

Utilidad de las microondas en el laboratorio de Anatomía Patológica

COROMINAS TORRES, J. M.; MUNNE TORRAS, A.; SERRANO FIGUERAS, S.; LLORETA TRULL, J.;
NOGUEROLLES GARRIGÓS, A., y PRIETO BAENA, V. G.

Técnicos: GARCÍA AGUACIL, M.; LAVIRGEN MORENO, J., y OJEDA ARTEAGA, A.

Abstract

Microwave energy, as being part of the electromagnetic spectrum, is able to heat biological tissues without breaking their components' chemical bonds or dammaging their structure. Thus, the use of microwave oven in the Histopathology Laboratory can result in a reduction of fixation, embedding and staining times. The purpose of the present paper is to report our experience in the utilization of a microwave oven in the standart histopathology techniques.

KEY WORDS: Microwave. Fixation. Embedding. Staining.

PATOLOGIA 20, 288-294, 1987

INTRODUCCION

En la década de los setenta empezaron a publicarse trabajos en los que se utilizaban hornos de microondas de tipo doméstico con la finalidad de reducir el tiempo de fijación de los tejidos provenientes de piezas quirúrgicas y necrópsicas (2, 7). Con posterioridad se utilizaron las microondas en la fijación y tinción del sistema nervioso, en la fijación para microscopía electrónica, para cultivo de tejidos en animales de experimentación (5, 8, 9, 10), para acelerar el tiempo de inclusión en parafina (1), en la fijación para métodos de inmunohistoquímica (5) y en tinciones especiales (3, 9). Sin embargo, la implantación de dichos hornos en los laboratorios de Anatomía Patológica de nuestro país es escasa, a pesar de las numerosas ventajas que supone con respecto a los métodos convencionales.

Las técnicas analizadas en este trabajo son:

1. Métodos de fijación con fijadores simples (formol) y mezclas fijadoras (Dubosq-Brasil y B-5).
2. Métodos de inclusión en parafina (deshidratación, aclaramiento e inhibición).
3. Tinciones especiales: PAS para carbohidratos neutros, Rojo Congo para material amiloide, Kinouon para bacilos alcohol-ácido resistentes, Plata Metenamina para membranas basales, Grimelius para gránulos argirófilos, Fontana-Masson para gránulos argentafines, Grocott para hongos y Sevier Munger para fibras nerviosas.

MATERIAL Y METODOS

Para este trabajo hemos utilizado un horno de microondas de tipo doméstico de la casa Moulinex (FM

411), con una potencia máxima de 1.300 W. Este aparato presenta tres intensidades: 25, 50 y 75 %, que se corresponden en nuestro horno con unas temperaturas de 31, 46 y 72° C, respectivamente (cifras obtenidas a partir de 100 c. c. de agua destilada colocada en un frasco de vidrio de tipo Coplin durante un minuto). El horno de microondas lleva incorporado un reloj automático conectado a un mecanismo temporizador que desconecta el aparato.

Métodos de fijación: Para los métodos de fijación colocamos el tejido (que no debe sobrepasar los 5 mm. de grosor) junto a la solución fijadora (Formol tamponado 4%, Dubosq-Brasil, B-5) dentro de un recipiente de vidrio, ya que las microondas no son capaces de atravesar los elementos metálicos. Dicho recipiente, con el líquido fijador y el tejido se introduce en el horno de microondas con una intensidad y tiempo prefijados.

Las soluciones fijadoras utilizadas las preparamos a las siguientes concentraciones:

Formol tamponado 4 %

Formaldehído 35 %	334	ml.
Agua destilada	3	l.
Acetato sódico	66,66	gr.

Bouin alcohólico (Dubosq-Brasil)

Acido pícrico	2,5	gr.
Alcohol etílico 80 %	375	ml.
Formaldehído 35 %	150	ml.

Fijador B-5

Solución Stock:

Cloruro mercúrico	12	gr.
Acetato sódico	2,5	gr.
Agua destilada	200	ml.

Solución de trabajo:

Solución Stock	20	ml.
Formaldehído 35 %	2	ml.



FIG. 1.—Fragmento de vesícula biliar fijada en formol tamponado mediante horno de microondas (HE).

MÉTODOS DE INCLUSIÓN

La inclusión en parafina se realiza de la misma forma que la fijación, colocando el tejido en distintos recipientes de vidrio con alcoholes de graduación creciente (70°, 96°, absoluto), xilol y parafina.

MÉTODOS TINTORIALES

En los métodos tintoriales colocamos las preparaciones, una vez desparafinadas e hidratadas, en un frasco de Coplin con las soluciones oxidantes, mordientes, colorantes y reductoras. Es interesante apuntar que las preparaciones deben colocarse de forma perpendicular al foco de emisión del microondas, a no ser que el aparato posea en su interior una platina rotatoria, consiguiéndose entonces una exposición más uniforme a las mismas.

Los métodos utilizados en las diversas tinciones han sido:

- Acido periódico de Schiff de Mc Manus (PAS) (11).
- Rojo Congo, modificación de Puchtler al método de Bennhold (11).
- Tinción de Kinyoun para bacilos alcohol-ácido resistentes (11).
- Método de ácido periódico-Plata Metenamina de Gomori para membranas basales (11).
- Tinción de Grimelius para gránulos argirófilos (11).
- Tinción de Fontana-Masson para gránulos argentafines (11).
- Modificación de Grocott al método de Plata-Metenamina de Gomori para hongos (11).
- Método de Sevier-Munger para fibras nerviosas (11).

RESULTADOS

Fijación: Tanto el formol al 4% tamponado como las mezclas fijadoras (Dubosq-Brasil, B-5), en secciones con un grosor de 3-5 mm. y a una intensidad del 25% del horno de microondas, presentaban una fijación óptima a los tres minutos (fig. 1). En piezas de grosor inferior (1 mm.), la fijación se consigue entre los 60 y 90 segundos (con una intensidad del 25%). Si sobrepasamos estos tiempos, el tejido se retrae rápidamente y la solución fijadora entra en ebullición, eventualidad que siempre debe evitarse. Los fragmentos superiores a 5 mm. de grosor, con un tiempo de tres minutos de fijación, mostraban un artefacto por falta de acción del fijador en el centro del fragmento.

Inclusión en parafina: Los tiempos de inclusión se reflejan en la tabla I, donde se comparan con los convencionales de los incluidores automáticos. El tiempo de deshidratación total es de 15 minutos a una intensidad del 25%, el aclaramiento en xilol es de cinco minutos al 25% de intensidad y la inhibición en parafina se realiza en 15 minutos a la intensidad del 50% (fig. 2). Si el grosor de la pieza es de 1 mm., los tiempos se reducen a tres minutos en cada uno de los pasos. Debe vigilarse estrechamente, en cada paso que las soluciones no hiervan para evitar la producción de artefactos en el tejido. En caso de que ocurra es aconsejable sacar la solución con el tejido cada minuto, dejando enfriar la misma en períodos de 30 segundos, hasta completar el tiempo necesario.

Métodos tintoriales: Los resultados de los diversos tiempos e intensidades se muestran en la tabla II.

En la tinción de PAS para carbohidratos neutros colocamos en el microondas la solución oxidante de ácido

periódico al 0,5% durante cuatro minutos y el reactivo de Schiff durante un minuto, siendo la intensidad óptima del 25% y el ahorro de tiempo es de unos 35 minutos (fig. 3).

En la técnica de Rojo Congo para material amiloide colocamos en el microondas la solución alcalina durante cuatro minutos y la solución de Rojo Congo dos minutos, con una intensidad del 25%. El ahorro de tiempo en comparación con la técnica convencional es de 45 minutos.

En la tinción de Kinyoun para bacilos alcohol ácido resistentes se coloca la solución de carbolfucsina al 25% de intensidad durante 60-90 segundos, procurando que no hierva la solución. El tiempo ahorrado es de unos 60 minutos.

En los métodos de impregnación argéntica (tabla III) se observa una reducción de tiempo muy considerable en todos ellos. En la tinción de Plata-Metenamina para membranas basales se reduce el tiempo en la oxidación con ácido periódico (0,5%) a tres minutos (con una intensidad del 25%), y en la solución de plata metenamina, a 5-8 minutos con la misma intensidad. En esta tinción debe controlarse periódicamente el grado de impregnación (fig. 4).

En la tinción para gránulos argirófilos (Grimelius) se coloca en el microondas la solución impregnadora de nitrato de plata al 2% acuoso, en Buffer acetato (0,2 M pH 5,6), durante dos minutos al 50% de intensidad, en lugar de las 24 horas que se requieren en el método convencional; posteriormente se coloca en la solución reductora de hidroquinona y sulfato sódico durante cuatro minutos al 25% de intensidad (fig. 5).

En la tinción de Fontana-Masson para gránulos argentafines colocamos la solución impregnadora de nitrato

de plata durante tres minutos al 25% de intensidad, en lugar de los 30 minutos habituales.

Para la demostración de hongos (Método de Grocott) se coloca la solución oxidante (ácido crómico 5%) durante un minuto al 25% de intensidad y la solución de plata durante dos minutos a la misma intensidad (fig. 6).

La demostración de fibras nerviosas en material parafinado la podemos llevar a cabo por la técnica de Sevier-Munger; utilizamos el horno de microondas colocando la solución de nitrato de plata al 20% durante dos minutos y, posteriormente, la solución de plata amoniacal, dos minutos; todo ello al 25% de intensidad.

DISCUSION

Las microondas (radiaciones no ionizantes), dentro del espectro electromagnético, se encuentran en la banda de las ondas de radiofrecuencia, que se sitúan entre las ondas de radio FM y las radiaciones infrarrojas. Esta banda se extiende entre la frecuencia de 300 Megahertz y de 300 Gigahertz. En la utilización de las mismas con fines comerciales la frecuencia empleada es de 245 Gigahertz, con una longitud de onda de 12,4 centímetros (1).

La energía calórica que provoca las microondas se basa en su interacción energética con las moléculas dipolares, induciendo en ellas campos dieléctricos que causan una oscilación rápida de las mismas. Este incremento de movimiento, tanto intermolecular como intramolécula, aumenta la energía térmica y, por tanto, la temperatura.

Las moléculas dipolares afectadas son principalmente las de agua y las cadenas polares de proteínas; la acción

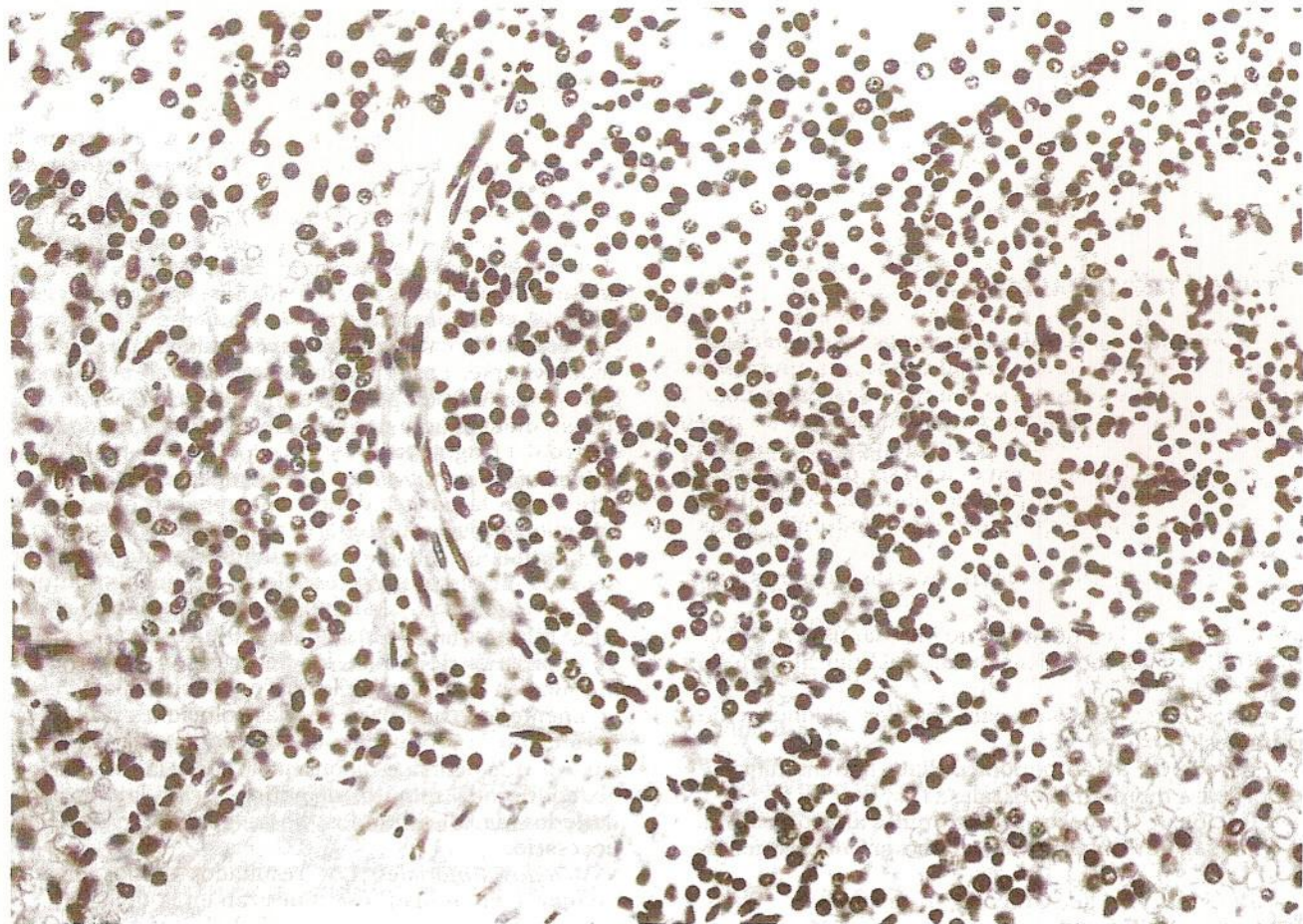


Fig. 2.—Biopsia de bazo incluida en parafina mediante horno de microondas (HE).



Fig. 3.—Mucosa endometrial, con tinción de PAS mediante horno de microondas.

de las microondas provoca en las primeras una oscilación dieléctrica de 2,45 billones de veces por segundo, produciendo una energía fotónica de 10^{-5} electronvolts, energía suficiente para aumentar la temperatura y realizar enlaces químicos no covalentes (nexos de hidrógeno e interacciones de tipo Van der Waals) y provocando en las cadenas proteicas la coagulación de las mismas (5).

Los mecanismos de las microondas en los procesos de fijación, inclusión y tinción no están definidos, aunque algunos autores (1) piensan que el aumento de temperatura que se produce tras la exposición a las microondas hace disminuir la viscosidad del tejido, consiguiendo una penetración e interacción más rápida de los diversos reactivos, disminuyendo el tiempo que se emplea en los distintos procesos.

Las primeras pruebas que se realizaron con hornos de microondas en los laboratorios de morfología fueron las técnicas de fijación (2, 6), aprovechando la propiedad de coagulación rápida de las proteínas gracias al calor y al aumento de la interacción química con los distintos fijadores. En nuestra experiencia debemos resaltar tres factores importantes a tener en cuenta en dicho proceso y que se hallan estrechamente relacionados, y son, el grosor de la muestra, el tiempo de fijación y la intensidad del horno de microondas.

Al igual que en los métodos convencionales un grosor excesivo en el tejido provoca que el fijador no llegue a penetrar suficientemente hasta el centro del mismo; y este fenómeno se halla en relación con la velocidad de penetración de cada fijador y del tipo de tejido.

El tiempo de fijación se relaciona con el grosor, tipo de tejido, características del fijador y temperatura. En la utilización del horno de microondas y debido al progresivo aumento de temperatura que se produce en el mismo es importante obtener una buena fijación en el menor tiempo posible, lo que podemos conseguir utilizando tejidos con el menor grosor posible.

La intensidad del horno de microondas está relacionada con la temperatura; dependiendo de cada tipo de aparato, por lo que es necesario comprobar la temperatura a cada intensidad del horno y con diferentes volúmenes de líquidos. La temperatura utilizada en la fijación debe de ser la menor posible, con el fin de evitar artefactos por sobrecalentamiento de las muestras.

Nosotros hemos obtenido buenos resultados de fijación en piezas de grosor no superior a los 5 mm., con tiempos de tres minutos y a una intensidad del 25% con nuestro aparato (31-41°C). En piezas con grosor de 1 mm. el tiempo de un minuto es suficiente para una buena fijación.

Los métodos de fijación no sólo se han utilizado en microscopía óptica, sino también en microscopía electrónica. En estos casos la fijación en glutaraldehído se realiza, según autores, entre 9 y 60 segundos (7, 4). Este método de fijación es óptimo para la conservación de las vesículas de transporte y de las proteínas lábiles. Mediante estudios de análisis estereológico realizados a nivel óptico y ultraestructural no se han observado diferencias en la conservación de tejidos fijados mediante los métodos habituales y los que utilizan hornos de microondas.

Las microondas también se han utilizado en la fijación de tejidos para una posible realización de técnicas de

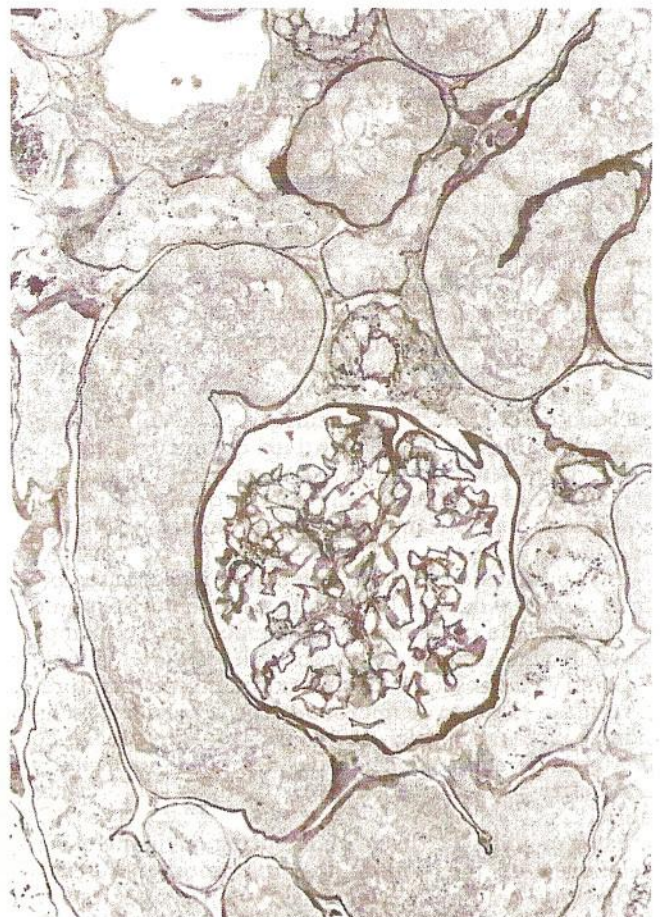


Fig. 4.—Biopsia renal con tinción de Plata-Metenamina para membranas basales, mediante horno de microondas.

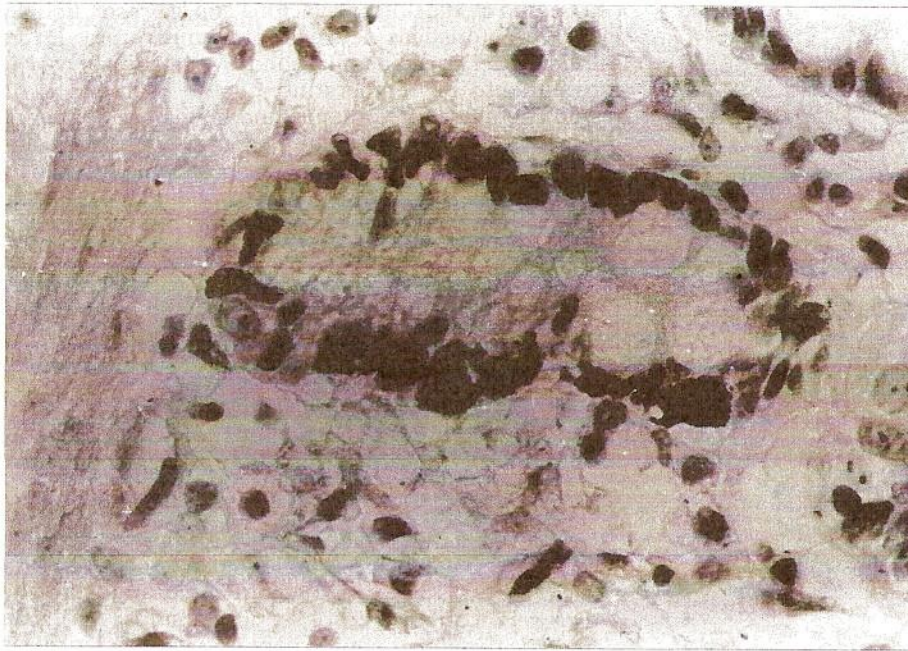


Fig. 5.—Mucosa de intestino delgado con tinción de Grimelius para gránulos argirófilos, mediante horno de microondas.

inmunohistoquímica, como indica Login y col. (5). Estos autores observan que en los tejidos fijados mediante microondas no es preciso realizar una posterior acción enzimática (tripsina, pepsina, saponina) para la detección de algunos antígenos como las Keratinas, CEA o Proteína asociada al factor VIII.

El método de inclusión en parafina puede acortarse considerablemente con el uso del horno de microondas. Los tiempos empleados en las soluciones de inclusión observados por nosotros son similares a los obtenidos por Boon y col. (1). Durante el proceso de deshidratación debe controlarse estrictamente el tiempo y la temperatura de los alcoholes, ya que éstos también actúan como fijadores de tipo coagulativo y, por tanto, causan una desnaturalización de las proteínas, provocando un endurecimiento del tejido. La acción deshidratante debe realizarse, al igual que en los métodos convencionales, mediante soluciones crecientes, pues el reemplazamiento brusco del agua de las cadenas peptídicas produce una importante retracción tisular.

Asimismo, debe vigilarse que no se produzca ebullición, tanto en la deshidratación como en el aclaramiento con xilol. De producirse ésta es conveniente sacar el recipiente del interior del horno y dejarlo enfriar unos segundos antes de volverlo a introducir en el mismo. Para evitar este contratiempo se puede introducir la solución en el microondas en períodos cortos de tiempo, alternando con enfriamientos, hasta completar el tiempo adecuado.

En la inhibición en parafina debemos vigilar la temperatura, que no debe hallarse muy por encima del punto de fusión de la parafina que utilizemos, pues el tiempo de inhibición depende del grosor y del tipo de tejido.

Como ya hemos indicado anteriormente, otros autores (8) utilizan el horno de microondas en la fijación e inclusión de piezas para microscopía electrónica, obteniendo una considerable reducción del tiempo de inclusión y polimerización con los diversos tipos de resinas utilizadas.

Estos métodos de fijación e inclusión mediante el uso del horno de microondas los utilizamos en nuestro laboratorio en casos de material biopsico y necrópsico que se precise un diagnóstico rápido, ya que esta técnica supera en calidad a las secciones conseguidas mediante congelación. En cambio, en los métodos tintoriales utili-

zamos de rutina el horno de microondas, debido al ahorro de tiempo y a la alta calidad de las coloraciones.

La acción de las microondas en los mecanismos físico-químicos de las tinciones es poco conocida; variando, probablemente, factores como son la interacción iónica de las soluciones colorantes y la temperatura, lo que hace aumentar la velocidad de la tinción.

Los métodos tintoriales no tan sólo pueden efectuarse en tejidos, sino que nosotros también los utilizamos en muestras de citología o incluso, como indica Hafiz (4), en tinciones de Zielh Neelsen y en extensiones microbiológicas.

Hemos seleccionado en este trabajo las tinciones especiales que se realizan con más frecuencia (PAS, Rojo Congo, Kinyoun) y en las que los tiempos son algo prolongados; lógicamente, la utilización del horno de microondas puede efectuarse con cualquier tipo de tinción, como por ejemplo la de Perls para hierro (3), aunque en esta técnica los tiempos convencionales son más cortos. Hemos de repetir aquí la necesidad de evitar la ebullición de las soluciones colorantes, debiendo tener una mayor preocupación en las soluciones de tipo alco-



Fig. 6.—Parénquima pulmonar con tinción de Grocott para hongos mediante horno de microondas.

TABLA I.—TIEMPOS UTILIZADOS PARA LA INCLUSION EN PARAFINA MEDIANTE HORNOS DE MICROONDAS

	INTENSIDAD H. M.	TIEMPO H. M.	TIEMPO CONVENCIONAL
Alcohol 70	25 %	5 m.	2 h.
Alcohol 96	25 %	5 m.	4 h.
Alcohol 100	25 %	5 m.	4 h.
Xilol	25 %	5 m.	4 h.
Parafina	50 %	15 m.	4 h.

H.M.: Horno de Microondas.
m.: Minutos.
h.: Horas.

TABLA II.—TIEMPOS EMPLEADOS MEDIANTE H. M. EN METODOS TINTORIALES

TINCIONES	INTENSIDAD H. M.	TIEMPO H. M.	TIEMPO CONVENCIONAL
PAS			
Acido periódico	25 %	4 m.	20 m.
Reactivo de Schiff	25 %	1 m.	20 m.
ROJO CONGO			
S. alcalina	25 %	4 m.	20 m.
S. Rojo Congo	25 %	2 m.	30 m.
KINYOUN			
S. Carbol-Fucsina	25 %	60-90 s.	60 m.

H.M.: Horno de microondas.
m.: Minutos.
s.: Segundos.

TABLA II.—TIEMPOS EMPLEADOS EN TECNICAS DE IMPREGNACION ARGENTICA MEDIANTE HORNO DE MICROONDAS

TINCIONES	INTENSIDAD H. M.	TIEMPO H. M.	TIEMPO CONVENCIONAL
PLATA-METENAMINA			
Acido periódico	25 %	3 m.	20 m.
Plata-Metenamina	25 %	5-8 m.	60 m.
GRIMELIUS			
S. Plata	50 %	2 m.	24 h.
S. Reductora	25 %	4 m.	1 m.
FONTANA-MASSON			
S. Plata	25 %	3 m.	30 m.
GROCOTT			
Acido Crómico	25 %	1 m.	60 m.
S. Plata	25 %	2 m.	30 m.
SEVIER-MUNGER			
S. Plata	25 %	2 m.	15 m.
S. Plata-amoniaca	25 %	2 m.	30 m.

H.M.: Horno de microondas.
m.: Minutos.
h.: Horas.

hólico, ya que su punto de ebullición es inferior al de las acuosas.

En las técnicas mediante impregnación argéntica, nuestros resultados son similares a los hallados por otros autores (3); observando al igual que ellos un menor grado de precipitado inespecífico y tinción de fondo, que va apareciendo al ir alargando los tiempos de incubación.

Creemos, por tanto, que la utilización del horno de microondas en los laboratorios de Anatomía Patológica, aparte de un bajo costo y una utilización sencilla y práctica, suponen una considerable disminución de los tiempos de fijación, inclusión y tinción, así como ausencia de artefactos tisulares y tintoriales con respecto a los métodos convencionales, lo que hace que sea un instrumento útil en nuestros laboratorios.

RESUMEN

Las microondas, como parte del espectro electromagnético, son capaces de calentar los tejidos sin romper los enlaces químicos de sus componentes ni alterar su estructura. Aprovechando esta propiedad, podemos utilizar los hornos de microondas de tipo doméstico en los laboratorios de Anatomía Patológica, con el fin de disminuir los tiempos de fijación, inclusión y tinción. En este trabajo comentamos nuestra experiencia en la utili-

zación de los hornos de microondas aplicados a las técnicas más usuales del laboratorio.

BIBLIOGRAFIA

1. BOON, M. E.; KOK, L. P., and OUWERKERK-NOORDAM, E.: «Microwave stimulated diffusion for fast processing of tissue reduced dehydrating, and impregnating times». *Histopathology*, 10: 303-309, 1986.
2. BERNARD, G. R.: «Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation». *Stain Technology*, 49: 215-224, 1974.
3. BRINN, N. T.: «Rapid metallic histological staining using Microwave oven». *Journal of Histotechnology*, 6: 125-129, 1983.
4. HAFIZ, S.; SPENCER, R. C.; LEE, M., and DIERDEN, B. I.: «Rapid Ziehl-Neelsen staining by use of Microwave oven». *The Lancet*, 11: 1046, 1984.
5. LOGIN, G. R., and DVORAK, A. M.: «Microwave energy fixation for electron microscopy». *Am. J. Pathol.*, 120: 230-243, 1985.
6. LOGIN, G. R.; SCHNITT, S. J., and DVORAK, A. M.: «Rapid Microwave energy fixation for immunoperoxidase staining». *Lab. Investigation*, 56: 45A, 1987.
7. MAYERS, C. P.: «Histological Fixation by microwave heating». *J. Clin. Pathol.*, 23: 273-275, 1970.
8. MCLAY, A. L. C.; ANDERSON, J. D., and McMEEKIN, W.: «Microwave polymerisation of epoxy resin: rapid processing technique in ultrastructural pathology». *J. Clin. Pathol.*, 40: 351-352, 1987.
9. PATTERSON, M. K. Jr., and BULARD, R.: «Microwave fixation of cells in tissue culture». *Stain Technology*, 55: 71-75, 1980.
10. PETRERE, J. A., and SCHARDEIN, J. L.: «Microwave fixation of fetal specimens». *Stain Technology*, 52: 113-114, 1977.
11. SHEEHAN, D. C., and HRAPCHAK, B. B.: *Theory and practice of Histotechnology*. The C. V. Mosby Company. St. Louis, 1980.