

LABORATORIO DE ANATOMIA PATOLÓGICA

El Laboratorio de Anatomía Patológica realiza dictámenes periciales correspondientes a las siguientes incumbencias:

- a) Estudio macro-microscópico en órganos para la determinación de causa de muerte intraútero o postnatal.
- b) Estudio macro-microscópico del aparato genital femenino para la determinación de signos histológicos de gestación, de lesiones traumáticas y/o infecciones.
Estudio macro-microscópico sobre restos ovulares (embrionarios).
Estudio macro-microscópico de restos fetales y placentarios.
Determinación de malformaciones congénitas. Docimasias. Muerte perinatal.
- c) Estudio macro-microscópico de órganos, piel y tejidos blandos en casos de asfixia mecánica-traumática (ahorcadura o estrangulación). Cuadros de asfixia.
- d) Estudio macro-microscópico de lesiones en piel y órganos por armas blancas, armas de fuego, por paso de corriente eléctrica y acción de calor. Diagnóstico de vitalidad y cronología de las lesiones.
- e) Estudio macro-microscópico de órganos en casos de muertes de causas dudosas para la posible determinación de etiología. Diagnóstico de neoplasias benignas, malignas, de procesos infecciosos y degenerativos.
- f) Estudio de restos óseos para la determinación de especie, sexo, edad, talla y patología asociada. Estudio macro-microscópico de trazos fracturarios, de los bordes de los orificios de entrada y salida de heridas producidas por armas de fuego.
- g) Estudio microscópico para la determinación de plancton en sangre de cavidades cardíacas izquierdas, en médula ósea y/o en medio acuoso en casos de muerte por sumersión.

OTRAS ACTIVIDADES

Además de la actividad pericial desarrollada en relación a diferentes hechos acaecidos en el ámbito de la Provincia de Buenos Aires y de la colaboración prestada para la resolución de peritajes correspondientes al Poder Judicial de otras Jurisdicciones Nacionales, la Sección participa activamente en los cursos de formación y capacitación organizados por la Dirección General de Asesorías Periciales en el ámbito del Poder Judicial de la Provincia de Buenos Aires.

También, colabora con las distintas Unidades Académicas de la Universidad Nacional de La Plata, mediante clases explicativas desarrolladas en el Laboratorio y con profesionales de otros organismos oficiales para su entrenamiento en diferentes temas.

Asimismo, los profesionales del sector, para su actualización y capacitación concurren periódicamente a Cursos, Jornadas y Congresos –nacionales e internacionales- de la especialidad.

MODO DE ENVIO DE LAS MUESTRAS.

Las muestras que se reciben en el Laboratorio de Anatomía – Patológica, deben remitirse en envases o recipientes de plástico de boca ancha y tapa a rosca o en bolsas especiales plásticas con un sistema de cierre inviolable, en solución fijadora (solución de formol al 10%), la cual debe ser aproximadamente 10 veces el volumen del material remitido a temperatura ambiente, pudiendo conservarse, de esta manera, por tiempo indefinido. Nunca se debe guardar en frío (heladera +4°C o freezer) el material que ya contiene formol, debido que el mismo congelado forma cristales que alteran las estructuras hísticas impidiendo, de esta manera, el ulterior estudio microscópico.

Los líquidos corporales (pleurales, pericárdicos, peritoneales), estos deben ser remitidos antes de las 24hs en envases de plásticos, con tapa a rosca y conservados en frío (heladera +4°C) o bien con el agregado al material de alcohol 96° o formol a temperatura ambiente.

Para el estudio de plancton, el mismo se puede llevar a cabo en muestras de sangre obtenida por punción de las cavidades cardíacas izquierdas, de la médula ósea y en el agua del lugar del hecho, debiendo ser colocadas en envases limpios y secos. La remisión del material se debe hacer respetando la cadena de frío (heladera +4°C).

Los pelos deben ser remitidos en sobres o bolsas de papel a temperatura ambiente.

En cuanto a los restos óseos, deben ser remitidos en cajas de cartón, secos y a temperatura ambiente.

En lo que respecta a preparados histológicos y tacos de parafina, deben ser remitidos en cajas y embalados a temperatura ambiente.

El material, tal como lo establece el Acuerdo 3378/78 de la Suprema Corte de Justicia, debe remitirse rotulado, indicando: Tipo de muestra, nombre de la víctima, número de IPP, fiscalía interviniente, departamento judicial y Sección de destino (en este caso particular, Anatomía Patológica).

FIJACION DE LAS MUESTRAS (FUNDAMENTO DEL USO DE FORMOL EN ANATOMIA PATOLÓGICA)

Las células y los tejidos separados del organismo comienzan a experimentar alteraciones estructurales debido a la anoxia, modificaciones del ph, procesos de autólisis por acción enzimática, que, conforme transcurre el tiempo, se acentúan.

Por eso, para conseguir preparaciones duraderas se somete a los tejidos a la acción de sustancias químicas que detengan en forma rápida esos procesos y que, al mismo tiempo, conserven la estructura que los elementos histológicos presentan en vida. Los reactivos que cumplen esta finalidad se denominan *fijadores*.

Son generalmente sustancias químicas que coagulan o precipitan los prótidos celulares, endurecen los tejidos y facilitan el tratamiento posterior. Un buen fijador impide la alteración de las estructuras no dando alteraciones artefactuales, no debe dificultar la coloración posterior, sino conservar o acrecentar su afinidad con los

colorantes, no debe retraer excesivamente los tejidos, ni volverlos friables o quebradizos, poseer alto poder de penetración para asegurar una fijación correcta y económica. El empleo de fijadores reductores (formol, alcohol metílico y etílico) permite resultados satisfactorios tanto en el núcleo como el citoplasma celular.

Un buen fijador de rutina es el **formol**. La formalina pura es una solución concentrada al 40% del gas formaldehído en agua. Se prepara una solución al 10% o al 15% (10 o 15ml de solución de formaldehído, 90ml de agua corriente para hacerla más alcalina).

La fijación se realiza a temperatura ambiente y de un tiempo aproximado en 24-48hs aproximadamente. Hay otros fijadores como el Bouin y de Carnoy (este último disuelve la mayor parte de la grasa y es útil para la identificación de ganglios linfáticos en las piezas de resección radical).

El volumen del fijador debe ser al menos diez veces el del tejido. El tejido no debe ser congelado una vez que ha sido colocado en solución fijadora porque se producirá una distorsión en cristales de hielo. El punto de congelación de la solución de formalina al 10% es de -3°C.

Se estima la velocidad de fijación en 1mm/hora. A veces, con el fin de acelerar la fijación, se recomienda hacerlo entre los 35°C y 40°C.

EL PERITAJE-SALA DE MACROSCOPIA

El peritaje se inicia con la apertura de los envases recibidos. El comienzo se realiza en la fecha y horario ya pautado por aplicación del artículo 247 del CPP por el perito designado mediante el sistema informático de la mesa de entradas de los laboratorios (GAP).

Se procede a realizar la descripción macroscópica detallada de envases y del material biológico contenido en los mismos. Previamente se pueden tomar fotografías y/o radiografías del material a ser estudiado, para luego comenzar a realizar la disección macroscópica y la selección de cortes.

Todo el procedimiento es realizado en forma conjunta entre personal técnico y profesional (patólogos).

Las muestras deben ser descriptas, medidas, pesadas, detallar la presencia de alguna anomalía y su localización.

Las muestras deben ser manipuladas sobre una tabla de cortar limpia, utilizando instrumental limpio, sin manchas, para no contaminar una muestra con un fragmento de otra.



- MACROPATH CON SISTEMA PARA CAPTURA DE IMÁGENES MACROSCÓPICAS.



LUPA BINOCULAR ESTEREOSCÓPICA PARA PIEZAS MACROSCÓPICAS.

MUESTREO PARA EL EXAMEN HISTOLÓGICO.

La mayoría de las piezas de tejidos sólidos se cortan en forma de fragmentos que miden 10mm a 15mm por 2mm o 3mm de espesor, sino no serán adecuadamente infiltrados por la parafina, el técnico histológico los orientará en una posición plana en el bloque de parafina y no tiene importancia cual lado es cortado. En órganos huecos necesitan ser incluidos de canto para ver todo el espesor de la pared. Debe evitarse el sobrellenado de la cápsula o no se embeberá el tejido. El material de sutura, broches de metal y otros cuerpos extraños como esquirlas óseas o metálicas deben ser retirados de los tejidos o se dañará la cuchilla del micrótopo. De la misma manera, deben extraerse las áreas de calcificación u osificación o deberán ser descalcificadas. Si los fragmentos de tejido son pequeños, corren el riesgo de escaparse a través de las perforaciones de la cápsula y deben ser envueltos en papel de filtro y también es aconsejable colorearlos con hematoxilina.

Es importante el conocimiento de la localización de donde fueron tomados los cortes para el examen microscópico, especialmente cuando hay que determinar si existe tumor en los márgenes quirúrgicos, la determinación de los márgenes quirúrgicos se facilita pintándolos con tinta china, ya sea en fresco o luego de la fijación.

Cumplido el tiempo de fijación se retiran las muestras y se procede al lavado con agua corriente durante aproximadamente 5hs.

PROCESAMIENTO DE TEJIDOS.

Los tres pasos del procesamiento de tejidos (deshidratación, aclaramiento e infiltración) son pasos secuenciales designados para remover toda el agua que se puede extraer de los mismos y reemplazarla con un medio que se solidifique.

A) DESHIDRATACIÓN

Es necesario que se quite el agua de las muestras para que luego se puedan cortar con el micrótopo. La deshidratación se obtiene con alcohol etílico de graduación creciente, comenzando por el alcohol 70°, luego tres alcoholes 96° (para completar las 24hs.). Luego tres alcoholes de 100° (durante 24hs aproximadamente). Recordando que la deshidratación incompleta perjudica la inclusión y, en cambio, la permanencia prolongada en alcohol absoluto no altera las piezas, es preferible emplear el tiempo de permanencia en el baño de deshidratación.

Los procesadores automáticos de tejidos perfeccionan el procesamiento mediante el uso de calor, vacío, presión, y agitación, también logran que tengan lugar durante la noche sin la presencia del personal, éste método es el utilizado en el laboratorio.

B) ACLARACIÓN.

Terminada la deshidratación las muestras se hallan embebidas en alcohol absoluto. La parafina, que debe penetrarlos, es insoluble en el alcohol, de ahí la necesidad de un líquido intermediario que sea miscible al mismo tiempo en el alcohol 100° y la parafina.

Se utiliza para este fin el xilol.

Cuando las muestras se hallan impregnadas en solvente, adquieren una acentuada transparencia, considerándose a esta como índice de penetración.

C) IMPREGNACIÓN EN PARAFINA (IMBIBICION)

Es necesario mantener tres recipientes con parafina de 58°C-60°C de punto fusión, en forma líquida. El tiempo total de procesamiento está estimado en un mínimo de 3-4hs a 24hs, según el tamaño de la muestra.



PROCESADOR AUTOMÁTICO PARA TEJIDOS.

INCLUSIÓN DE TEJIDOS.

Es el proceso de rodear un tejido con una sustancia firme, tal como la cera, para poder obtener secciones bien delgadas. La parafina es el medio de inclusión más común.

Los centros de inclusión son sistemas multifuncionales que usualmente incluyen un proveedor de parafina, un tanque para mantener las muestras, una placa de temperatura tibia para orientar la muestra en parafina derretida y una placa fría para transformar la parafina derretida en un bloque sólido, luego que la muestra haya sido orientada, siendo este método el utilizado en nuestro Laboratorio.



CENTRO DE INCLUSION.

MICROTOMÍA.

La elección de las cuchillas para el micrótopo (acero inoxidable o descartables) depende de la estructura de la muestra.

Los cortes óptimos son de 4 a 6 micrones; se depositan los cortes con su cara brillante hacia abajo sobre un portaobjeto con albúmina y agua, se extiende el corte con un pincel seco y se ayuda con una aguja histológica. Los cortes son llevados a una estufa de 37°- 47°C durante 20 minutos.

DESPARAFINIZACIÓN.

Como la parafina impide la coloración, corresponde eliminarla, utilizando, para tal fin, solventes como el xilol. Los cortes están completamente deshidratados y, como se emplea un colorante en solución acuosa, resulta necesaria su hidratación previamente con alcoholes de graduación decreciente hasta llegar al agua (xilol, alcohol 100°, 96°, 70° y agua destilada).

HEMATOXILINA-EOSINA.

Hay dos métodos de hematoxilina, de Mayer y de Harris.

La cromatina nuclear se tiñe con la solución de hematoxilina, se deja el portaobjeto en la solución, durante 5 minutos, el corte toma color pardo que luego se vira con agua corriente y cambia al azul.

Existen varios tipos de tinción del citoplasma con eosina, unas solubles en agua y otras en alcohol, entre las primeras (más aconsejables) denominadas amarillentas.

Secuencia de tinción:

- Xileno.
- Xileno.
- Alcohol 100°.
- Alcohol 100°.
- Alcohol 96°.
- Alcohol 96°.
- Alcohol 80°.
- Agua destilada.
- Hematoxilina Mayer.
- Agua corriente.
- Agua destilada.
- Alcohol 80°.
- Eosina
- Alcohol 96°.
- Alcohol 96°.
- Alcohol 100°.
- Alcohol 100°.
- Xileno.
- Xileno.
- Montar.

MEDIOS DE MONTAJE.

El paso final en la preparación de una lámina portaobjetos es el de cubrir la porción que contiene el tejido con un cubreobjetos. Esto hace que la lámina sea permanente y permite el examen microscópico. Para pegar la laminilla hay tres medios de montaje que se pueden usar: resinas naturales (bálsamo de Canadá), resinas sintéticas (usadas en la actualidad) y medios acuosos (estos últimos se usan en estructuras alteradas por la deshidratación o de medios basados en xileno como tinciones para lípidos).

TÉCNICAS ESPECIALES.

a) *Tejido conectivo:*

- Coloración tricrómica de Gomori.
- Coloración tricrómica de Masson.

b) *Hidratos de Carbono.*

- Ácido Peryódico-Schiff (PASS).

c) *Microorganismos.*

- Método de Ziehl-Neelsen para bacterias ácido-alcohol-resistente. - Giemsa.



ESTUFA DE CULTIVO (SECADO) PARA PREPARADOS HISTOLÓGICOS.

REMISIÓN Y CONSULTA DE PREPARADOS.

El material en el cual se hace el diagnóstico patológico es de naturaleza permanente (corte microscópico) y puede ser evaluado por diferentes observadores o por el mismo observador en diferentes momentos.

Todos los cortes y los tacos de parafina deben ser archivados indefinidamente. Cada vez que se reciba una pieza en el Laboratorio debe buscarse en los archivos si hay material previo. Si existiera tal material, deben revisarse los cortes y los informes (control de calidad). Es importante para el patólogo pedir los preparados de los casos que ya fueron diagnosticados en otras instituciones y estos deben ser revisados por el mismo y emitirse un informe formal.



FOTO MICROSCOPIO CON PROGRAMA PARA CAPTURA DE IMÁGENES HISTOLÓGICAS.

CONTROL DE CALIDAD

Para asegurar la confiabilidad de los resultados emitidos es necesario realizar controles de calidad internos, como manejo de las muestras con procedimientos de rutina, una cadena de custodia, poseer archivos de preparados histológicos y tacos de parafina con números correlativos y un archivo de muestras biológicas ya estudiados en los depósitos correctamente acondicionados.