

XTOSUNIVERSITAR

TEXTOS UNIVERSITARIOS
CIENCIAS SANITARIAS

HISTOETIQUETA

ATLAS - GUÍA PRÁCTICA DE
HISTOLOGÍA. 2ª edición

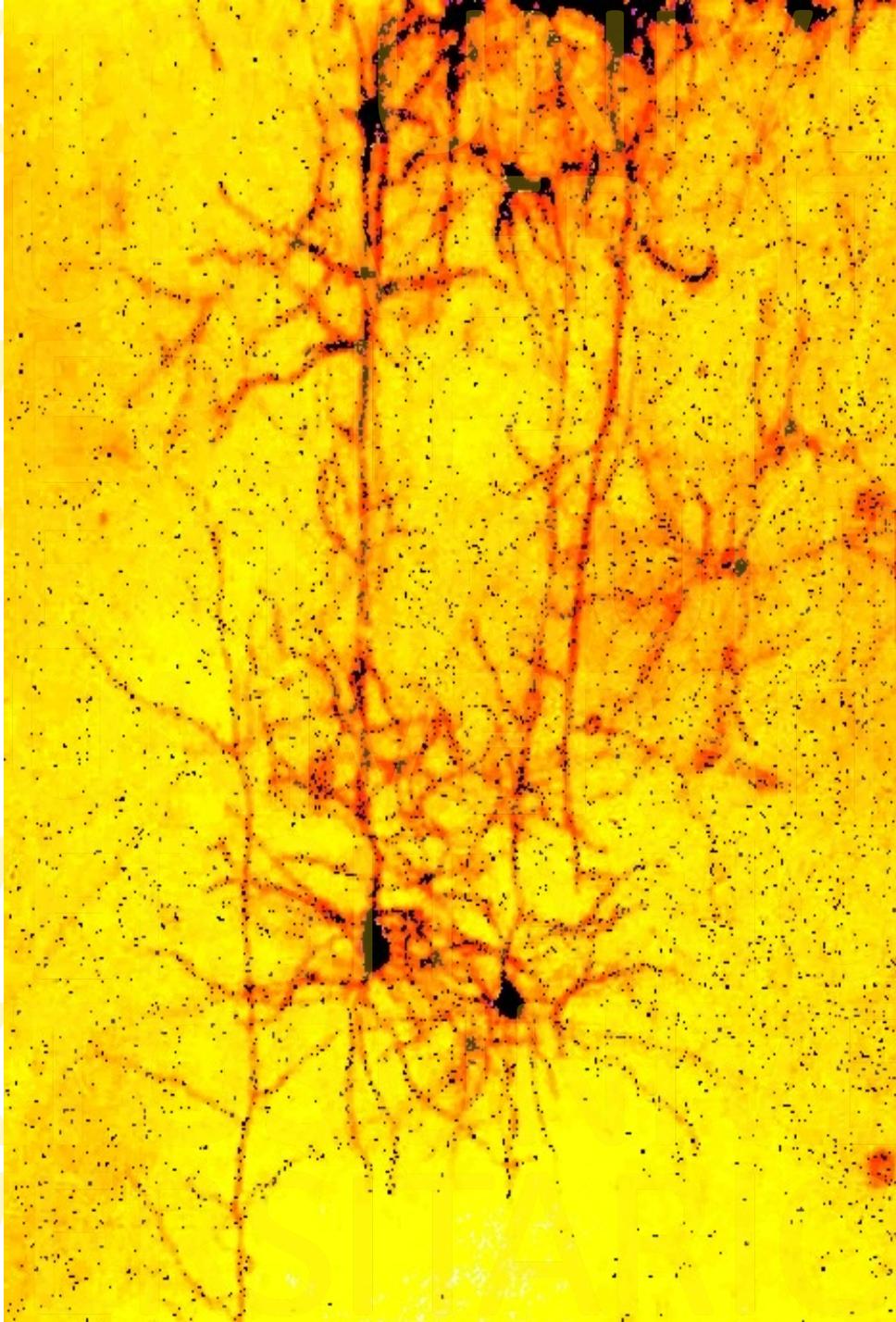
Portafolio de Grado. Volumen I

Marta
González - Santander



TEXTOSUNIVERSITA
SUNIVERSITARIOST
VERSITARIOSTEXTO
RIOSTEXTOSUNIVE
RSITARIOSTEXTOS

UAH



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ESPECIALIDADES MÉDICAS
GRADO EN MEDICINA

HISTOETIQUETA
ATLAS-GUÍA PRÁCTICA DE
HISTOLOGÍA

DRA. MARTA GONZÁLEZ-SANTANDER

APELLIDOS Y NOMBRE:

GRUPO DE PRÁCTICAS:

FIRMA:

Este libro es el resultado del esfuerzo intelectual y material de la autora y que pone a disposición de sus alumnos, quienes deben saber que su fotocopia es una falta de respeto y un robo de sus derechos intelectuales.

No está permitida la reproducción total o parcial de este libro, su tratamiento informático, la transmisión de ninguna otra forma o por cualquier medio, ya sea electrónico, mecánico, por fotocopia, por registro u otros métodos, sin permiso previo y por escrito del autor. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (Art. 270 y siguientes del Código Penal).

© Marta González-Santander, 2023

© Edita: Marta González-Santander Martínez

Imágenes de la cubierta y contraportada: © Marta González-Santander Mtnez.

© Editorial Universidad de Alcalá, 2023

2ª Edición

Depósito Legal: M-3546-2023

I.S.B.N.: 978-84-18979-40-8

Imprime: Imprenta UAH

A MIS ALUMNOS

A LOS QUE ME ALENTARON A SEGUIR ADELANTE



ARISTÓTELES

Grecia, 384 adC - 322 adC
Filósofo, lógico y
científico de la Antigua
Grecia

“Somos lo que hacemos
repetidamente. La excelencia,
entonces, no es un acto, es un hábito”

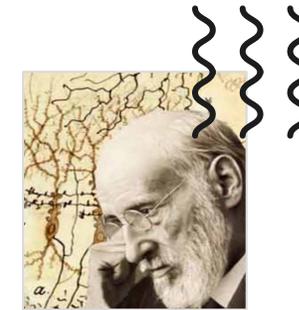


MICHEL H. ROSS

N York, 1930 - Florida, 2009
Professor and Chairmann
Emeritus. Dep. of Anatomy
and Cell Biology.
University of Florida.
College of Medicine
Gainesville Florida

Those of us who knew him will always remember Dr. Ross as a dedicated educator and researcher, distinguished colleague, skillful administrator, and excellent mentor to young generations of anatomists and histologists.

PAWLINA, W & SCOGNA, K



SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL

Navarra, 1852 - Madrid, 1934
Médico y científico español,
histólogo y anatomopatólogo.
Premio Nobel de Medicina
(1906)

“Todo ser humano, si se lo propone, puede ser
escultor de su propio cerebro.”

PRESENTACIÓN

HISTOETIQUETA

Una nueva edición denominada "**HISTOETIQUETA. Atlas-Guía Práctica de Histología**" nace para ser utilizada como elemento indispensable en la adquisición de los conocimientos prácticos de la Ciencia Histológica. Tiene sus antecedentes inmediatos en la "Guía de Histología Práctica" precedente (2009) y en el cuaderno de "Histología Práctica: Texto y Atlas" que fue utilizado en numerosas ediciones anteriores por los alumnos de la Licenciatura en Medicina de la Universidad de Alcalá (1984-2005).

Con el mismo espíritu, se pretende ofrecer al alumno un apoyo teórico y gráfico indispensable para conseguir un aprendizaje motivador y de base en los estudios del grado en Medicina. Por ello, el "Atlas-Guía Práctica Histología Humana" consta de una serie de prácticas que abarcan el conocimiento de los distintos tejidos y algunos órganos, incluidos en la guía docente de Histología Humana realizada para el Grado en Medicina de la Universidad de Alcalá.

En esta edición y después de la pandemia por covid-19, volvemos a incorporar la primera práctica denominada "TOUR HISTOLÓGICO" donde el alumno aprende a realizar una preparación histológica para su observación al microscopio óptico. En el laboratorio de Histología realizará los procesos de inclusión del tejido en parafina, corte, tinción y montaje, después de cuales, ha de identificar el tejido problema observado en la ficha correspondiente. Una segunda práctica consiste en la visita guiada al servicio de microscopio electrónica y de microscopía confocal de la Universidad de Alcalá, de la que se requerirá un reporte. Tras estas dos prácticas se realizarán prácticas de observación microscópica repartidas en las tres sesiones prácticas disponibles y que figuran en la Guía Docente de la asignatura "Histología Humana". Estas prácticas se componen de una *guía de la práctica* a realizar y de la *ficha histológica* a rellenar gráficamente por el alumno, detallando las peculiaridades de las preparaciones histológicas observadas al microscopio óptico a distintos aumentos. La iconografía presentada, que pertenece al departamento de Medicina y Especialidades Médicas y a mi histoteca privada, corresponde específicamente a microfotografías obtenidas de las mismas preparaciones a observar en la sala de microscopios. En esta nueva edición se han introducido algunas preparaciones nuevas, se ha mejorado la calidad de la edición y la calidad de las imágenes, se ha revisado el texto y además se han incluido las etiquetas indispensables a reseñar en cada visualización al microscopio.

Aunque el uso y manejo del microscopio óptico es conocido por los alumnos desde la asignatura de Biología, al comienzo de este atlas-guía y previamente al contenido estrictamente práctico, se ha introducido una breve reseña sobre el uso y manejo del mismo, instrumento que es de observación elemental y de utilización habitual por los alumnos tanto en la asignatura de Histología como en la de Organografía Microscópica. Con ello, se pretende recordar las partes de que consta y su fundamento.

HISTOETIQUETA

Así mismo, se incluye el método y la técnica de rutina de realización de preparaciones histológicas para la visualización de los tejidos y órganos, pues es sabido que éstos son incoloros y traslúcidos, además de contener elementos demasiado pequeños para los que no alcanza la resolución del ojo humano. Así pues, las tinciones se detallan someramente las coloraciones que adquieren los tejidos con las distintas tinciones empleadas con el objeto de interpretar bien lo que se ve al microscopio.

No se pretende exponer los aspectos teóricos de la disciplina en profundidad, lo cual figura en los libros de texto y atlas en cualquiera de sus formatos actuales, sino que el objetivo fundamental es que el alumno, tras la lectura detenida del tema de estudio y tras la exposición de la práctica, pueda afrontar la observación que se presenta. Aunque cuente a su lado con la orientación específica del profesor de prácticas, siempre es necesario la implementación del espíritu crítico personal cotejando lo que se observa con otra iconografía gráfica acreditada. Por ello se recomienda encarecidamente a los alumnos la consulta iconográfica de un atlas o texto-atlas de Histología a través de internet o de recurso en papel. Ello facilitará considerablemente el reconocimiento de la estructura titular y orgánica, que será pilar básico del estudio de las lesiones en la anatomía patológica posterior.

Buscando acomodarnos lo mejor posible a las nuevas directrices de los planes de estudio en relación al Espacio Europeo de Educación Superior, creo que este texto-atlas es la mejor manera de motivar, apoyar e inducir el aprendizaje de la "Histología Humana" en los alumnos del Grado en Medicina, pues plasmar a través de dibujos la estructura titular observada, implica un proceso intelectual complejo de atención en la observación, comprensión de la estructura y proyección de lo asimilado. Al final, el alumno obtiene un conocimiento reflexivo que perdurará en el tiempo.

Dra. Marta González-Santander. Profesora Titular de Histología. Facultad de Medicina. UAH

EL MICROSCOPIO ÓPTICO

APLICACIÓN El estudio de la estructura microscópica del material biológico es el objetivo de la Histología, a través de la que se conoce la forma en que se relacionan estructural y funcionalmente los componentes individuales que constituyen este material biológico. El gran desarrollo de las técnicas microscópicas ha permitido tener un conocimiento más profundo y detallado de la ultraestructura y su correlación funcional, puesto que paralelamente se han desarrollado las técnicas que permiten explorar las bases moleculares y fisiológicas de las estructuras biológicas (clonación de células en cultivo, secuenciación de proteínas, genética molecular...). El avance del conocimiento de las células como unidades básicas estructurales (teoría celular) de la mayor parte del material biológico, está íntimamente relacionado con el estudio de los tejidos, pues los tejidos son agrupaciones celulares con organización específica y funcional relacionada.

La Citología analiza la estructura de las células bajo el microscopio. La Histología estudia la organización estructural y funcional de las células en tejidos, de los tejidos en órganos (formados por grupos de tejidos que realizan funciones específicas) y de los órganos en sistemas (grupos de células o grupos de órganos con función similar o relacionada). Pertenece a un campo más amplio que es el de la Biología Celular, en la que se solapa el conocimiento entre la estructura, la función, la bioquímica y la genética.

La necesidad del conocimiento de la Citología y de la Histología es esencial. Nos ayuda a comprender mejor los procesos bioquímicos y fisiológicos, a saber por qué la estructura es como es y por qué funciona como funciona. Es necesario estudiar la histología normal para poder identificar y comprender las alteraciones histológicas derivadas de la patología. La Histología nos permite un diagnóstico directo de las enfermedades poniendo de manifiesto sus alteraciones estructurales (mediante el microscopio óptico) y ultraestructurales (mediante el microscopio electrónico y otras técnicas). Por lo tanto el conocimiento histológico es necesario para la comprensión de las alteraciones patológicas en la medicina clínica.

INTRODUCCIÓN



¿QUÉ PODEMOS OBSERVAR?

Las células son demasiado pequeñas para que el ojo humano las pueda observar. Se hicieron más visibles cuando se inventó el microscopio. Desde los microscopios más primitivos, las técnicas de visualización de la arquitectura celular han ido desarrollándose hasta llegar a herramientas de observación poderosas, permitiendo cada técnica hasta detectar y visualizar una característica estructural particular de cada célula. A ello se añaden la incorporación de sistemas de registro digital, algoritmos computerizados, que representan un gran avance en la visualización de la arquitectura celular. Las imágenes obtenidas han mejorado sustancialmente en calidad y además permiten la realización de reconstrucciones tridimensionales de los componentes celulares basadas en imágenes bidimensionales. El poder de resolución del ojo humano es muy limitado y solo llega a distinguir dos puntos muy próximos (viéndolos separados) cuando la distancia entre ellos es de 0,2 mm. Por ello se han tenido que desarrollar técnicas amplificadoras que aumenten el poder de resolución hasta incluso 0,1-0,2 nm, pudiéndose entonces observar los átomos que constituyen las moléculas.

Perseguimos como objetivo fundamental la comprensión de la microanatomía de las células, de los tejidos y de los órganos, y correlacionar la estructura con la función. La microscopía óptica ha quedado superada por la microscopía electrónica debido a su enorme capacidad de amplificación de la imagen y del poder de resolución. Además, existen otras técnicas que contribuyen a conseguir este objetivo como son las técnicas auxiliares en biología celular y molecular.

EL MICROSCOPIO ÓPTICO

TÉCNICA

El principal instrumento para el estudio amplificado de las células y de los tejidos es el microscopio. El microscopio de uso común en el laboratorio de histología es el microscopio óptico compuesto. Es el instrumento que aumenta el tamaño de una imagen y permite ver más detalles que con el ojo humano. Los microscopios ópticos utilizan luz visible para iluminar la muestra. El microscopio simple utiliza una sola lente. El microscopio compuesto utiliza lentes múltiples.

La mayoría de las células tienen un tamaño entre 1-100 micrómetros ($1 \mu\text{m} = 10^{-6} \text{ m}$) de longitud por lo que solo son visibles mediante ampliación. Las estructuras intracelulares se encuentran entre los 10 y 100 nm ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). El microscopio óptico es capaz de aumentar más de 1000 veces el poder de resolución del ojo humano. La tabla 1 nos permite hacernos una idea de las medidas histológicas empleadas en la observación de las distintas estructuras y la equivalencia entre ellas. La unidad de medida más utilizada es el micrómetro (plural, micra).

EL MICROSCOPIO ÓPTICO



Microscopio óptico de campo claro

Es la técnica principal en el laboratorio de histología. Se utiliza habitualmente para examen rutinario de muestras. Permite aumentar las imágenes de las células hasta mil veces y tener acceso a detalles hasta de $0,2 \mu\text{m}$ (límite de resolución del ojo humano es de $0,2 \text{ mm}$). Se requiere la preparación cuidadosa de la muestra para aumentar el contraste entre las distintas estructuras. Podemos observar células vivas o muestras fijadas y teñidas, revelando diferentes componentes celulares.

Se compone de una fuente luminosa (lámpara en la subplatina); lente condensadora, que enfoca el haz de luz a la altura de la muestra; platina sobre la que se coloca el portaobjetos; lente objetivo para recoger la luz que atravesó la muestra y lente ocular o un par de lentes oculares en los microscopios binoculares, a través de la que se examina directamente la imagen formada por la lente objetivo. El sistema de lentes apropiado (objetivo y ocular) debe estar alineado para enfocar una imagen de la muestra en el ojo.

Veámoslo detalladamente.

UNIDADES HISTOLÓGICAS DE MEDIDA MEDIDAS EQUIVALENTES EN LONGITUD

	1 mm	$10^3 \mu\text{m} = 10^6 \text{ mm} = 10^9 \text{ \AA}$
10^{-3} mm	1 μm	$10^3 \text{ nm} = 10 \text{ \AA}$
$10^{-6} \text{ mm} = 10^{-3} \mu\text{m}$	1 nm	
$10^{-7} \text{ mm} = 10^{-4} \mu\text{m} = 10^{-1} \text{ nm}$	1 \AA	
$\mu\text{m} = \text{micrómetro (micra)}$		
$\text{nm} = \text{nanómetro}$		
$\text{\AA} = \text{angstrom}$		

PARTES DEL MICROSCOPIO ÓPTICO: ÓPTICA Y MECÁNICA

- **Parte ÓPTICA**, constituida por los siguientes elementos: un foco de iluminación, una lente condensadora, una lente objetivo y una lente ocular.
- **Parte MECÁNICA**, formada por: un pie estativo, una platina, un sistema macrométrico y un sistema micrométrico.



PARTE ÓPTICA: Sus lentes contribuyen a la formación de la imagen ampliada

- 1. Ocular:** Llamado así por ser la lente más cercana al ojo del observador. Sistema de dos lentes, de las cuales la más pequeña es la más cercana al ojo, que se montan en los extremos de un tubo cilíndrico. La potencia o aumento que proporcionan viene indicado en el extremo del tubo (p.e. 122,5 x).
- 2. Objetivo:** Llamado así por ser la lente más cercana al objeto a observar. Sistema de varias lentes montadas en un pequeño tubo a distancias convenientes, de las cuales sólo es visible la más externa (llamada lente frontal). Cada objetivo puede estar tipificado con unas numeraciones. Por ejemplo: "Plan 40/0.65;; 160/0.17", que significa "objetivo planacromático con coeficiente de aumento de 40, apertura numérica 0.65, calculado para una longitud mecánica de 160 mm y un espesor de cubreobjetos de 0.17 mm".
- 3. Revolver giratorio:** Dispositivo especial para poder situar varios objetivos, que puedan ser intercambiables fácilmente. En el revolver pueden situarse tres o cuatro objetivos de distinto aumento. El objetivo más pequeño se llama "lupa". Suele ser de 2,1 ó de 3,2 x y se utiliza para el examen general o panorámico de la preparación (objeto). El objetivo siguiente es el "mediano". Es de 10 x y se usa para estudiar determinadas zonas, previamente seleccionadas con el objetivo anterior, para verlas a mayor aumento. El objetivo "grande" es de 40 x, usado para mayores aumentos y apreciación de finos detalles. Estos tres objetivos son denominados "secos", para diferenciarlos de otro de mucha mas potencia de aumento llamado "de inmersión" (o húmedo), por que necesita estar inmerso en aceite, para que éste quede interpuesto entre el cubreobjetos de la preparación y la propia lente-objetivo. El aumento de esta lente u "objetivo de inmersión" es de 100 x.
- 4. Condensador:** Sistema de varias lentes convergentes que concentran el haz de luz y se sitúan por debajo de la preparación.
- 5. Diafragma:** Sistema de iris que regula la cantidad de luz que le llega al condensador.
- 6. Iluminación:** Foco luminoso debajo del condensador, sobre el cual proyecta su luz.

PARTES DEL MICROSCOPIO ÓPTICO: ÓPTICA Y MECÁNICA



PARTE MECÁNICA: conjunto de elementos que sustentan la parte óptica y la preparación histológica a observar

- A. Estativo, pie o soporte:** Es la parte del microscopio donde se encuentra incorporada la lámpara de iluminación, con su interruptor o botón de encendido.
- B. Platina:** Plataforma horizontal perforada en su centro, donde se coloca la preparación (portaobjetos con cubreobjetos), que tienen un dispositivo de desplazamiento horizontal según los dos ejes de coordenadas, accionados por dos tornillos situados en su parte lateral izquierda.
- C. Dispositivo de desplazamiento vertical de la platina:** Consiste en un sistema de cremallera para subir o bajar la plataforma, accionado mediante dos tornillos: uno de desplazamiento amplio, o "tornillo macrométrico", y otro de desplazamiento fino, o "tornillo micrométrico", que acercan o separan la platina (la preparación) hacia la lente objetivo para conseguir la distancia focal.
- D. Tubo:** Pieza hueca cilíndrica que soporta el sistema de lentes objetivo.
- E. Revolver de objetivos:** Soporta tres o cuatro objetivos que pueden colocarse en el eje óptico del microscopio y nos permite colocar el aumento que deseemos mediante un ligero movimiento de giro de dicho revolver.

EL MICROSCOPIO ÓPTICO

TÉCNICA

REALIZACIÓN DE PREPARACIONES PARA MICROSCOPIA ÓPTICA



Para observar con precisión la estructura interna de los tejidos biológicos formados por células y sustancias intercelulares de distinta consistencia, tenemos que someterlos a una serie de preparaciones previas que, siguiendo una metodología y una técnica, nos asegure que se pueden observar al microscopio con la menor alteración posible y lo más cercano a su constitución vital. Nos encontramos con la necesidad de preservar o fijar su estructura, dotar al tejido de suficiente dureza para ser cortado, cortarlo en láminas lo suficientemente delgadas para que sean transparentes a la luz y contrastar sus diversas partes estructurales con distintos colorantes.

Por estas razones, en los laboratorios de Histología se somete a los tejidos a un proceso metodológico y técnico que debe pasar por las siguientes fases: **fijación, inclusión, obtención de cortes, tinción de los mismos, montaje de la preparación histológica y observación al microscopio.**

FIJACIÓN 012345

La fijación consiste en someter los tejidos a unos agentes determinados que detengan los procesos vitales, especialmente la autólisis de las sustancias orgánicas vitales, manteniendo la preservación de la estructura. Estos agentes, llamados fijadores, realizan la conservación de las uniones laxas, con los puentes de hidrógeno, los enlaces iónicos, etc., que permitan la preservación de las proteínas, los lípidos y los carbohidratos, formando uniones estables que resistan los tratamientos posteriores.

Existen muchos agentes fijadores, siendo el más empleado el formol o formaldehído, ya que preserva la estructura general de la célula y de los componentes extracelulares al reaccionar con los grupos amino de las proteínas. El tejido a fijar debe ser de extracción reciente del organismo y de un tamaño suficientemente pequeño como para que permita una rápida difusión del líquido fijador.

INCLUSIÓN 012345

Por todo ello, el tejido debe ser sometido a un proceso que necesita seguir una metodología y una técnica que puede ser resumida de la siguiente forma:

- 1) **DESHIDRATACIÓN:** Someter al tejido a alcoholes de concentración creciente, para que el agua tisular vaya siendo gradualmente sustituida por alcohol.
- 2) **ACLARAMIENTO:** Sustitución del alcohol por otras sustancias más solubles que la parafina, llamadas aclarantes por que el tejido se ve más traslúcido. Como sustancias aclarantes se suelen emplear el toluol o el xilol.
- 3) **INFILTRACIÓN:** Sustitución del aclarante (toluol o xilol) por parafina líquida que queda infiltrada en el tejido. Este paso se realiza en estufa a mayor temperatura que el grado de fusión de la parafina empleada.
- 4) **INCLUSIÓN:** Solidificación de la parafina y el tejido al descender la temperatura al medio ambiente, con lo que se forma un bloque de la misma dimensión que el recipiente que porta el tejido. Para hacer los bloques se utilizan piezas en forma de "L" (piezas de Leucart) que, situándose enfrentadas, forman un rectángulo o cuadrado, en cuyo centro se sitúa el tejido a incluir o "cassettes".

Después de una buena fijación (formaldehído), se debe proceder a incluir el tejido de modo que adquiera la consistencia o dureza necesaria para ser cortado en finas láminas, sin que se altere el tejido. El medio de inclusión más clásico es la parafina. La parafina es una mezcla de hidrocarburos que tiene la propiedad de poder estar en estado líquido o sólido según la temperatura, por lo que al estar en estado sólido se funde según la temperatura, existiendo parafinas de punto de fusión más alto que otras, entre 35 °C y 65 °C. Como la parafina no es soluble en el agua intersticial que tienen los tejidos, es preciso que ésta se sustituya por líquidos miscibles como el alcohol o la acetona.

EL MICROSCOPIO ÓPTICO

TÉCNICA

012345

OBTENCIÓN DE CORTES



El bloque de parafina endurecido se corta en finas láminas con un microtomo. Se obtienen cortes que comprenden parafina y tejido de entre 5-8 μm de grosor. Estos se mantienen en un portaobjetos de cristal, en donde son tratados con xilol (u otro disolventes orgánico) para que se disuelva la parafina, quedando sólo la lámina de tejido. De esta manera hemos obtenido cortes bidimensionales de tejidos tridimensionales.

012345

TINCIÓN DE LOS CORTES



A continuación se rehidratan los cortes aumentando las diluciones de alcohol en agua y se tiñen con diversos colorantes. Los cortes se someten a la acción química de colorantes de tipo ácido-base que, mediante acciones químicas, se ligan a las estructuras tisulares, resaltando las mismas por sus contrastes y coloraciones. Existen muchos colorantes o tinciones para resaltar diversas estructuras de los tejidos. El más empleado es la hematoxilina-eosina.

012345

MONTAJE DE LA PREPARACIÓN HISTOLÓGICA



El bloque de parafina endurecido se corta en finas láminas con un microtomo. Se obtienen cortes que comprenden parafina y tejido de entre 5-8 μm de grosor. Estos se mantienen en un portaobjetos de cristal, en donde son tratados con xilol (u otro disolventes orgánico) para que se disuelva la parafina, quedando sólo la lámina de tejido. De esta manera hemos obtenido cortes bidimensionales de tejidos tridimensionales.

0123456

OBSERVACIÓN AL MICROSCOPIO ÓPTICO



- 1) Situar el portaobjetos (preparación) sobre la plataforma, sujetándola con sus pinzas para que no se mueva. Cerciorarse de que el cubreobjetos esté situado hacia arriba.
- 2) Encender la luz del microscopio accionando el interruptor del pie.
- 3) Seleccionar en el revolver el objetivo menor (lupa).
- 4) Enfocar la preparación subiendo la platina, moviendo primero el tornillo macrométrico, hasta visualizar bien la preparación.
- 5) Pasar otro aumento girando el revolver y repetir la operación anterior para enfocar bien. Si se utiliza el objetivo de inmersión, se debe poner una gota de aceite de cedro en la preparación y después hacer el contacto, entre éste y la lente frontal del objetivo.

¿Qué es el poder de resolución?

Es la capacidad de las lentes para poder separar con claridad dos puntos adyacentes. Las imágenes de dos puntos entre sí muy cercanas se confunden en uno solo punto cuando la potencia o poder de resolución del microscopio no es capaz de identificarlos por separado.

Magnificación microscópica. Cálculo del aumento.

Para calcular los aumentos a los que se está observando una preparación, se multiplica el aumento del ocular por el del objetivo utilizado. Por ejemplo, si indicamos x100 (o 100x), significa que el aumento de la figura es 100 veces mayor que el tamaño real del objeto.

LENTE OCULAR	LENTE OBJETIVO	MAGNIFICACIÓN objetivo x ocular (aumentos)	
10 x	MENOR	2,1/3,2/4 x	21 / 32 / 40 x
	MEDIANO	10 x	100 x
	MAYOR	40 x	400 x
	INMERSIÓN	100 x	1000 x

Observaremos la imagen aumentada 40, 100, 400 o 1000 veces sobre su tamaño real



SOBRE EL PROCESO DE TINCIÓN

Teñimos porque las células y los tejidos vivos carecen de componentes que absorben la luz y por ello, son prácticamente invisibles al MO, es decir, coloreamos los cortes de tejidos para evitar su transparencia porque sus estructuras presentan el mismo índice de refracción o uno muy próximo y el microscopio de campo claro no produce un grado de contraste útil en los cortes no teñidos.

Las técnicas de tinción nos permiten ver los componentes que perduran en el tejido tras la fijación. Se trata de moléculas grandes como nucleoproteínas (ácidos nucleicos y proteínas), proteínas intracelulares del citoesqueleto, proteínas extracelulares y complejos de fosfolípidos y proteínas (o carbohidratos) en las membranas. Estos son los elementos morfogenéticos de los tejidos y constituyen su base de la organización visible con el microscopio, que en muchas ocasiones coincide con la función que desempeñan (correlación morfo-funcional). Se emplean colorantes que son sustancias que ligadas a las estructuras, las comunican su color. Si le comunican el mismo color, el proceso se llama "ortocromasia", pero si el color que adquiere es distinto al del colorante utilizado se llama "metacromasia". La sustancia fundamental de cartílago y los gránulos de heparina de los mastocitos muestran metacromasia.

Las soluciones colorantes pueden teñir selectivamente unos componentes y no otros, por lo que se llaman "colorantes monocromáticos". Se puede recurrir al empleo sucesivo de varios colorantes ligándose cada uno de ellos a distintas estructuras, por lo que se llaman "colorantes policromáticos" (utilizan varios colorantes).

HE →



TM →



El colorante se une a la estructura del tejido combinándose íntimamente por adsorción o combinación físico-química, formando sales insolubles. En general los COLORANTES pueden ser:

- **Ácidos** (sales cuya base es incolora y el ácido coloreado). Colorean el citoplasma.
- **Básicos** (sales cuya base es coloreada y el ácido incoloro) Colorean el núcleo.
- **Neutros** (sales en las que el ácido y la base son coloreados). Colorean el citoplasma de un color y el núcleo de otro.
- **Indiferentes** (no forman sales). Colorean estructuras que tienen un poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante (Sudán III, rojo escarlata).

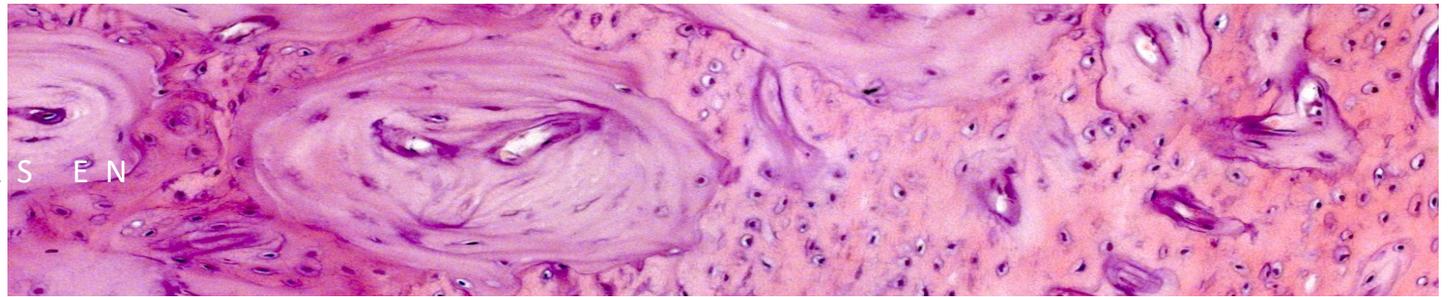
Las estructuras que se tiñen con colorantes básicos, son estructuras basófilas, y las que se tiñen con colorantes ácidos son estructuras acidófilas.

Los métodos de coloración pueden ser:

- **Directos**, cuando hay afinidad entre la estructura y el colorante.
- **Indirectos**, cuando requieren la intervención de un intermediario (llamado "mordiente") para que se fije el color. Si el mordiente se utiliza junto con el colorante, se llama "laca".
- **Progresivos**, cuando el colorante actúa progresivamente en el tiempo hasta llegar a un punto óptimo.
- **Regresivos**, cuando se realiza una coloración sobre otra y después se elimina el exceso de colorante por medio de sustancias llamadas "diferenciadoras".
- **Simple**s, cuando se colorean sólo algunos elementos del tejido (núcleos, fibras elásticas, glucógeno,...).
- **Panópticos**, cuando se combinan sucesivamente colorantes neutros.
- **Pancromáticos**, cuando en una sola solución colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesiten.



TINCIONES RUTINARIAS EN EL LABORATORIO



A continuación indicamos la coloración que adquieren los tejidos con las técnicas de tinción más utilizadas.

HEMATOXILINA-EOSINA (H-E)

(hematoxilina-eosina o hemalumbre-eritrosina):

es una tinción de uso general y la tinción más útil en el estudio del material biológico. Pone en evidencia las características estructurales de un tejido, aunque no todas (no evidencia elastina, láminas basales, fibras reticulares y lípidos). La hematoxilina (similar a un colorante básico) tiñe específicamente en violeta/negro los núcleos y las sustancias basófilas como ácidos nucleicos, RER o ergastoplasma; y la eosina tiñe específicamente de rosa/rojo el citoplasma, los eritrocitos de anaranjado/rojo y las sustancias acidófilas intercelulares como el conjuntivo (fibras elásticas, colágenas y reticulares) de rosa.

MÉTODO DE VAN GIESON (VG)

(hematoxilina férrica-ácido pícrico-fucsina ácida):

tiñe el núcleo pardo-negruzco y el citoplasma pardo amarillento; el colágeno de color rosado-rojo y el músculo de amarillo. La tinción elástica de Van Gieson, incorpora una tinción marrón-negro de las fibras elásticas.

MÉTODOS TRICRÓMICOS:

Tres colorantes tiñen distintos componentes dando una visión general de la estructura observada, resaltando las fibras de

sostén o distinguiéndolas de las fibras musculares. Muy utilizado en las preparaciones de hueso descalcificado e incluido en resina acrílica, distinguiéndose células, osteoide y mineral óseo.

Tricrómica de Masson-Goldner (TM) (hematoxilina férrica-fucsina ácida-naranja G-verde luz):

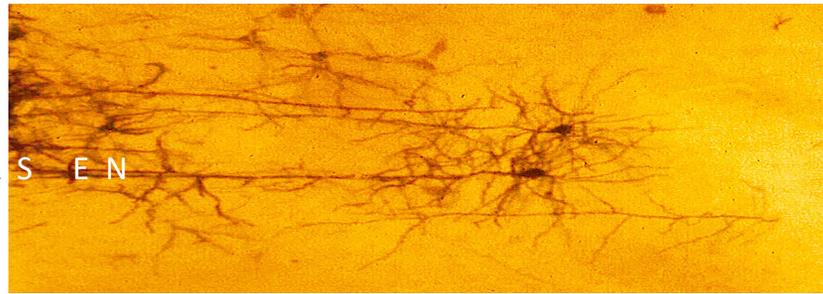
utilizada frecuentemente para visualización de tejido conjuntivo que tiñe de azul-verde; núcleo negro; citoplasma rojo-rosa y eritrocitos rojos. Tiñe específicamente cartílago de azul/verde y fibras musculares de rojo.

Tricrómica de Mallory (azul de anilina-fucsina ácida-naranja G):

utilizada frecuentemente para visualización de fibras colágenas que tiñe de azul intenso; núcleo rojo; citoplasma rojo pálido y eritrocitos anaranjados. Tiñe específicamente queratina de anaranjado, cartílago de azul, matriz ósea de azul intenso y fibras musculares de rojo.



TINCIONES RUTINARIAS EN EL LABORATORIO



MÉTODOS DE PLATA (impregnación argéntica): empleados en la demostración de numerosas estructuras como las neuronas y sus prolongaciones o las fibras de reticulina, por los depósitos negros de plata metálica tras la reducción del nitrato de plata empleado. Tiñe específicamente las fibras reticulares y las fibras nerviosas de pardo-negro.

MÉTODO DEL ÁCIDO PERYÓDICO- Reactivo de SCHIFF (PAS): frecuentemente usada para detección de membrana basal y carbohidratos (glucógeno). Tiñe el núcleo de azul y las fibras colágenas de rosa. Demuestra la existencia de hidratos de carbono (glucógeno) y glucoproteínas tiñéndolos de magenta. Delinea membranas basales e identifica mucinas neutras.

MÉTODO DEL AZUL ALCIÁN (AA): colorante básico que identifica en azul los mucopolisacáridos ácidos secretadas por los epitelios. Combinable con la técnica de PAS.

MÉTODO DE VIOLETA DE CRESILO (VC): colorante básico que se emplea sobre tejido y sistema nervioso. Identifica de color violeta los componentes basófilos como somas neuronales, nucléolo y sustancia de Nissl.

MÉTODO DE MAY-GRÜNWARD-GIEMSA: empleado exclusivamente para el estudio de frotis de sangre y de médula ósea. La coloración está compuesta por eosinato de azul de metileno en alcohol metílico (fija el extendido y tiñe los citoplasmas) y el colorante de Giemsa diluido (solución metilica y glicerínica de eosinato de azul de metileno y azur II, que tiñen los núcleos y ciertas granulaciones). La eosina, ácida, tiñe los componentes acidófilos de la célula; el azul de metileno se une a los componentes basófilos. A simple vista el extendido adquiere una tonalidad rojiza

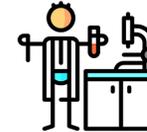
MÉTODOS DE MIELINA: hay muchos métodos para la tinción de mielina, destacando el de Weigart-Pal, el azul rápido de luxol o la impregnación con osmio. Ofrecen la distinción entre sustancia blanca y gris de los órganos nerviosos pues la mielina de las fibras de la sustancia blanca se tiñe de oscuro en relación a la sustancia gris.

LABORATORIO DE HISTOLOGÍA

¿CÓMO HACER UNA PREPARACIÓN HISTOLÓGICA?



“TOUR DE HISTOLOGÍA”



Competencias generales

Toma de contacto con las técnicas de tratamiento de tejidos en el Laboratorio de Histología.
Observación y aprendizaje del proceso de inclusión de muestras y preparación de bloques histológicos.
Observación y aprendizaje del proceso de obtención de cortes histológicos

Competencias específicas

INCLUSIÓN: Realización de una inclusión en parafina a partir de un tejido problema ya fijado.
Confección de bloques de parafina.

CORTE: Realización de cortes de un tejido ya incluido (taco) con el microtomo de rotación tipo Minot.
Aprendizaje de su manejo. Recogida de las secciones obtenidas tras el corte en portaobjetos y secado.

TINCIÓN: Realización de dos tinciones básicas en el laboratorio:
hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson.

MONTAJE: Montaje final de la preparación histológica.

*INCLUSIÓN DE MUESTRAS EN PARAFINA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA.
 REALIZACIÓN DE CORTES DE LAS MUESTRAS INCLUIDAS*



Desarrollo de la práctica:



① **INCLUSIÓN EN PARAFINA**

Observa el puesto de laboratorio que tienes a disposición. Hay un puesto (box) por grupo. Sobre papel de filtro de laboratorio encontrarás:

- 1) Agua destilada, batería de alcoholes para deshidratación hasta 100°C, mezcla de alcohol 100°C y acetato n-butilo, y acetato n-butilo. Ya dentro de la estufa a 68°C encontrarás acetato n-butilo -parafina y parafina. También dispondrás de un bote de cristal, pinzas, placa de petri, bote de plástico con la muestra fijada para incluir, y muestra incluida en parafina envuelta y etiquetada para cortar.
- 2) Instrucciones para llevar a cabo la infiltración en parafina.



Toma la muestra en formol del bote de plástico ya etiquetado, inicia la deshidratación e incluye en parafina según las instrucciones de la tabla adjunta. Haremos el protocolo de inclusión de muestras pequeñas que lleva aproximadamente de 3 horas.



Desarrollo de la práctica:

Protocolo:

Recepción de la muestra problema.

FIJADA en formol al 10% (formaldehído diluido al 35% en agua destilada).

INCLUSIÓN: lavado, deshidratación, aclaramiento e infiltración en parafina.



MUESTRAS		Diminutas	Pequeñas	Medianas	Grandes
P R O C E D I M I E N T O	Agua destilada	10 min	15 min	20 min	30 min
	Alcohol 70%	10 min	15 min	20 min	30 min
	Alcohol 96%	20 min	25 min	30 min	1h (3 x 20)
	Alcohol 100%	21 min (3 x 7)	45 min (3 x 15)	1h (3 x 20)	2-4 h (3 x "X")
	Alcohol 100%-Acetato n-butilo (1:1)	10 min	20 min	30 min	2h
	Acetato n-butilo	20 min (2 x 10)	40 min (3 x 13)	40 min (3 X 20)	3h (3 x 1)
	Acetato n-butilo-Parafina (1:1) (estufa 68°C)	15 min	20 min	30 min	1 h
	Parafina (estufa a 68°C)	20 min	1 h	3h	10-24 h

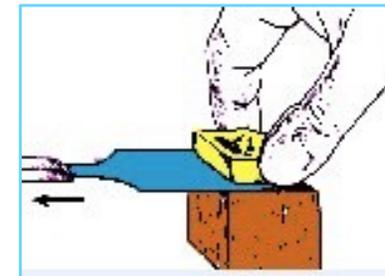


② CORTE

Utiliza la muestra proporcionada ya incluida en parafina (bloque envuelto en papel de plata). No olvides conservar su código para después indicarlo en los portas que vayas a teñir. Desenvuelve y procede a sujetar la muestra a la pieza de madera, que luego colocarás en el aparato de corte o microtomo.

Consejos para sujetar el taco sobre la pieza de madera antes de pasar al microtomo:

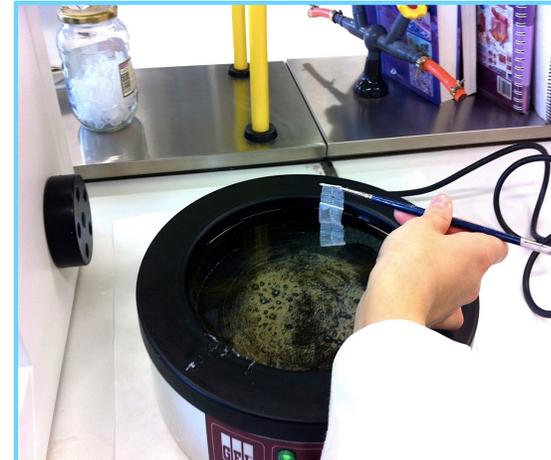
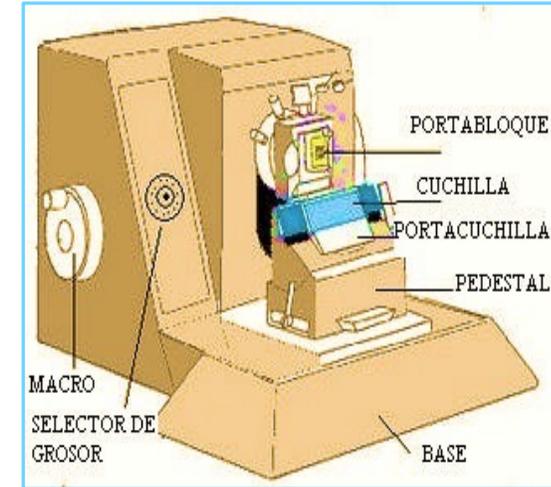
- 1) Coge un soporte de madera con su cara mas larga hacia arriba.
- 2) Calienta algo de parafina en la cuchara utilizando el mechero Bunsen.
- 3) Deposita la parafina líquida en el soporte y pega el bloque tal que la cara de corte sea la superficial. Rellena con parafina líquida los bordes para fijar bien el taco.
- 4) Talla el bloque realizando una pirámide que en su centro contenga la muestra. Conviene que los bordes sean rectos y paralelos entre sí.





② CORTE

- 5) Para obtener cortes de la preparación utilizamos un microtomo de rotación tipo Minot. Los cortes serán de entre 3-5 micrómetros. Trataremos de obtener cortes seriados.
- 6) La tira de cortes se sumergirá en un baño caliente de agua a $45-50^{\circ}\text{C}$, dejando que se estiren.
- 7) Se recogerán los cortes con y sobre el portaobjetos (uno o varios) de tal manera que evitemos las arrugas y burbujas en lo posible.
- 8) Los portaobjetos han de estar etiquetados convenientemente, mejor a lápiz.
- 9) Se recomiendan dos portas por alumno para posteriormente realizar las dos tinciones de rutina para cada muestra problema.
- 10) Reservamos los cortes obtenidos (recogidos en los portas) para teñirlos en la 2ª práctica.



*DESPARAFINADO Y TINCIÓN DE LOS CORTES OBTENIDOS.
 MONTAJE. CONFECCIÓN DE BLOQUES*

Desarrollo de la práctica:

Antes de proceder a desparafinar y teñir, coloca los portas que quepan en el cestillo que utilizarás para sumergirlos en cada cubeta. Es conveniente utilizar dos cestillos diferentes para cada protocolo de tinción. Así cada cestillo tendrá uno de los dos portas de cada alumno.

① **DESPARAFINADO Y TINCIÓN. MONTAJE DE LA PREPARACIÓN.**

DESPARAFINADO e HIDRATACIÓN: los portas con los cortes obtenidos se desparafinan pasándolos por xilol y alcoholes de concentración decreciente hasta llevarlos al agua destilada.

TINCIÓN: dispones de dos mesas de tinción con los colorantes necesarios para obtener muestras teñidas con hematoxilina-eosina y muestras teñidas con tricrómico de Masson. Cada grupo debe obtener preparaciones con ambas tinciones (dos preparaciones por alumno). En páginas posteriores dispones de los protocolos necesarios.



Protocolo:

TINCIÓN CON HEMATOXILINA-EOSINA

SOLUCIONES

HEMATOXILINA DE CARAZZI

Hematoxilina - 0,5 gr

Glicerina - 100 ml

Yoduro potásico (IK) - 0,10 gr

Alumbre potásico (SO₄ALK) - 20 gr

Agua destilada - 400ml

EOSINA ALCOHÓLICA

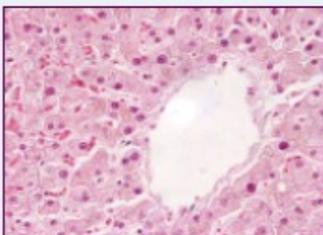
Eosina amarillenta - 0,5 gr

Alcohol 70% - 100 ml

PROCEDIMIENTO

- ✦ Desparafinado de los cortes en xilol durante 30 min o 1 hora
- ✦ Hidratación de los cortes con:
 - Alcohol 100%: 5 min
 - Alcohol 96%: 3-5 min
 - Alcohol 70%: 3-5 min
 - Agua: 2-5 min
- ✦ Teñir con Hematoxilina de Carazzi durante 15 min
- ✦ Lavado con agua corriente durante 10 min
- ✦ Teñir con Eosina durante 5 min
- ✦ Lavado rápido en agua (2x)
- ✦ Deshidratación de los cortes con:
 - Alcohol 70%: lavado rápido (2x)
 - Alcohol 96%: 3-5 min
 - Alcohol 100%: 5 min
- ✦ Pasar los cortes por xilol y montar con Bálsamo de Canadá o Dépex

RESULTADOS



AZUL

NÚCLEO, NUCLÉOLO Y SUSTANCIA FUNDAMENTAL si abundante (cartilago)

ROSA

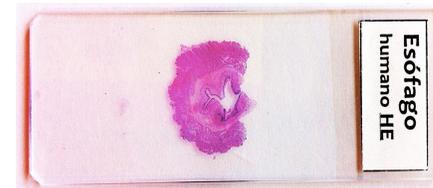
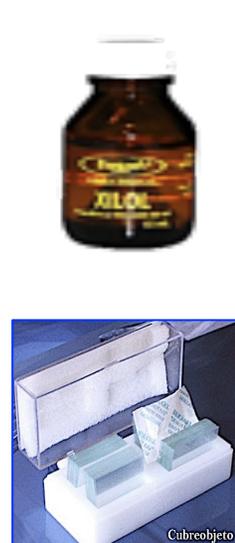
CITOPLASMA Y MATERIAL EXTRACELULAR:
Fibras colágenas, elásticas y reticulares. Matriz ósea descalcificada y membrana basal.

Protocolo: TINCIÓN CON TRICRÓMICO DE MASSON			
SOLUCIONES	HEMATOXILINA DE CARAZZI Hematoxilina - 0,5 gr Glicerina - 100 ml Yoduro Potásico - 0,10 gr Alumbre Potásico - 20 gr Agua destilada - 400ml	FUCSINA-PONCEAU Fucsina ácida - 0,1 gr Ponceau - 0,2 gr Agua destilada - 300 ml Ácido acético - 0,6 ml	ORANGE G Ácido fosfomolibdico - 3 gr Agua destilada - 100 ml Orange G - 2 gr
			VERDE LUZ Verde luz amarillento SF - 1 gr Agua destilada - 100 ml Ácido acético - 0,2 ml
PROCEDIMIENTO	<ul style="list-style-type: none"> ✦ Desparafinado de los cortes en xilol durante 30 min o 1 hora ✦ Hidratación de los cortes con: <ul style="list-style-type: none"> Alcohol 100%: 5 min Alcohol 96%: 3-5 min Alcohol 70%: 3-5 min Agua: 2-5 min ✦ Teñir con Hematoxilina de Carazzi durante 20 min ✦ Lavado con agua corriente durante 10 min ✦ Teñir con Fucsina durante 10 min ✦ Lavado rápido en agua acética al 1% (o agua destilada para no perder color) ✦ Teñir con Orange G durante 10 min ✦ Lavado rápido en agua acética al 1% ✦ Teñir con Verde luz durante 5 min ✦ Lavar con agua ✦ Deshidratación de los cortes con: <ul style="list-style-type: none"> Alcohol 70%: lavado rápido Alcohol 96%: 3 min Alcohol 100%: 5 min ✦ Pasar los cortes por xilol y montar con Bálsamo de Canadá o Dépex 		
RESULTADOS	PARDO-MARRÓN A NEGRO	NÚCLEO Y ESTRUCTURAS BASÓFILAS	
	ROJO-ROSA	CITOPLASMA, QUERATINA	
	AZUL-VERDE	TEJIDO CONJUNTIVO	
	ROJO	ERITROCITOS FIBRAS MUSCULARES	

DESHIDRATACIÓN y MONTAJE DE LA PREPARACIÓN: tras teñir, deshidratamos en alcoholes de concentración creciente hasta xilol. Para preservar las muestras obtenidas es necesario montar un "cubre" sobre el portaobjetos en el que descansa la muestra teñida. Dispones de los "cubres" necesarios que se colocarán sobre el porta mediando entre ambos Depex o bálsamo de Canadá.

Consejos prácticos para el montaje:

- o Añade una pequeña cantidad del medio de montaje sobre el cubreobjetos (gotas o línea central fina).
- o Saca una preparación del cestillo con xilol y deja caer sobre ella el cubre alineado con cuidado, de un lado hacia el opuesto.
- o Por capilaridad el medio se extenderá sobre toda la superficie del porta
- o Con la aguja enmangada haz presión sobre el cubre tal que las burbujas se desplacen hacia la periferia y desaparezcan.
- o Con ayuda de papel de filtro limpia el exceso de medio de los bordes de la preparación. Deja secar la preparación en la bandeja.

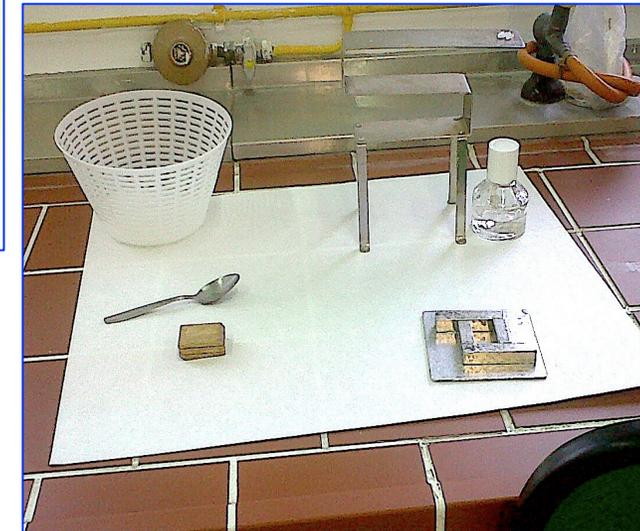
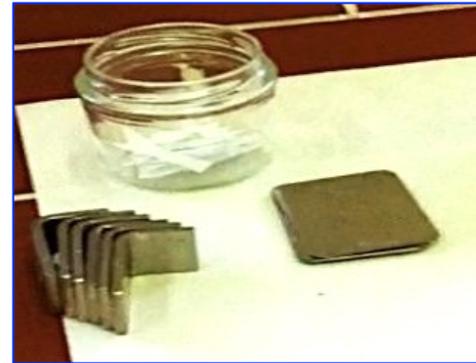


Cubreobjeto

Desarrollo de la práctica:

② CONFECCIÓN DEL BLOQUE.

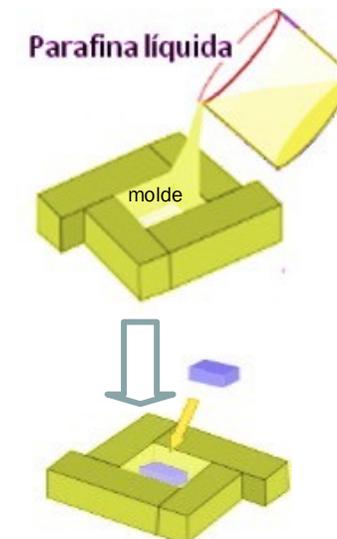
Has de confeccionar un bloque de parafina (apto para cortar) que contenga la muestra que has incluido en parafina previamente (práctica 1). El bloque o taco nos permite sujetarlo en el microtomo. La muestra ya infiltrada debe colocarse adecuadamente tal que la cara de corte coincida con una de las caras del bloque sin excesiva parafina superficial para no tener que devastar en exceso.



Consejos prácticos:

- Mientras la pieza está embebida en parafina dentro de la estufa a 68°C, prepara las barras Leuckart y añade un poco de parafina entre ellas.
- Saca el pocillo con la muestra. Añade la parafina del pocillo entre las piezas de Leuckart sujetando la muestra con las pinzas.
- Coge la muestra con las pinzas, oriéntala y sumérgela en la parafina, colocando la cara de corte en contacto con uno de los lados estrechos del rectángulo y a media altura de la pieza. Sujeta un minuto para que se pegue la muestra a ese lado y suelta.
- Rotula una etiqueta con el código de tu muestra e introdúcela en la parafina en el extremo opuesto de la muestra.
- Deja solidificar el bloque a temperatura ambiente.
- Deja el pocillo sin parafina en el recipiente con xilol. Solidificado, desprender las piezas de Leuckart.

También podemos confeccionar los bloques utilizando cajas para inclusión, moldes de metal y dispensador de parafina.



Barras de Leuckart:
escuadras o barras metálicas en forma de "L" que enfrentadas forman un rectángulo o cuadrado para formar el bloque