

## Utilización de los hornos de microondas en las técnicas de plata para el sistema nervioso

J.M. COROMINAS, M.A. GARCÍA-ALGUACIL\*, S. XARRIE\* Y C. GARRIDO-BUXEDA\*

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital del Mar. \*Instituto de Formación Profesional La Guineueta. Barcelona.

### SUMMARY

*Microwave oven utilization with silver impregnation techniques for nervous system.*

*The present study deals with the optimization of several silver impregnation techniques for neurofibers performed in tissue blocks (Cajal's silver nitrate-pyridine, Bielchowsky's method, Cajal's reduced nitrate and hydroquinone method for cerebellum), all of them performed with the aid of a microwave oven, with allows an important reduction of length in fixation and impregnation (from days to minutes), and results in good impregnation quality and lack of artifacts.*

Key words: Silver impregnation techniques. Nervous system. Microwave oven.

### INTRODUCCION

Cada vez es más frecuente en la práctica diaria, el uso de hornos de microondas en los laboratorios de Anatomía Patológica. Se utilizan principalmente en las tinciones especiales histoquímicas, lo que permite obtener una reducción considerable en el tiempo empleado, y ofrece muchas veces una mayor intensidad de las mismas y una importante disminución de los artefactos.

En una anterior publicación (1) expusimos la metodología empleada en nuestro laboratorio, en el proceso de fijación e inclusión de muestras, así como en la metódica de distintas tinciones especiales de uso frecuente en histopatología.

La complejidad, laboriosidad y, a menudo, larga duración de las técnicas de plata, que se emplean para poner de manifiesto estructuras del sistema nervioso, nos ha llevado a estudiar y optimizar algunas de estas técnicas, mediante el uso de hornos de microondas, con la finalidad de intentar reducir, en lo posible, los tiempos empleados y conseguir resultados satisfactorios con las mismas.

---

Correspondencia: Dr. J.M. Corominas. Anatomía Patológica. Hospital del Mar. Paseo Marítimo, 25-29. 08004 Barcelona.

### MATERIAL Y METODOS

El material del estudio fue obtenido de secciones de córtex cerebral y cerebelo de material necrótico, de enfermos sin patología del sistema nervioso.

El horno microondas utilizado era de tipo doméstico, de la casa Moulinex, modelo Microchef FM 2735 T Electronic, con una potencia máxima de 850 w. Este aparato presenta tres intensidades: 25, 50 y 75%, que se corresponden en este horno a unas temperaturas de 35, 50 y 75°C respectivamente (cifras obtenidas a partir de 100 cc de agua destilada colocados en un vaso de precipitado de cristal durante un minuto). El horno microondas lleva incorporado un reloj automático conectado a un mecanismo temporizador que desconecta el aparato.

Las técnicas estudiadas han sido:

Técnica del nitrato-piridina (Cajal)

Técnica de Bielchowsky

Técnica del nitrato reducido de Cajal

Técnica de hidroquinona para cerebelo

En todas estas técnicas se realizó la tinción en bloque tisular, por lo que la fijación y coloración se realizó con fragmentos de tejido con un espesor entre 3 y 4 mm.

En todos los casos, se realizó por una parte de la forma clásica y por otra con el horno microondas.

En este apartado enumeraremos las técnicas

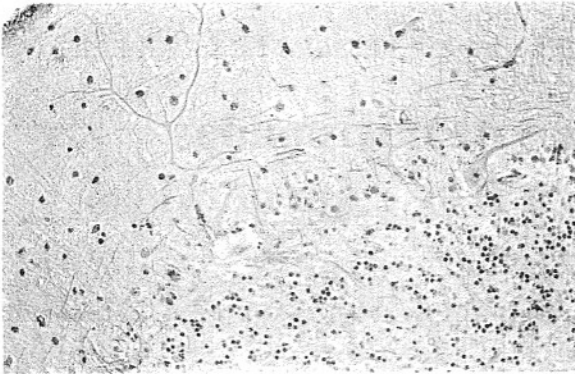


Figura 1. Fibrillas nerviosas, sección de cerebelo (Nitrato piridina de Cajal).

utilizadas por el método clásico, expondremos las realizadas con el uso del horno de microondas en el apartado de resultados.

#### Técnica de la fórmula de nitrato piridina (Cajal)

Esta técnica, es similar al método de Levaditi para visualizar treponemas, se basa en la impregnación mediante nitrato de plata y reducción posterior y utiliza la piridina para obtener una mejor penetración de la tinción.

Con este método podemos poner de manifiesto tanto las prolongaciones nerviosas como las neurofibrillas (4).

#### Metodología:

- 1.- Sumergir el tejido en formol al 12% durante dos días.
- 2.- Lavado en agua corriente durante 12 horas.
- 3.- Inmersión en alcohol etílico de 36% durante 24 horas.
- 4.- Inmersión en la solución de nitrato de plata piridina al 2% en la estufa a 37°C durante 2 ó 3 días.  
Solución de nitrato de plata al 2%..... 50 cc  
Piridina pura..... 5 ó 6 gotas
- 5.- Reducir en piroformol común.  
Acido pirogálico o hidroquinona..... 1 gr.  
Agua destilada..... 70 cc.  
Formol..... 10 cc.
- 6.- Lavar en agua destilada.
- 7.- Cortar mediante microtomo de congelación o incluir en parafina a partir de alcohol de 96°, en este último caso, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar.

#### Técnica de Bielchowsky

Este método para la demostración de neurofibrillas, se realiza en bloque tisular y se basa en la impregnación de las mismas mediante óxido de plata amoniacal y posterior reducción con formol (4).

#### Metodología:

- 1.- Fijación de las piezas en formol neutro al 15-20%

durante 20 días o más.

- 2.- Lavado de las mismas, durante 12 horas en agua corriente.
- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Sumergir en la solución de nitrato de plata al 2 ó 3% durante 24 a 48 horas.
- 5.- Lavar en agua destilada.
- 6.- Sumergir en la solución de óxido de plata amoniacal durante 20 minutos hasta que adquiera un color tabaco claro  
Nitrato de plata al 10%..... 5cc  
Hidróxido potásico al 40%..... 5 gotas  
Amoniaco..... hasta disolver el precipitado  
Agua destilada..... 25 cc
- 7.- Lavar con agua destilada.
- 8.- Sumergir en formol al 20%, pocos segundos.
- 9.- Virar en solución de oro, durante 25 minutos  
Cloruro de oro al 1%..... 3 gotas  
Agua destilada..... 10 cc  
Acido acético..... 3 gotas
- 10.- Lavado rápido en hiposulfito sódico al 5%.
- 11.- Lavar en agua destilada.
- 12.- Cortar en microtomo de congelación o incluir en parafina a partir de alcohol de 96°, realizar cortes de 4 ó 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar.

#### Técnica del nitrato de plata reducido de Cajal (1903) sin fijador

Este método fue introducido por Cajal para demostrar neurofibrillas y terminaciones nerviosas. La técnica se basa en la impregnación tisular en nitrato de plata caliente y posterior reducción con hidroquinona (4).

#### Metodología:

- 1.- Inmersión, durante 3 ó 4 días, de los fragmentos de tejido nervioso en solución acuosa de nitrato de plata al 2% en la estufa entre 34 y 37°C.  
(deben adquirir un color tabaco)
- 2.- Lavar durante un minuto en agua destilada.
- 3.- Reducir en la siguiente solución durante 24 horas.  
Hidroquinona..... 1 gr.  
Agua..... 70 cc
- 4.- Lavado rápido en alcohol de 96°.
- 5.- Cortar mediante microtomo de congelación o incluir en parafina, a partir de alcohol de 96°, realizar cortes de 4 ó 5 micras en el microtomo, desparafinar y montar.

#### Técnica de hidroquinona para cerebelo (Cajal, 1925)

Esta técnica impregna muy bien la estructura general de todo el cerebelo, sobre todo las fibras musgosas, los bulbos y cálices de Held (médula y bulbo raquídeo), así como fibras nerviosas (4).

Este método se realiza en bloque tisular.

**Metodología:**

- 1.- Fijación en formol al 12% desde tres días en adelante.
- 2.- Sumergir durante 4 a 6 horas en una solución compuesta de:
  - Nitrato de plata al 2%..... 10 cc
  - Piridina pura..... 7 gotas
  - Alcohol de 96°..... 6 cc
 En caso de no ennegrecer suficientemente durante el tiempo prescrito, se puede calentar durante unos minutos en la lámpara de alcohol.
- 3.- Lavado rápido en alcohol de 96°.
- 4.- Reducción de 1 a 3 minutos en la solución
  - Hidroquinona..... 0,3 gr.
  - Agua destilada..... 70 cc
  - Formol..... 20 cc
  - Acetona..... 15 cc
- 5.- Lavar varias veces con agua destilada, 5 minutos cada vez.
- 6.- Virar con cloruro de oro (1:500).
- 7.- Fijar en hiposulfito sódico al 5%.
- 8.- Cortar en microtomo de congelación o incluir en parafina, a partir de alcohol de 96°, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar.

**RESULTADOS**

Exponemos aquí, los resultados de las distintas técnicas realizadas mediante el horno de microondas con los tiempos óptimos obtenidos en las distintas pruebas realizadas.

**Técnica de la fórmula de nitrato piridina**

- 1.- Fijación en formol al 12% durante 2 días. (Este proceso se puede acelerar también utilizando el horno de microondas, colocando en la segunda intensidad, durante 5 minutos, la solución, al baño maría, en el interior del horno de microondas).
- 2.- Sumergir en agua corriente y colocar en el microondas durante 3 minutos en la segunda intensidad (45°C).
- 3.- Sumergir en alcohol etílico de 36% y colocar en el microondas durante tres segundos en la segunda intensidad.
- 4.- Inmersión en la solución de nitrato de plata piridina (ver técnica tradicional) y colocar en el microondas durante 1,5 minutos en la segunda intensidad.
- 5.- Reducir en piroformol común.
- 6.- Lavar en agua destilada.
- 7.- Cortar mediante microtomo de congelación o incluir en parafina a partir de alcohol de 96°, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar (fig. 1).

**Técnica de Bielchowsky**

- 1.- Fijación en formol neutro al 15 ó 20% durante 5

- minutos en el horno de microondas en la segunda intensidad (colocar el recipiente al baño maría).
- 2.- Lavado en agua corriente durante 5 minutos en el microondas, en la segunda intensidad (colocar el recipiente al baño maría).
- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Sumergir en la solución de nitrato de plata al 2% durante 5 minutos en el microondas, en la segunda intensidad (colocar el recipiente al baño maría).
- 5.- Lavar en agua destilada.
- 6.- Sumergir en solución de óxido de plata amoniacal (ver técnica convencional), durante 2 ó 3 minutos, en el microondas en la segunda intensidad (colocar el recipiente al baño maría).
- 7.- Lavar en agua destilada.
- 8.- Sumergir en formol al 20% pocos segundos.
- 9.- Virar con solución de oro (ver técnica tradicional), durante 2 minutos en el microondas en la segunda intensidad (colocar el recipiente en el baño maría).
- 10.- Lavado rápido en hiposulfito sódico al 5%.
- 11.- Lavado en agua destilada.
- 12.- Cortar con el microtomo de congelación o incluir en parafina a partir del alcohol de 96%, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar (fig. 2).

**Técnica del nitrato de plata reducido de Cajal (1903) sin fijador**

- 1.- Inmersión en solución de nitrato de plata al 2%, durante 5 minutos en el microondas a la segunda intensidad.
- 2.- Lavar durante un minuto en agua destilada.
- 3.- Reducir en solución de hidroquinona (ver técnica tradicional), durante 5 minutos en el microondas a la segunda intensidad.
- 4.- Lavado rápido en alcohol de 96%.
- 5.- Cortar con el microtomo de congelación o inclusión en parafina, a partir del alcohol de 96%, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar (fig. 3).

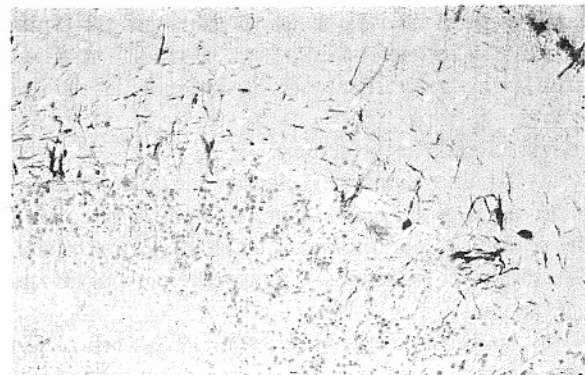


Figura 2. Fibrillas nerviosas, sección de cerebelo (técnica de Bielchowsky).

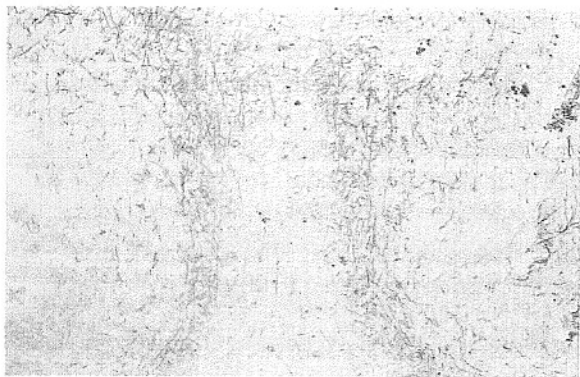


Figura 3. Fibrillas nerviosas, sección de cerebelo (técnica de nitrato reducido sin fijador).

### Técnica de hidroquinona para cerebelo

- 1.- Induración en el formol al 12% durante 4 minutos en el microondas a la primera intensidad.
- 2.- Se sumergen en solución de plata (ver técnica tradicional), durante 3 minutos en el microondas en la primera intensidad.
- 3.- Paso rápido por alcohol de 96%.
- 4.- Reducción de 1 a 3 minutos en solución de plata (ver técnica tradicional).
- 5.- Lavar varias veces en agua destilada, 5 minutos cada vez.
- 6.- Virar con cloruro de oro (1:500).
- 7.- Fijar con hiposulfito sódico al 5%.
- 8.- Cortar en microtomo de congelación, incluir en parafina a partir del alcohol de 96%, realizar cortes de 4 a 5 micras con el microtomo, desparafinar y montar (fig. 4).

### DISCUSION

Como ya indicábamos en una anterior publicación (1), el efecto de las microondas (ondas electromagnéticas, de unos 12.4 cm de longitud de onda y una frecuencia de 2.45 Ghz), actúan en el tejido, sobre todo a nivel de las moléculas de agua y de las cadenas proteicas dipolares, confiriéndoles a las mismas campos dieléctricos, que les causan una oscilación rápida, con lo que aumenta la energía térmica y por tanto la temperatura. Esta energía puede también realizar enlaces químicos no covalentes y producir la coagulación de las proteínas.

Algunos autores (3) piensan que la acción de las microondas produce una disminución de la viscosidad del tejido, que permite una interacción y penetración más rápida de los reactivos y disminuye así el tiempo del proceso.

Mayers (4) describió en el año 1970 la utilización de microondas en la fijación tisular, aprovechando su propiedad de coagulación proteica, que al disminuir el tiempo necesario para la fijación evita la pérdida y destrucción de glucoproteínas lábiles. Actualmente, la

fijación mediante microondas se puede realizar simplemente con un líquido tampón (5) (estabilización sin fijador químico), o bien mediante los líquidos fijadores comunes (6).

La fijación mediante microondas se ha extendido también a la microscopía electrónica (7) y a la inmunohistoquímica (8,9). En esta última, podemos suprimir la acción de agentes proteolíticos, lo que mejora la intensidad de la inmunorreactividad de muchos de los anticuerpos.

Posteriormente la utilización de las microondas se amplió a los métodos de inclusión en parafina y sustancias plásticas (3,10), también con una considerable reducción en los tiempos de los mismos.

En todos los procesos en que se utilicen hornos microondas, deben tenerse en cuenta dos aspectos. El grosor del tejido, dado que el índice de profundidad de penetración de los diversos líquidos fijadores, deshidratantes y colorantes utilizados son distintos (11), (por ejemplo: Agua a 25°C: 2,3 cm; Etanol a 25°C: 5,0 cm). El grosor óptimo será el que no sobrepase el doble de su profundidad de penetración. El otro factor a tener en cuenta es la temperatura, debido a que cada tejido tiene una temperatura óptima (12) en la que actúan los líquidos fijadores, deshidratantes y colorantes. La dificultad de tratar cada tejido por separado a su temperatura más adecuada, obliga en la práctica a no sobrepasar los 60°C de temperatura.

En nuestra práctica diaria, utilizamos el horno de microondas, para la fijación, en los casos en que es preciso un diagnóstico rápido, o como postfijación en alguna tinción o en inmunohistoquímica (9). A nuestro modo de ver, la mayor utilidad de los hornos microondas se centra en los métodos de tinción, con la finalidad de reducir los tiempos de los mismos, aunque todas las técnicas histoquímicas pueden acelerarse con las microondas (1,13,14), nosotros sólo las utilizamos en las tinciones que precisan largos tiempos de realización o en biopsias peroperatorias (15).

Por este motivo, intentamos optimizar una serie de técnicas, utilizadas en neurohistopatología, para la

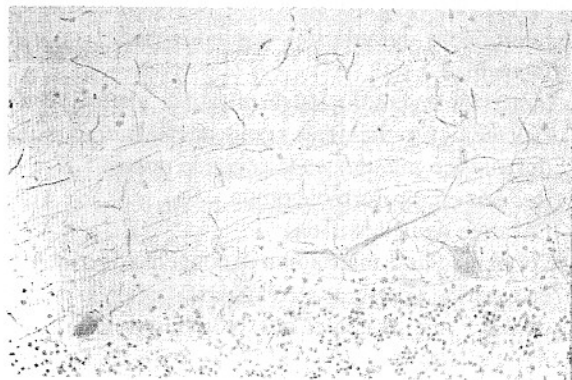


Figura 4. Fibrillas nerviosas, sección de cerebelo (técnica de hidroquinona).

detección de prolongaciones nerviosas y neurofilamentos, todas ellas realizadas en bloque tisular y basadas en la acción de la plata, puesta de manifiesto tras la acción de un agente reductor (argirofilia).

Las cuatro tinciones estudiadas, realizadas por los métodos clásicos, requieren fijaciones que duran días (20 días en la técnica de Bielchowsky), así como impregnaciones argénticas también de días de duración (2 a 4 días). La utilización de los hornos de microondas reducen a unos 5 minutos los tiempos de fijación y entre 1,5 y 5 minutos los tiempos de impregnación metálica.

Los resultados, una vez optimizados los tiempos, fueron repetitivos, sin artefactos, con escasos precipitados inespecíficos de plata en relación a las técnicas convencionales.

Como normas generales a seguir, deben destacarse las de utilizar material limpio y lavado previamente con agua destilada, no utilizar elementos metálicos y evitar el contacto de las soluciones de plata, una vez preparadas, con la luz durante mucho tiempo. Hay que recordar que en el interior del horno microondas no pueden introducirse elementos metálicos ni plásticos. Debe tenerse la precaución de vigilar que no se produzca ebullición de los líquidos en el interior del horno de microondas: para evitarlo, se puede colocar la solución al baño maría, o bien segmentar los tiempos de exposición.

## RESUMEN

Se han optimizado algunas técnicas de plata, en bloque tisular, para la demostración de terminaciones nerviosas y neurofibrillas (Método de nitrato de plata piridina de Cajal, método de Bielchowsky, método de nitrato reducido de Cajal y método de hidroquinona para cerebelo), mediante el uso de hornos de microondas, consiguiendo una considerable reducción de los tiempos de fijación e impregnación (de días a minutos), obteniendo una buena calidad de impregnación y ausencia de artefactos.

*Palabras claves:* Técnicas de impregnación de plata, sistema nervioso, horno microondas.

## BIBLIOGRAFIA

1. Corominas JM, Munné A, Serrano S, Lloreta J, Nogueroles A, Prieto V. Utilidad de las microondas en el laboratorio de Anatomía Patológica. *Patología* 1987; 20: 288-294.
2. Cajal SR, de Castro F. Elementos de técnica micrográfica del Sistema Nervioso. Ed. Salvat Editores. Barcelona, 1972: 103-116.
3. Boon ME, Kok LP, Ouwkerk-Noordam E. Microwave stimulated diffusion for processing of tissue reduced dehydrating, and impregnating times. *Histopathology* 1986; 10: 303-309.
4. Mayers CP. Histological fixation by microwave heating. *J Clin Pathol* 1970; 23: 273-275.
5. Filipe MI, Lake BD. *Histochemistry in Pathology*. Filipe M.I. General principles of fixation. Churchill Livingstone. Edinburg London Melbourne and New York. 1990: 7.
6. Petrere JA, Schärdein JLL. Microwave fixation of fetal specimens. *Stain Technology* 1977; 52: 113-114.
7. Login GR, Dvorak AM. Microwave energy fixation for electron microscopy. *Am J Pathol* 1985; 120: 230-243.
8. Login GR, Schnitt SJ, Dvorak AM. Rapid Microwave energy fixation for immunoperoxidase staining. *Lab Investigation* 1987; 56: 45A.
9. Shan-Rong S, Marc EK, Krishan LK. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histo Cyto* 1991; 39: 741-748.
10. Mclay ALC, Anderson JD, Mcmeekin W. Microwave polymerisation of epoxy resin: rapid processing technique in ultrastructural pathology. *J Clin Pathol* 1987; 40: 351-352.
11. Merck Diagnóstica. Procedimientos de tinciones con el horno microondas. Instrucciones de trabajo para la histología. Manual laboratorios Merck 1990.
12. Bernard GR. Microwave irradiation as a generator of heat for histological fixation. *Stain Technology* 1974; 49: 215-224.
13. Brinn NT. Rapid metallic histological staining using Microwave oven. *J Histotechnology* 1983; 6: 125-129.
14. Hafiz S, Spencer RC, Lee M, Gooch H, Duerden BI. Rapid Ziehl-Neelsen staining by use of Microwave oven. *The Lancet* 1984; II: 1046.
15. Dworak O, wittekimd C. A 30-S PAS stain for frozen sections. *The American Journal of Surgical Pathology* 1992; 16: 87-88