución madre (stock) de Zenker-----95 ml
- ácido acético glacial-----5 ml

En cambio, si a la solución “madre” de Zenker se le agrega formol comercial se convierte en

❖ Líquido fijador de Helly
- solución madre (stock) de Zenker-----90 ml
- solución de formaldehido (37% a 40%)-----10 ml

El formol se debe agregar antes de usar la mezcla, pues la acción reductora del formol inhibe la actividad fijadora del bicromato de potasio. Las muestras deben ser pequeñas y fijarse por un lapso no mayor de 24 horas, porque se endurecen en exceso, se disminuye la basofilia de los núcleos y se incrementa la acidofilia del citoplasma. Tiene una ventaja: preserva muy bien a los eritrocitos y a los *gránulos* de las *células de glándulas endocrinas*.

❖ Fijador de Carnoy,
- alcohol etílico absoluto-----60 ml
- cloroformo-----30 ml
- ácido acético glacial-----10 ml

Posee un excelente poder de penetración y de difusión. Las muestras delgadas de tejidos y órganos se fijan en dos o tres horas. Produce lisis de los eritrocitos. Es el fijador adecuado cuando se desea demostrar *glucógeno* y la tinción de núcleos y especialmente *chromosomas*.

CRITERIOS PARA OBTENER UNA BUENA FIJACIÓN.

a) **Elección del fijador.** La solución fijadora a utilizar depende del estudio que se quiere realizar. Para las preparaciones de tejidos y órganos, en las que interesan un estudio topográfico de los mismos, deben usarse fijadores con un buen poder de penetración y de difusión. Para estos casos se recomienda utilizar los líquidos de **Zenker, Bouin o Helly**: En caso contrario

se empleará la solución de **formol al 10% ó 15%** que permite obtener resultados satisfactorios. Líquido considerado como el “**fijador universal**” pues facilita el empleo posterior de cualquier otro fijador (postfijación) capaz de complementar su acción.

b) **Tamaño de las muestras.** El tamaño y grosor de las muestras deben ser pequeñas y delgadas, de 1cm² a 2 cm² y con un espesor de 2 mm a 5 mm, especialmente si se emplean fijadores con escaso poder de penetración y de difusión.

c) **Volumen del fijador.** Una proporción que es necesario emplear será de **1 a 20** (muestra – fijador). Será la más adecuada para garantizar una buena fijación.

d) **Tiempo de fijación.** El tiempo en la fijación es importante en dos aspectos.

I. El intervalo que media entre la interrupción del aporte sanguíneo y la inmersión de las muestras en la solución fijadora. Lo deseable es que las muestras se fijen inmediatamente después de obtenidas mediante una biopsia o que la necropsia se efectúe al poco tiempo de producida la muerte. Mientras más largo es este lapso, los procesos autolíticos que sufran los tejidos serán más evidentes.

II. Debe tenerse en cuenta el tiempo que permanecerán las muestras sumergidas en los fijadores. Este tiempo varía con relación al tipo de fijador que se utiliza; al tamaño y la naturaleza de la muestra y la temperatura de fijación. Por lo tanto los lapsos de fijación varían en rangos muy amplios. En cualquier circunstancia, siempre deben respetarse los tiempos recomendados para cada tipo de fijador para garantizar la conservación de una buena estructura celular y tisular de los tejidos.

e) **Temperatura de la fijación.** Es recomendable efectuar la fijación a bajas temperaturas (4° C.) dentro de un refrigerador y con la solución fijadora enfriada previamente. Este procedimiento retardará el tiempo de fijación pero disminuirá de manera notable la autólisis de los tejidos.

Fijación por perfusión.

Un método de fijación casi instantáneo es aquel que consiste en *perfundir los tejidos y órganos* de un animal con una solución fijadora. Este procedimiento se utiliza frecuentemente para fijar tejidos que serán procesados y examinados mediante el microscopio electrónico. La **perfusión** consiste en anestesiar el animal y, mediante un sistema especial de inyección y drenaje, reemplazar la sangre con una solución salina y después se inyecta el fijador. La fijación se hace en contados instantes para garantizar que los tejidos se fijaron rápidamente.

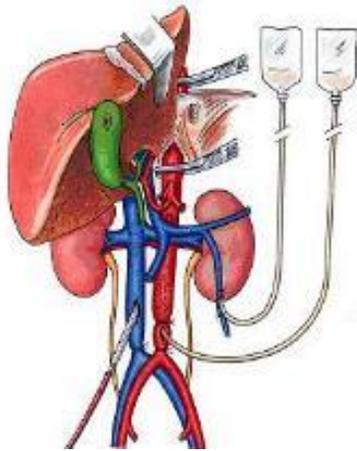


Fig Tec. de tinción: perfusión

f) **Almacenamiento de las muestras.** En ciertos casos los tejidos fijados no necesitan ser procesados inmediatamente para aplicarles otros pasos de la técnica histológica. Por lo tanto es conveniente almacenar y conservar los tejidos fijados para un uso posterior. Después de eliminar el fijador mediante un “lavado”, se guardan en una solución de alcohol al 70%. Así los tejidos pueden guardarse por un tiempo bastante largo sin que sufran modificaciones morfológicas notorias.

g) **Lavado de las muestras fijadas.** Al concluir la fijación, el fijador debe ser eliminado de las muestras. Para tal fin se procede al lavado de los tejidos mediante agua o alcohol. Se evita, así, que los tejidos se endurezcan demasiado o que ciertos componentes del fijador introduzcan modificaciones en los tejidos e impidan una adecuada obtención de secciones delgadas o la coloración correcta de sus componentes celulares.

C) INCLUSION.

Los tejidos fijados adquieren cierta consistencia y dureza, pero no la suficiente para que, de ellos, se obtengan secciones delgadas. Estas secciones, del orden de algunas milésimas de milímetro (5 a 10 μm), se conseguirán cuando los tejidos se infiltran con sustancias denominadas “de inclusión” y adquieran tal dureza que sometidos al filo de una navaja produzcan secciones, cortes o láminas sumamente delgados y transparentes.

Las *sustancias de inclusión* tienen la propiedad de incorporarse e infiltrarse al interior de las células y tejidos con la finalidad de servirles de soporte. Así los tejidos y la sustancia de inclusión forman un bloque homogéneo en dureza y consistencia, a pesar que sus componentes tuvieron originalmente distinta dureza.

Existen una serie de sustancias de inclusión que se han empleado o se utilizan actualmente. Unas son solubles en agua (gelatina, carbowax, glicol metacrilato) otras, solubles en solventes orgánicos (parafina, celoidina, resinas epóxicas).

Cualquiera que sea el medio de inclusión a emplear es condición indispensable que la muestra a incluir se encuentre embebida en la sustancia que disuelve al medio de inclusión

Inclusión en parafina. Después de la fijación y el “lavado” de las muestras, éstas se encuentran embebidas en agua o en alcohol, por lo que resulta imposible que se infiltran con **parafina**, medio de inclusión insoluble en agua y alcohol. Por lo tanto, para que los tejidos puedan ser incluidos en parafina se requiere deshidratarlos e infiltrarlos con el solvente de la sustancia de inclusión.

Los pasos a seguir para la inclusión de las muestras en parafina son:

- a) *Deshidratación*
- b) *Impregnación en el solvente (a este paso también se le denomina **aclaración** o **diafanización**)*
- c) *Inclusión y formación del bloque de parafina*

a) **Deshidratación.** Significa extraer o remover el agua de los tejidos fijados. La deshidratación debe ser completa porque, de lo contrario, el solvente no actúa de forma adecuada y el bloque de inclusión no alcanza la dureza requerida. Para tal fin se utilizan líquidos deshidratadores en los cuales se sumergen los tejidos. Los deshidratadores más usados son el *alcohol etílico*, el *alcohol isopropílico*, el *dioxano* y el *cloroformo*.

En el caso de la inclusión en parafina, las muestras se deshidratan en baños sucesivos en soluciones de concentración crecientes de **alcohol etílico**. El procedimiento de rutina es el siguiente:

- 1) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 2) alcohol etílico al 70 % ----- 12 horas
- 3) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 4) alcohol etílico al 95 % ----- 1 hora
- 5) alcohol etílico al 100 % (absoluto) -----1 hora
- 6) alcohol etílico al 100 % (absoluto)-----1 a 1.5 horas.

Nota: En cada caso es necesario agitar de vez en cuando los frascos que contienen las muestras

Los tiempos indicados son los que se aplicarán a las muestras de tamaño mediano (1 cm^2 x 0.5 cm. de grosor). Los tiempos pueden disminuirse o incrementarse si las piezas son más pequeñas o más grandes.

La deshidratación incompleta de los tejidos se comprueba cuando éstos al sumergirse en el líquido diafanizador muestran un aspecto turbio blanquecino

b) **Diafanización.** Las muestras deshidratadas se encuentran totalmente embebidas en alcohol etílico absoluto; pero la parafina tampoco es soluble en alcohol por lo que es necesario reemplazarlo por sustancias que sean capaces, simultáneamente, de mezclarse con el alcohol y disolver la parafina. Estas se denominan **líquidos diafanizadores o intermediarios**.
Ejemplos: xilol, tolueno, benceno, y el cloroformo.

El líquido diafanizador de uso más frecuente es el xilol

La actividad aclaradora o diafanizadora del xilol se emplea también en el procedimiento de coloración. La diafanización de los tejidos deshidratados se debe a que estas sustancias poseen un alto índice de refracción y al interactuar con los tejidos los vuelven transparentes.

El procedimiento de diafanización se realiza de la siguiente manera:

- 7) alcohol absoluto (50%) - xilol (50%)-----1 hora
- 8) xilol-----1 hora
- 9) xilol-----1 hora

Nota: las muestras deben agitarse continuamente para permitir la renovación de los líquidos.

c) **Inclusión y formación del bloque de parafina.** Las parafinas son hidrocarburos saturados provenientes de la destilación del petróleo. Generalmente son sustancias sólidas a temperatura ambiente. Existen diferentes tipos de parafina que se caracterizan por sus puntos de fusión. Estos oscilan entre 40° y 60° C. La parafina hierve a 300° C. y emite vapores que son muy inflamables. Las parafinas se clasifican en:

- ❖ **Blandas.** tienen un punto de fusión de 45° C - 52° C. Son recomendables para incluir tejidos en los se detectarán antígenos mediante **inmunohistoquímica**.
- ❖ **Semiduras.** Sus puntos de fusión son de 54° C - 58° C. Es la parafina que se emplea con mayor frecuencia en los laboratorios donde se realiza **técnica histológica**. De acuerdo a la temperatura del medio, se recomienda su uso pues se pueden obtener secciones de 5 a 7 de μm .
- ❖ **Duras.** Tienen un punto de fusión de 60° C - 65° C. Son parafinas que deben usarse en ambientes con climas de temperaturas altas.

La penetración de la parafina al interior de los tejidos se efectúa cuando ésta se encuentre en estado líquido. En el comercio las parafinas se expenden en forma de bloques discoidales, escamas, tabletas rectangulares o en forma de

grupos pequeños. Las parafinas, se disuelven usando estufas que las mantienen en ese estado. Las estufas permanecen a una temperatura constante, generalmente de 2° C a 4° C por encima del punto de fusión de la parafina a emplear.

La parafina diluida se coloca en tres recipientes dentro de la estufa. El primero, con una capacidad de 1000 a 1500 cc, recibirá a las muestras embebidas en xilol; la parafina reemplazará el xilol de las muestras y se infiltrará al interior de las mismas. Los otros dos recipientes son más pequeños (500 cc. de capacidad) y, de manera consecutiva recibirán a los tejidos. El último de ellos servirá para contener a las muestras antes del proceso de formación de los **“bloques”** de parafina. En el interior de la estufa debe existir otro recipiente conteniendo parafina líquida pura, que se empleará para la formación de los **“bloques”**.

El tiempo que permanezcan las muestras dentro de los recipientes de parafina dependerá de la naturaleza del tejido y el tamaño de las muestras. Se sugieren los siguientes lapsos:

- 10) Primer baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 11) Segundo baño de parafina-----1 a 1.5 horas
- 12) Tercer baño de parafina-----30 a 60 minutos

Nota: agitar las muestras con cierta frecuencia

La inclusión o formación del bloque de parafina se efectúa empleando moldes de diversos materiales y diferentes áreas y profundidades. Pueden ser de papel, metal o plástico. El bloque de parafina debe contener la muestra correctamente orientada para facilitar la obtención de las secciones o **“cortes”**.

El molde elegido se llena con parafina caliente pura; con una pinza calentada en un mechero se toma una pieza de tejido del tercer recipiente y se orienta una de sus superficies (aquella que se pondrá en contacto con el filo de la navaja) se sumerge al interior del molde, en el que la parafina ha empezado a solidificarse y se le aplica una leve presión. Después los moldes se enfrían de inmediato (se sumergen en agua fría o se introducen en el refrigerador) para que la parafina se solidifique de manera homogénea.

Todos los procedimientos mencionados, desde la deshidratación hasta la infiltración en los dos o tres recipientes de parafina líquida, se pueden efectuar de manera automática. Existen una serie de **“procesadores automáticos”** que facilitan estas tareas.

Igualmente existen instrumentos que contienen parafina fundida que la dispensan a voluntad del usuario para luego formar los bloques. Tienen anexos a ellos áreas o superficies que se mantienen calientes o frías, con la finalidad de orientar correctamente las piezas de los tejidos y posteriormente producir el enfriamiento rápido, la solidificación de la parafina y la formación del bloque.

D) MICROTOMIA (OBTENCIÓN DE LOS CORTES)

En esta etapa, los tejidos y la parafina integran un solo bloque que, posee la dureza y la consistencia suficientes para obtener secciones delgadas y transparentes.

Las secciones delgadas o “cortes” se obtienen utilizando instrumentos mecánicos diseñados para que en forma mas o menos automática, seccionen el bloque de parafina en cortes delgados y de grosor uniforme. Los instrumentos se denominan “**microtomos**”

El sistema de funcionamiento de los microtomos consta de cuatro mecanismos principales:

- ❖ *sujeción del bloque de parafina.*
- ❖ *sujeción de la navaja.*
- ❖ *El que permite que el filo de la navaja seccione al bloque en cortes delgados y de grosor uniforme.*
- ❖ *El de avance del bloque en un número determinado de micrómetros después que se ha obtenido un corte.*

Los microtomos se clasifican de acuerdo a la manera como se desplaza el bloque que contiene el tejido incluido; así, existen:

- a) **Microtomo de rotación tipo Minot.**
Mediante una manivela circular denominada **volante**, el mecanismo que sujeta al bloque de parafina se desplaza frente al filo de la navaja, de arriba hacia abajo y viceversa en un movimiento vertical.
- b) **Microtomo de deslizamiento.** El movimiento que se realiza para obtener los cortes es horizontal, es decir de atrás hacia adelante y viceversa. Generalmente el mecanismo que sujeta al bloque de parafina es el que se desplaza y a la navaja permanece estática.



Fig Tec. de tinción: Microtomo

Los microtomos **tipo Minot** son los de uso más frecuente en cualquier laboratorio donde se realiza técnica histológica, especialmente cuando los tejidos están incluidos en parafina. Los microtomos de **deslizamiento**, en cambio, se emplean cuando los tejidos están incluidos en celoidina o cuando la inclusión en parafina contiene porciones voluminosas de tejidos y órganos.

Los microtomos tipo Minot permiten obtener secciones delgadas, del orden de 4 a 7 μm de espesor. Producen **cortes seriados**, es decir, cuando se obtiene un corte, éste queda adherido por su borde anterior al borde posterior del que lo precedió; formándose de esta manera una cinta de cortes que va descendiendo por la superficie anterior de la navaja.

Los cortes seriados se emplean cuando se desea realizar reconstrucciones tridimensionales del órgano procesado, cuando se requieren comparar secciones vecinas, del tejido u órgano, coloreadas por diversas técnicas de tinción o cuando se hace el estudio microscópico topográfico en embriones y fetos.

Existen dos condiciones indispensables que garantizan la obtención de secciones delgadas, uniformes y seriadas:

- a) Que la deshidratación, impregnación e inclusión hayan sido realizadas correctamente.
- b) El empleo de una navaja o cuchilla muy bien afilada y asentada y que el filo de la misma ofrezca la inclinación adecuada hacia la superficie del bloque.

Las navajas o cuchillas de microtomía requieren de un afilado y un asentado muy cuidadoso, pues el mantenimiento del filo de ellas depende que se obtengan, con éxito, buenos cortes.

Las navajas se afilan utilizando **afiladores automáticos** que efectúan la operación en forma rápida y garantizan un afilado uniforme.

Para el afilado de las cuchillas se requieren una **placa de vidrio despulida** finamente y **sustancias abrasivas**.

Existen varios modelos de afiladores automáticos, pero todos ellos funcionan bajo ciertos mecanismos:

- a) movimiento y deslizamiento de las cuchillas sobre la superficie del vidrio despulido (movimiento rotatorio o de atrás hacia adelante y viceversa)
- b) movimiento y rotación periódica de las dos superficies de la cuchilla para enfrentarse de manera alternativa y similar a la superficie del vidrio con el abrasivo
- c) En ciertos modelos, la placa de vidrio también puede realizar movimientos restringidos de rotación

Las sustancias abrasivas suelen estar disueltas en agua o en aceite. Generalmente se emplean dos tipos de abrasivos: Unos, de **grano grueso**, utilizados para desgastar algunas melladuras visibles de las navajas y otros, de **grano fino** que sirven para afilar verdaderamente las navajas.

La perfección del afilado se obtiene cuando el filo de las navajas se asienta empleando, para tal fin, una superficie de cuero para “asentar”. Esta operación se realiza momentos previos a la obtención de los cortes.

Se recomienda, para una misma cuchilla:

- a) utilizar un solo afilador y si es posible la misma placa de vidrio despolido
- b) marcarlas de tal manera que siempre deben sujetarse al mecanismo del afilador conservando una posición y orientación determinadas

Esto impide que se formen facetas desiguales en el filo de la navaja produciéndose, con ello, un afilado deficiente.

Efectuado el afilado de las cuchillas, éstas deben limpiarse prolijamente, pues cualquier partícula de abrasivo que se quede adherido al filo de la navaja lo dañará y también al tejido, durante la microtomía.

En la actualidad se expenden en el mercado cuchillas descartables. Se venden en gran cantidad, generalmente por cientos, son relativamente baratas. Se emplean para obtener algunos cortes y luego se descartan. Ofrecen dos ventajas: no se requiere afilarlas y siempre el usuario tendrá un instrumento bien afilado.

Obtención de los cortes.

Para alcanzar este propósito se deben seguir los siguientes pasos

- a) Sujetar firmemente el bloque con el sistema de abrazaderas y la muestra orientada correctamente.
- b) Alinear el sistema de sujeción de la navaja y el filo de la misma, con la superficie de corte del bloque.
- c) Desgastar la superficie del bloque de parafina hasta alcanzar el tejido y se tenga la certeza de abarcar toda el área que se desea seccionar.
- d) Marcar en el dial del microtomo, el número de micrómetros de grosor que deben alcanzar los cortes.
- e) Accionar la manivela que desplaza la abrazadera con el bloque de parafina para obtener los cortes (aislados o seriados). Obtenidos los cortes se recogen cuidadosamente con unas pinzas o pinceles finos.



Fig Tec. de tinción: Microtomo, cinta transportadora, Baño de flotación

Extensión y adhesión de los cortes al portaobjetos. los cortes obtenidos, aislados o en forma de cintas, generalmente se presentan arrugados y muestran una área menor que la que poseen en la inclusión, por lo que es necesario extenderlos y luego adherirlos a las láminas portaobjetos (esto facilita su manipulación posterior).

Los cortes se extienden al depositarlos sobre la superficie del líquido extendedor contenido en un recipiente denominado “baño de flotación” (éste mantiene la temperatura entre 40° a 45° C). Las secciones se depositan en el líquido procurando que la superficie brillante (aquella correspondiente al filo de la navaja) se ponga en contacto con el líquido caliente. En caso que ciertas arrugas persistan, se emplean unas pinzas finas o un pincel de pelo de camello, para ejercer una ligera tracción entre los extremos de los cortes y así desarrugarlos totalmente.



Fig. Tec de tinción: Baño de flotación

Las secciones se extienden aisladas o formando cintas, estas se recogen y adhieren al portaobjetos de la misma forma; en el caso que se requiera recoger los cortes aislados, extendidos previamente como una cinta, deben separarse utilizando las mismas pinzas finas o agujas de disección.

Para garantizar una mejor adhesión de los cortes a los portaobjetos, se recomienda incorporar sustancias adherentes al líquido extendedor o, en ciertos casos, al portaobjetos. Estas sustancias suelen emplearse de dos maneras:

- a) Extensión previa de la sustancia adherente a una de las superficies de la lámina portaobjetos, por ejemplo, la **albúmina de Mayer**, constituida por partes iguales de glicerina y clara de huevo, a la mezcla se le añaden algunos **crisales de timol** como ingrediente conservante. La mezcla se filtra y se guarda en refrigeración. Se le utiliza extendiendo una gota de la mezcla en el portaobjetos y se deja secar. Los cortes se recogen cuidadosamente sumergiendo, por debajo de ellos, el portaobjetos en forma oblicua. Otra sustancia adherente que se emplea de la misma manera es la poli-L-lysina (solución de 25 miligramos de la sustancia en 25 ml de agua destilada). Una gota de la solución se extiende en el portaobjetos y éstos se secan a 50° - 55° C. durante toda la noche y está lista para su uso.

b) Al líquido de flotación se le añaden sustancias adherentes. Uno de los procedimientos más sencillos es el que consiste en disolver, en el agua ya caliente del baño de flotación (dos litros) 0.5 g de gelatina. En otros casos se emplea una solución que posee los ingredientes siguientes:

- agua destilada ----- 1,000 ml
- bicromato de potasio-----0.2 gramos
- gelatina -----0.2 gramos

El agua destilada se calienta a 60° C para disolver en ella la gelatina y el bicromato de potasio, sucesivamente. Se filtra y está lista para su uso.

Este líquido previamente filtrado se puede utilizar varias veces. (se recomienda guardarlo en el refrigerador).

Recogidos los cortes, éstos aún se pueden orientar aprovechando de la capa de líquido que queda entre el portaobjetos y los cortes. Posteriormente las láminas se apoyan en forma oblicua para que escurra el líquido sobrante y luego se colocan horizontalmente dentro de una estufa o encima de una plancha caliente (a 50° C aproximadamente). Después de unas 3 a 4 horas, el líquido se habrá evaporado totalmente y la sustancia adhesiva unirá firmemente el corte al portaobjetos.

E) COLORACION O TINCION.

Los cortes de los tejidos adheridos a los portaobjetos están listos para ser coloreados.

El procedimiento de coloración o tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiere específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante.

Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora.

El proporcionar color a las estructuras que constituyen un tejido o un órgano se hace con la finalidad de distinguirlos entre sí y facilitar su observación.

Si se examina al microscopio una sección de tejido sin colorear, ya adherida al portaobjetos, se podrá constatar que no es fácil discernir sus componentes, pues lo delgado de los cortes y la diafanización producida en los tejidos igualan sus índices de refracción. La coloración proporciona diferencias evidentes entre las estructuras y al observar los cortes será fácil reconocerlas.

Se denomina sustancia **colorante** a aquella que puede transferir su color a otro cuerpo.

Teoría de la coloración.

Existen dos teorías que explican el procedimiento de la coloración

- a) **Teoría física.** Considera que la coloración es un proceso físico de **adsorción**. Así, las partículas de las sustancias colorantes disueltas penetran en los espacios intra e intercelulares en los que se mantienen adheridas en razón de la cohesión molecular. Por ejemplo, la coloración de las **grasas o lípidos** es una tinción por adsorción; los **Sudanes III** o **IV** tiñen las grasas por la facilidad que tienen para disolverse en ellas.

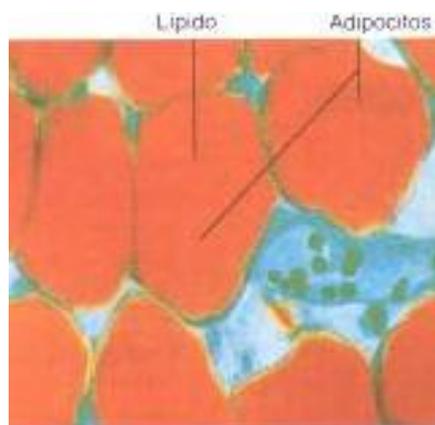


Fig Tec. de Tinción: Tejido adiposo teñido con Sudán

- b) **Teoría química.** El colorante se une a la sustancia coloreable combinándose con ella íntimamente debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares o tisulares que se unen respectivamente a los cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles. Una prueba de ello es el hecho de la casi imposibilidad de separar completamente el colorante de los componentes en donde ejerció su acción de tinción aún empleando sus líquidos solventes.

De acuerdo a esta teoría los colorantes se unen (ligan) a los tejidos por enlaces iónicos, covalentes o de hidrógeno.

El enlace iónico o electrostático ocurre cuando el colorante y la sustancia que se va a teñir, desarrollan diferentes cargas eléctricas y entonces se atraen una a la otra, por ejemplo, **el citoplasma** se colorea porque las **proteínas** citoplasmáticas poseen **carga eléctrica (+)** y las partículas del colorante tienen **carga eléctrica (-)**.

Clasificación de los colorantes.

Existen varios criterios para clasificar a los colorantes:

- a) **Por su origen.** pueden ser naturales y artificiales (sintéticos).

Colorantes naturales, se extraen de:

1) **Animales.** Como el **carmin**, que se extrae de la **cochinilla**, artrópodo parásito de los tallos del nopal (tuna). El carmin (de color rojo intenso) es uno de los colorantes naturales más empleado en la industria alimentaria y cosmética.

En técnica histológica se utiliza el **carmin de Best** para demostrar glucógeno, el **carmin de Mayer** para demostrar mucina; las células fagocíticas se evidencian con el **carmin de litio** (colorante vital).

2) **Vegetales.** Como la **hematoxilina**, obtenida de la corteza de un árbol, el “palo de campeche” (*Haematoxylum campechanum*), la **safranina** que se extrae de una liliacea (*pistilos de la flor de azafran*) o la **orceína** que se obtiene de un *liquen*.

Colorantes artificiales o sintéticos. Son productos derivados de la destilación de la hulla o carbón. Genéricamente se les conoce como colorantes **derivados de la anilina**.

Los colorantes artificiales son **sales**. Son compuestos orgánicos formados por las modificaciones que experimenta el anillo bencénico cuando se reemplazan dos átomos de hidrógeno por un átomo de oxígeno o con otro átomo o por un grupo químico que tenga enlaces de doble valencia en vez de uno, dando como resultado un compuesto coloreado.

La anilina es incolora, pero las modificaciones químicas producidas en el anillo bencénico le confieren, a los compuestos nuevos, un color determinado.

Los colorantes artificiales y sintéticos se clasifican en:

a) **Ácidos:** son sales cuya parte básica es incolora y el **componente ácido** posee color. Así, en el colorante **eosina** o **eosinato de sodio**, la propiedad colorante se debe al ácido eosínico y no a la base, el sodio.

Los colorantes ácidos tienen **carga eléctrica negativa**, por lo tanto la designación correcta es la de colorantes **aniónicos**. También se les conoce como **colorantes citoplasmáticos**, pues tiñen al grupo químico, cargado eléctricamente, localizado en un extremo de la cadena de aminoácidos que integran las proteínas citoplasmáticas.

Las sustancias que atraen eléctricamente a los colorantes ácidos se denominan **“acidófilas”** y químicamente están constituidas por componentes básicos o alcalinos.

Ejemplos: **la eosina, el amarillo de metanilo, la fucsina ácida, el ácido pícrico, el verde rápido, el naranja G, la safranina, el azul de anilina, etc.**

b) **Básicos.** Son **sales** que poseen la **base coloreada** e incolora la porción ácida; por ejemplo, **el azul de metileno** o **clorhidrato de azul de metileno**, debe su propiedad colorante a la **base azul de metileno** y no al ácido clorhídrico que es incoloro.

Poseen una **carga eléctrica positiva**, por lo tanto son colorantes **catiónicos**. Se les denomina también **colorantes nucleares**, pues tienen afinidad por los ácidos nucleicos (ADN y ARN). Las sustancias teñidas por los colorantes básicos se denominan **“basófilas”** y están constituidas por componentes ácidos.

Ejemplos: **la hematoxilina, el rojo nuclear, el azul de metileno, la tionina, el azul de toluidina, la fucsina básica.**

c) **Neutros.** Son sales en las que tanto la parte **básica** como la parte **ácida** proporcionan color. Por ejemplo el eosinato de azul de metileno o el eosinato de azul de metileno.

Estos colorantes tienen la propiedad de teñir de manera simultánea, a los componentes nucleares y a los citoplasmáticos, inclusive pueden proporcionar colores distintos (**metacromasia**) a determinados componentes citoplasmáticos como las granulaciones específicas de los granulocitos (cierto tipo de leucocitos).

Forman parte de las fórmulas colorantes para frotis de sangre como los colorantes de **Wright, May Grünwald, Giemsa, Leischman, etc.**

d) **Indiferentes.-** No forman sales. Son **compuestos no iónicos** incapaces de la disociación electrolítica.

Son insolubles en agua pero solubles en solventes orgánicos como el alcohol y también en las grasas o lípidos y, aunque ellos poseen color, en realidad estrictamente hablando no son colorantes.

Basándose en que son solubles en las grasas, estas sustancias se utilizan para demostrar la presencia de ellas en células y tejidos, pues tiñen selectivamente a los lípidos. Los ejemplos son: **El sudan negro, el sudán III y el sudán IV, El rojo oleoso.**

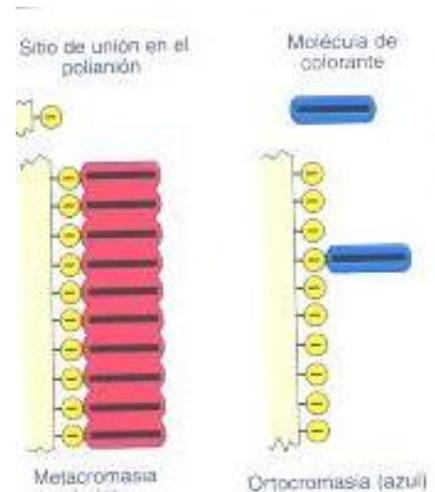


Fig Tec. de Tinción: a) Dibujo esquemático de la metacromasia, agregación de las moléculas colorantes sobre superpie de un polímero de alto peso molecular

Clasificación de las coloraciones.

Existen procesos a través de los cuales células y tejidos son coloreados por las sustancias colorantes. De acuerdo a ellos, las coloraciones se clasifican en:

a) **Coloración directa o sustantiva.** Se denomina así a la tinción que se ejerce sobre células y tejidos cuando éstos se ponen en contacto con la solución colorante, el resultado indica una verdadera afinidad entre el tejido y el colorante. Ejemplo: la tinción de los **núcleos** por el **azul de metileno**.

b) **Coloración indirecta o adjetiva.** Para que lleve a efecto la coloración es indispensable recurrir al empleo de sustancias intermediarias que faciliten la adhesión del colorante en las estructuras tisulares. La sustancia intermediaria que se utiliza se denomina "**mordiente**". El mordiente se aplica antes de la utilización de la solución colorante o puede formar parte de ella. La combinación que se efectúa entre el mordiente y el colorante se denomina "**laca**". La mayoría de las soluciones colorantes de **hematoxilina** requieren de un mordiente para que aquella proporcione color.

c) **Coloración progresiva.** Se refiere a la marcha misma de la coloración. Los tejidos se ponen en contacto con la solución colorante para que, conforme transcurre el tiempo de coloración, el tejido, de manera progresiva, alcance la intensidad de tinción deseada; en ese momento se detiene la coloración mediante lavado y la eliminación del colorante sobrante.

d) **Coloración regresiva.** En este caso los tejidos se sobrecolorean con el colorante para someterlos después a la acción de una sustancia denominada **diferenciador**, éste extrae parte del colorante y, mediante la observación al microscopio, se detiene el proceso de diferenciación cuando los componentes alcanzan la tinción deseada.

e) **Coloración simple.** Es el procedimiento en el que se utiliza un solo colorante para teñir algún componente celular o tisular. Por ejemplo, teñir los núcleos con tionina.

f) **Coloración compuesta o combinada.** Consiste en la aplicación, a una muestra de tejido u órgano, de varios colorantes con la finalidad de destacar, mediante colores diferentes, estructuras específicas que forman parte de ella. Puede ser:

❖ **Simultánea**, cuando en una misma solución de coloración se mezclan varios colorantes. En este caso los tejidos reciben la tinción en un solo evento, Ejemplos: las soluciones colorantes de algunos tricrómicos como el de **Van Gieson** (fucsina ácida y ácido pícrico) o el de **Mallory** (azul de anilina y naranja G) o el de **Shorr** (verde brillante, fucsina ácida y naranja G).

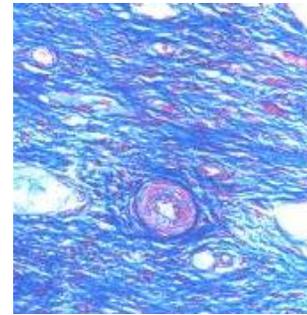


Fig Tec de tinción: Método de Mallory (tinción selectiva)

❖ **Sucesiva**, Consiste en aplicar a los tejidos soluciones sucesivas de varios colorantes, con la finalidad que ciertos componentes se tiñan con algunos de ellos. El ejemplo más demostrativo es la coloración de **hematoxilina eosina**, en ella los núcleos se tiñen con la hematoxilina y después la eosina se encarga de colorear al citoplasma.

g) **Coloración ortocromática.** Es la acción de tinción que ejerce un colorante al colorear una determinada estructura con su propio color. La gran mayoría de los colorantes producen coloración ortocromática.

h) **Coloración metacromática.** Es la tinción en la cual, un colorante además de ceder su propio color a una estructura celular o tisular también tiñe de color distinto a otras estructuras. La **tionina** y el **azul de toluidina** colorean de **azul** a los **núcleos** y a otras estructuras **basófilas** pero, al mismo tiempo, ciertos componentes tisulares como la **mucina**, la **matriz cartilaginosa** o el **ácido hialurónico** se tiñen de **violeta o rosado**.



Fig Tec de tinción: Medula espinal teñida con Tionina.

i) **Coloración pancromática.** Es producida por la actividad tintorial de los colorantes neutros. En este caso, las porciones básicas y ácidas ejercen su acción de tinción pero, además ciertos componentes celulares se tiñen de colores diferentes a los originales adquiriendo tonalidades que resultan de la mezcla de ellos.

El ejemplo más evidente de esta coloración se produce cuando se tiñen **frotis de sangre**. La utilización de las soluciones colorantes de Wright, May Grünwald, Giemsa o Leischman hace que las plaquetas y los leucocitos (granulocitos y mononucleares) muestren granulaciones específicas e inespecíficas fácilmente diferenciables por esta capacidad pancromática del colorante.

COLORACION DE HEMATOXILINA -EOSINA (H&E)

La coloración de *hematoxilina - eosina* se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, a través del microscopio fotónico.

Consiste en la tinción de:

- a) los **núcleos** mediante una *hematoxilina*, previamente oxidada y transformada en *hemateína* a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o fierro). Los **núcleos** se colorean de **azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro**, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron.
- b) el **citoplasma y material extracelular** utilizando la *eosina* que les confiere diversos grados de color **rosado**.

El procedimiento de coloración de H & E es el siguiente:

1. **Desparafinar** los cortes en
 - xilol ----- 3 minutos
 - xilol ----- 3 minutos
2. **Hidratar** los cortes en baños decrecientes de alcohol
 - alcohol absoluto (100°) -----3 minutos
 - alcohol absoluto (100°) ----- 3 minutos
 - alcohol de 95° ----- 3 minutos
 - alcohol de 95° ----- 3 minutos
 - alcohol de 70° ----- 3 minutos
 - agua corriente ----- 5 minutos.
 - agua destilada (2 baños)-----1 minuto (cada uno)
3. **Colorear** con la solución de *hematoxilina*. En este paso es conveniente respetar el tiempo de coloración que recomienda cada tipo de solución de hematoxilina. Dependiendo de la fórmula de preparación el tiempo puede variar de 3 a 20 minutos.
La hematoxilina de uso más frecuente es la *hematoxilina aluminica de Harris* -----3 a 5 minutos
4. **Lavado en agua destilada** (2 baños)-----**un minuto** cada uno.
5. **Diferenciar**, para eliminar el exceso de colorante, se emplea el *alcohol ácido*, hasta que los núcleos y los componentes basófilos de las células sean lo únicos que permanezcan teñidos
 - lavar en agua corriente----- 2 minutos
6. **Virar** al color azul, empleando soluciones de:
 - ❖ Sustancias alcalinas como agua amoniacal
 - ❖ Solución de bicarbonato de sodio al 2%
 - ❖ Carbonato de litio al 1%.
 - lavar en agua corriente ----- 5 minutos
 - lavar en agua destilada (2 baños) -----1 minuto c/u.

7. **Colorear** con una solución alcohólica o acuosa de *eosina*----- 3 a 5 minutos
8. **Deshidratar** en baños crecientes de alcohol etílico
 - alcohol de 70° ----- 1 minuto
 - alcohol de 95° -----1 minuto
 - alcohol de 95° -----1 minuto
 - alcohol absoluto (100°) -----1 minuto
 - alcohol absoluto (100°) -----2 minutos
9. **Diafanizar o aclarar** empleando xilol
 - xilol ----- 1 minuto
 - xilol ----- 2 minutos

En estas condiciones los tejidos están preparados para realizar en ellos el montaje.

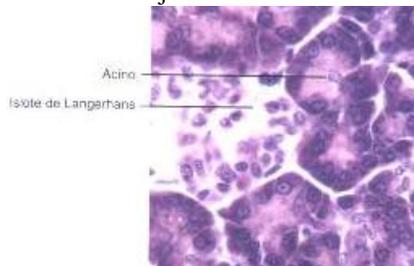


Fig Tec de Tinción: gamas de color del método de tinción H&E

F) MONTAJE.

Concluido el proceso de la tinción de los cortes, éstos se deben colocar en condiciones de protección y de poderlos utilizar infinidad de veces sin que se deterioren. Para alcanzar tales propósitos se recurre al último procedimiento que es el **montaje**.

Este procedimiento consiste en colocar encima del corte coloreado y diafanizado una gota de una sustancia adherente, diluida, generalmente en *xilol* (*resina natural como el bálsamo de Canadá o resinas sintéticas*, cuyos índices de refracción son similares a los del vidrio) y encima de ellos, una laminilla cubreobjetos, cuidando que no queden burbujas de aire entre la resina.

A continuación se deja que el xilol se evapore, y la resina adquiera solidez suficiente; para ello las láminas se colocan en una platina caliente (45° 50° C) durante 24 a 48 horas y estarán listas para ser observadas.

Existen otros procedimientos en la técnica histológica que permiten la observación de células y tejidos en los cuales no se utilizan colorantes naturales y/o artificiales. Estos procedimientos emplean sales de metales pesados, los cuales se contacto con los componentes celulares y tisulares y a través, de sustancias reductoras u oxidantes se depositan en algunas de ellas (precipitación o impregnación). Al conjunto de procedimientos se les conoce como **impregnaciones metálicas**