

1

TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Lic. Carlos R. Neira Montoya
Lic. Eduardo Sedano Gelvet
Lic. María Elena Vilcarromero V.

El estudio de los tejidos tal como los observamos hoy en día no sería posible sin la ayuda de la histotecnología; esta disciplina se encarga del estudio de los métodos técnicos y procedimientos que permiten la transformación de un órgano en una película lo suficientemente transparente y contrastada que nos permite su observación a través del microscopio (Fig. 1-1). Para que esto ocurra se tiene que seguir una serie de pasos. Cada uno de estos pasos permite la observación de las características morfológicas del tejido que nos indica la normalidad o la alteración patológica; sin embargo en estudios mucho más minuciosos, estos pasos se harán en función de las estructuras o sustancias que se deseen investigar en la muestra correspondiente.

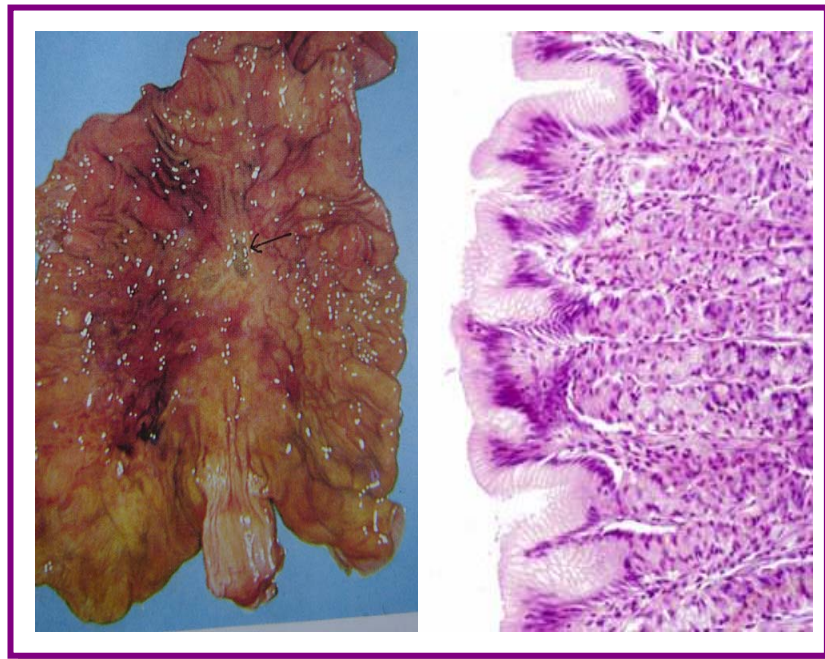


Figura 1-1. Un órgano es transformado en una película transparente.

Los pasos de las técnicas microscópicas para obtener un preparado histológico permanente (láminas) son:

1. Toma de la muestra.
2. Fijación.
3. Inclusión.
4. Microtomía.
5. Coloración.

1. TOMA DE LA MUESTRA

Es el momento que se selecciona el órgano o tejido a estudiar. De tres fuentes puede provenir el material humano: las necropsias, las biopsias y las piezas operadas. De éstas, sólo la primera puede darnos material normal; las dos últimas habitualmente proporcionarán tejidos para estudio histopatológico.

- **Necropsias:** son las piezas que se obtienen de un cadáver. Para histología normal es necesario que se trate de un cadáver fresco y que no haya sido atacado por ninguna lesión, por lo menos el órgano que se quiere estudiar.
- **Biopsias:** son trozos de tejido que se obtienen de un sujeto con vida con el objeto de estudiarlos al microscopio y efectuar un diagnóstico histopatológico.
- **Piezas operadas:** los tejidos que han sido extraídos de las intervenciones quirúrgicas, generalmente tumores u órganos inflamados, también pueden darnos material de investigación pero, como en el caso anterior, servirán para estudio patológico, y en pocas ocasiones se tendrá tejido normal.

2. FIJACIÓN

A fin de preservar la morfología de los tejidos y evitar la destrucción de las células por sus propias enzimas (autólisis), o por bacterias (putrefacción), los tejidos extraídos de deben ser fijados, inmediatamente después de ser obtenidos. Este tratamiento denominado fijación, además tiene por finalidad endurecer los tejidos, volviéndolos más resistentes para las etapas subsiguientes de las técnicas microscópicas (Fig. 1-2). El fijador más comúnmente utilizado es el Formol, que es una solución de formaldehído en agua; sin embargo existen un sin número de fijadores que se pueden usar en virtud de las estructuras que se deseen investigar en los tejidos. En general los fijadores actúan reaccionando con las proteínas ya sea coagulándolas o formando entre ellas puentes. Esta última es la forma como actúa el formol una diferentes grupos químicos de las proteínas vecinas a través de puentes metileno (-CH₂-), haciendo una especie de gran malla donde quedan inmersas todos los otros elementos estructurales.

Hay que considerar que la fijación es un paso fundamental, sino se ejecuta adecuadamente se pueden perder o destruir algunas sustancias o se puede alterar la morfología del tejido.

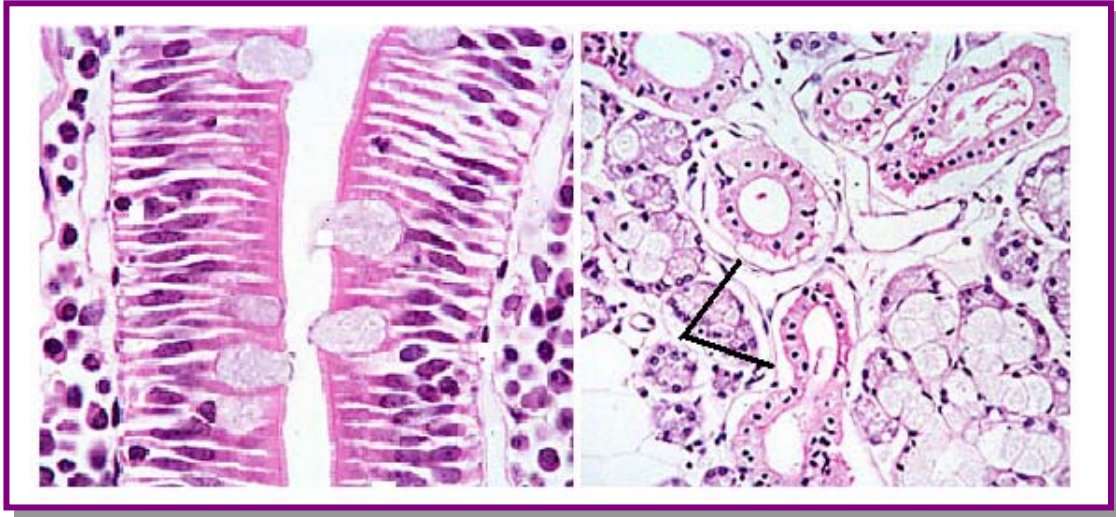


Figura 1-2. Izquierda buena fijación, derecha mala fijación (líneas).

3. INCLUSIÓN

La inclusión tiene como finalidad conferirle al tejido un soporte sólido que permita posteriormente realizar cortes muy finos, esto involucra que el medio usado no solo rodee el tejido sino que penetre a las partes más íntimas del tejido. El método de inclusión más usado es el de la parafina. La parafina es un hidrocarburo saturado, sólido a medio ambiente y que necesita una serie de pasos para poder ingresar a los tejidos, estos pasos son:

Deshidratación

Las piezas al ser retiradas del fijador, o después de haberlas lavado, están embebidas en agua; impidiendo que sean penetradas por la parafina. Por lo tanto, en primer lugar, debemos deshidratar los tejidos sumergiéndolos en líquidos anhidros, ávidos de agua. Para evitar alteraciones provocadas por una deshidratación brusca, se aconseja proceder escalonadamente utilizando, preferentemente, alcohol etílico de graduación creciente.

Impregnación por un disolvente de la parafina (aclaramiento)

Las piezas perfectamente deshidratadas se sumergen en el disolvente, xilol. Este es un agente intermediario que permite eliminar el agente deshidratante y a la vez permite el ingreso de la parafina.

Penetración de la parafina

Se sumergen las piezas en parafina (56-58° de punto de fusión), mantenida líquida en la estufa a no más de 62 °C.

En la rutina todo este procedimiento de deshidratación, aclaramiento y embebido se hace en promedio entre 12 y 18 horas para lo cual se usan aparatos automáticos llamados procesadores de tejidos (Autotechnicon). Fig. 1-3.



Figura 1-3. Procesador automático de tejido Citadel 2000.

Inclusión definitiva o formación del bloque

En moldes de metal ad-hoc (barras de Leuckart) se vierte la parafina fundida, del mismo punto de fusión de la que ha servido para la penetración. Se colocan las piezas orientándolas y luego se pone el molde en heladera.

A los pocos minutos la parafina se habrá solidificado completamente, y podremos retirar los bloques de parafina de los moldes correspondientes estando listo para la microtomía (Fig. 1-4).

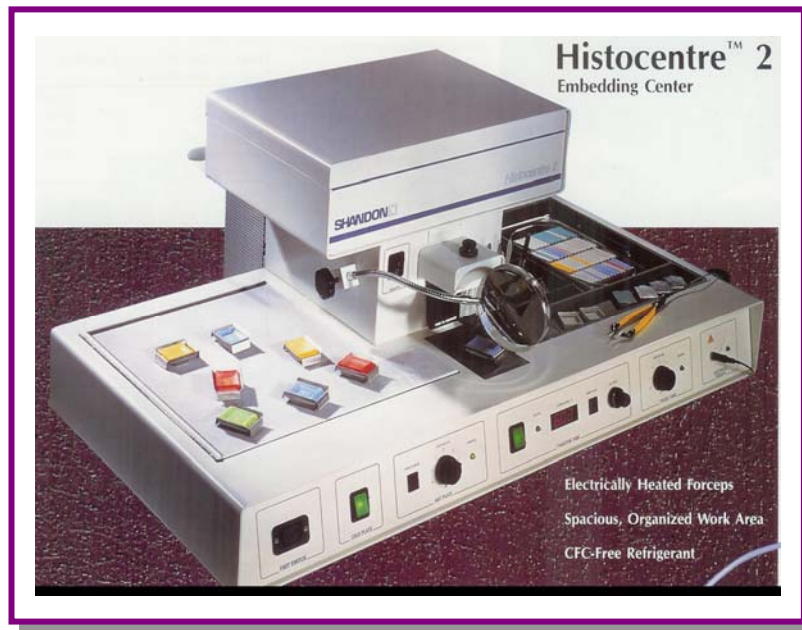


Figura 1-4. Centro de inclusión, donde se prepara el bloque de parafina.

4. MICROTOMÍA

El objeto de la inclusión que hemos descrito anteriormente es hacer posible el corte del tejido en láminas lo suficientemente delgadas como para permitir el paso de la luz para examinarlo al microscopio. Los micrótomos son instrumentos de gran precisión que nos proporcionan cortes delgados parejos y de espesor graduable. Los cortes más corrientes son los de 4-6 micrones. Existen diferentes de micrótomos pero el más usado es el de rotación (Fig. 1-5).



Figura 1-5. Micrótomos de rotación y láminas con cortes histológicos.

5. COLORACIÓN

Coloración: es el proceso mediante el cual un cuerpo es teñido por una sustancia colorante, sin perder el color cuando es lavado.

Todos los componentes tisulares tienen el mismo índice de refracción por tanto si los observamos al microscopio no podemos definir sus componentes, por esta razón es necesario colorear las estructuras. Como los colorantes habitualmente se usan en soluciones acuosas, y los tejidos están con parafina es necesario rehidratarlo después del corte histológico, esto se hace colocando primero en xilol y luego en pasajes sucesivos de alcohol de concentración decreciente hasta devolverle el agua a los tejidos.

La coloración diferencial se produce porque los tejidos tienen diferente afinidad (carga) hacia los colorantes, y los colorantes pueden ser de carácter básico o de carácter ácido, de allí resulta la denominación de basófilos y acidófilos para referirse a las estructuras que captan uno u otro colorante respectivamente.

El método de Hematoxilina y Eosina (H.E.) (Fig. 1-6) es el procedimiento de tinción más comúnmente usado tanto en el estudio histológico como en el patológico; consiste en la aplicación de la Hematoxilina de Harris o Mayer para colorear los núcleos (este colorante tiene carácter básico y el núcleo tiene carácter ácido por la presencia de los ácidos nucleicos); y la Eosina que es un colorante ácido y tiñe el citoplasma y las fibras colágenas que tienen un carácter básico.

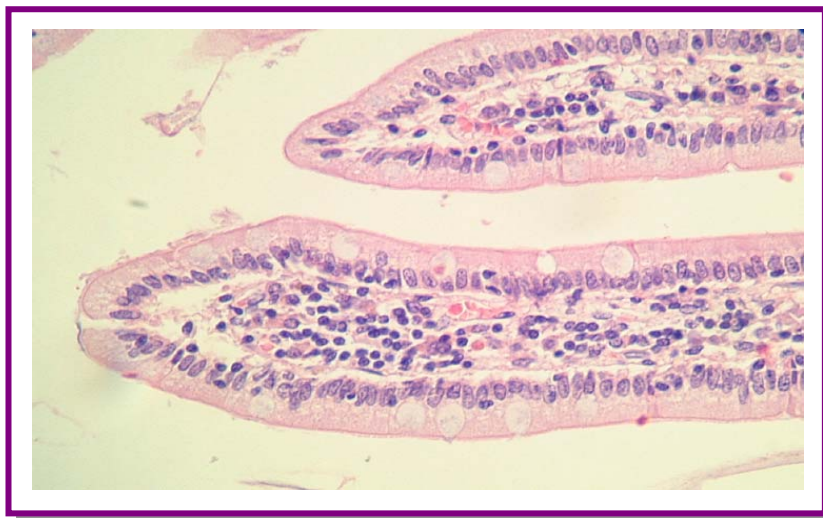


Figura 1-6. Intestino delgado coloreado con H.E.

Si bien la coloración de Hematoxilina-Eosina es una coloración universal, existen una gran diversidad de métodos que permiten reconocer diferentes estructuras tisulares, así como sustancias químicas de los tejidos; en ese sentido entonces podemos dividir estos métodos en métodos estructurales y en métodos histoquímicos.

Los primeros nos permiten reconocer estructuras como fibras (colágenas, elásticas y reticulares), organelas e inclusive microorganismos como bacterias, hongos y protozoarios; mientras que los métodos histoquímicos demuestran sustancias de manera específica.

Métodos estructurales:

Componentes del tejido conectivo como las fibras elásticas o reticulares no se pueden observar con H.E., por tanto se necesitan las llamadas coloraciones especiales. Así por ejemplo el método de Verhoeff (Fig. 1-7 izquierda), una variedad de Hematoxilina férrica, permite la observación de las fibras elásticas; mientras las fibras reticulares, estructuras muy finas y delicadas que forman el estroma de varios órganos, se demuestran con métodos a base de sales de plata (técnica de Wilder o Gomori) (Fig. 1-7 derecha).

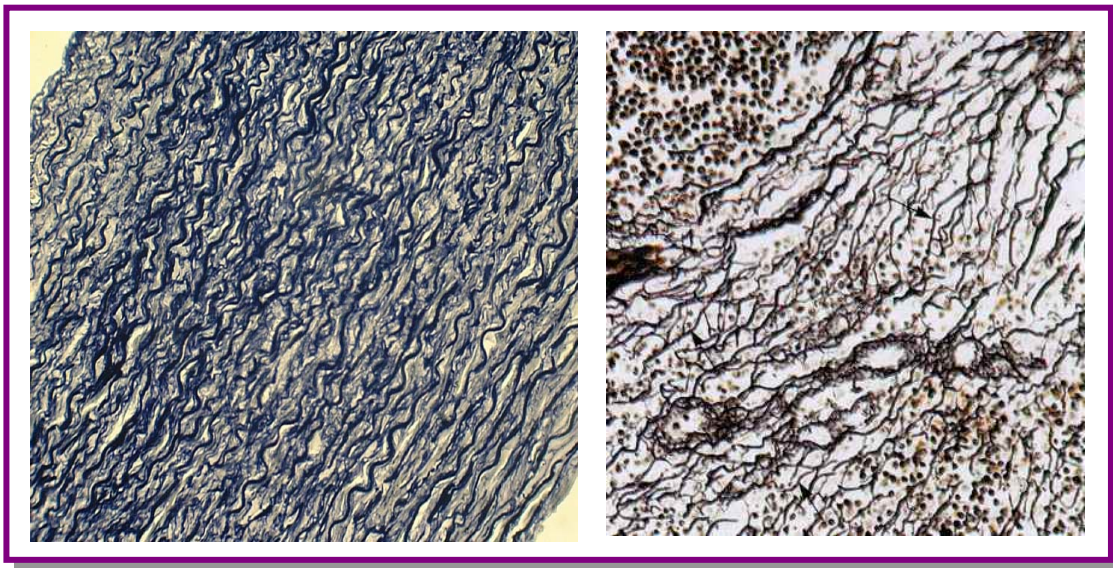


Figura 1-7. Izquierda fibras elásticas (Verhoeff); derecha fibras reticulares (Gomori).

Métodos histoquímicos:

Los métodos histoquímicos nos permiten la identificación de componentes químicos dentro de las células y tejidos, así por ejemplo se puede identificar de manera específica sustancias como glucógeno, ADN, lípidos, hierro, calcio e inclusive enzimas. Un método histoquímico muy usado es la reacción del Acido peryódico – Schiff, que se basa en la oxidación de los

grupos glicoles de los carbohidratos, transformándolos en aldehídos; estos aldehídos luego son identificados por el reactivo de Schiff generando un color rojo brillante (sustancias como las mucinas, y el glicógeno son positivas al PAS) (Fig. 1-8). Las grasas neutras son vistas generalmente con los colorantes Sudan (Fig. 1-9). Algunas sustancias como las enzimas se reconocen a través de su actividad, esto quiere decir que el tejido se incuba con el substrato específico de la enzima junto a un generador de color, si la enzima esta presente entonces actúa sobre su substrato el producto reaccionara con el generador de color produciendo un complejo coloreado en el lugar de la reacción, sino hay enzima , entonces no hay color (Fig. 1-10).

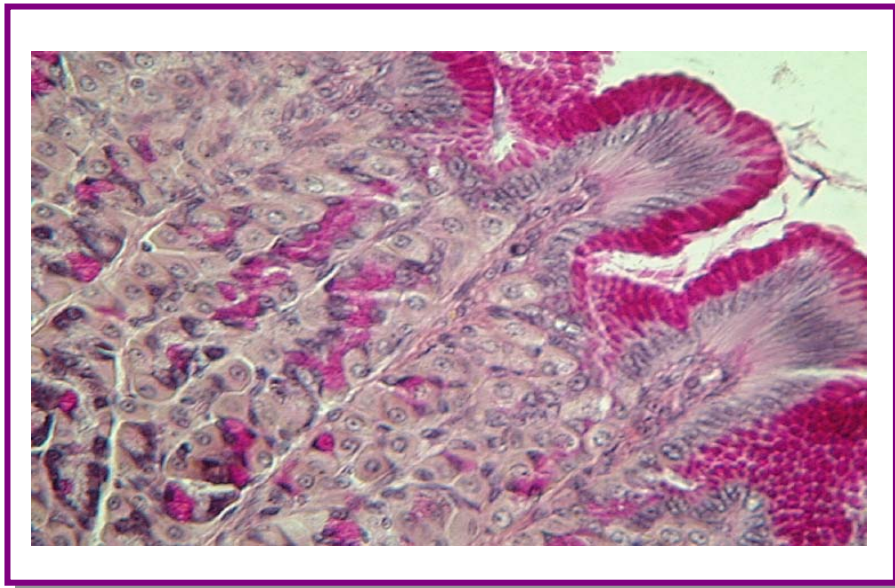


Figura 1-8. Estomago con la reacción de PAS para demostrar mucinas.

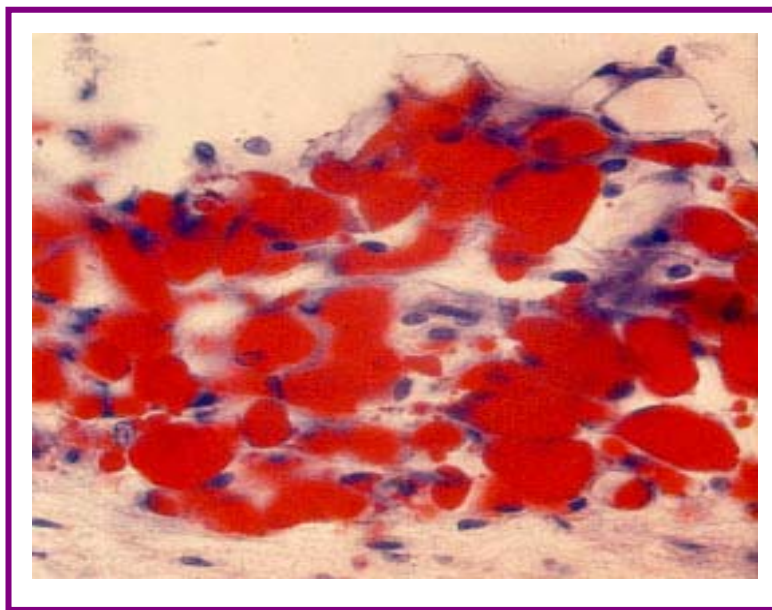


Figura 1-9. Demostración de grasas neutras en tejido adiposo.

Hay que mencionar además que hoy en día existen procedimientos mucho más sofisticados que demuestran sustancias de manera mucho más específicas, estas son las pruebas inmunohistoquímicas.

Las pruebas inmunohistoquímicas deben su especificidad al uso de anticuerpos contra antígenos tisulares; así por ejemplo si deseamos demostrar las células que secretan gastrina, entonces usaremos un anticuerpo Anti-gastrina, dicho anticuerpo tiene una marca fácil de visualizar, que puede ser un colorante fluorescente (fluorocromo) (Fig.1-11), o puede ser una enzima que se demuestra por su actividad según lo descrito líneas arriba (Fig.1-12).

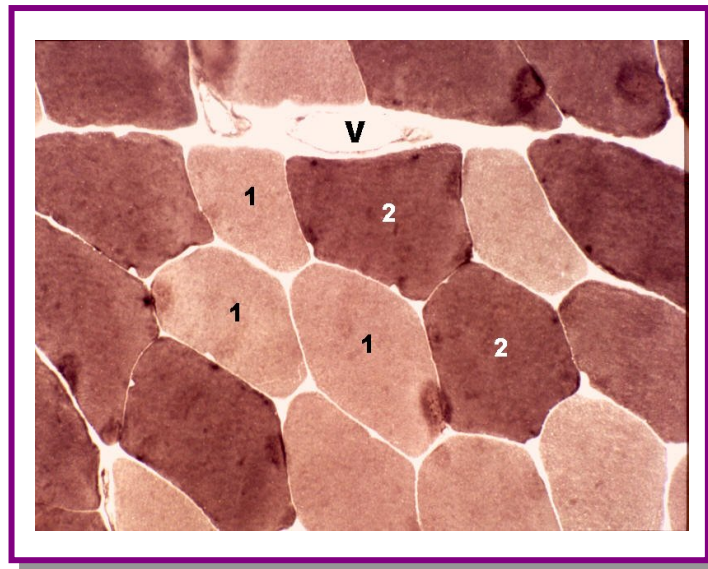


Figura 1-10. Demostración de ATPasa en corte de músculo estriado.

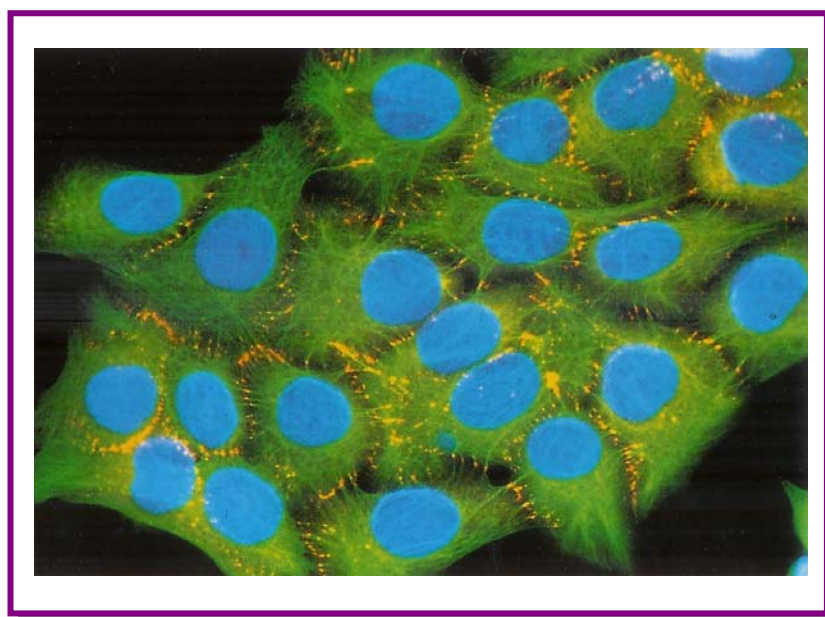


Figura 1-11. Inmunofluorescencia (anticuerpos marcados con fluorocromos) en corte de piel para demostrar desmosomas (amarillo), núcleo (azul) y citoesqueleto (verde).

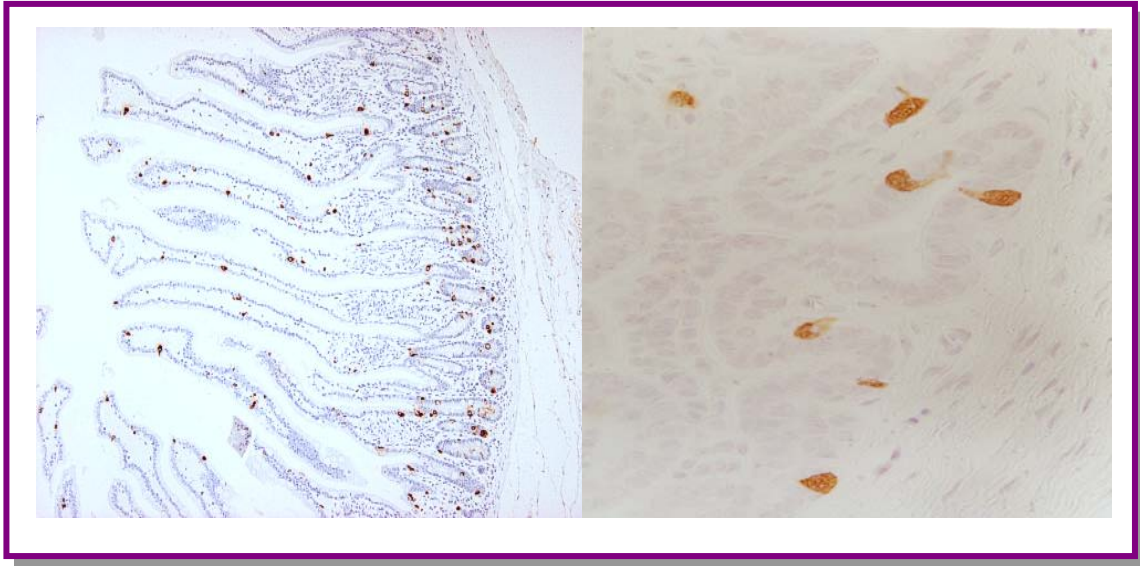


Figura 1-12. Demostración inmunohistoquímica de células neuroendocrinas del tracto gastrointestinal. Izquierda 10X, derecha 40X (anticuerpos marcados con enzima peroxidada).

MICROSCOPIA

El microscopio tiene como finalidad la amplificación de la imagen, esto lógicamente se logra con los sistemas de lentes que posee; a saber, el microscopio tiene tres sistemas de lentes, el objetivo, que se encuentra cerca al objeto de estudio (lámina), el ocular que es por donde se mira el objeto y el condensador, que está por debajo de la lámina y que sirve para concentrar los haces luminosos que proceden de la fuente luminosa, y que atraviesan el objeto de estudio. Una característica importante de un microscopio es su poder de resolución, esto es la capacidad que tiene el aparato de poder definir como dos puntos separados algo que aparenta ser uno solo. Así por ejemplo nuestra vista puede resolver dos puntos separados a 0.2 mm y un buen microscopio puede resolver a 0.25 μm , esto quiere decir que puntos separados a menos de esa distancia serán vistos como si fueran uno solo.

Los microscopios que se suelen usar en los cursos de biología o histología, y en general de uso común, son los microscopios de campo claro, sin embargo existen otros tipos de microscopios que permiten hacer estudios más minuciosos o especializados que permiten demostrar algunas estructuras que no se podrían apreciar con la microscopía convencional.

Microscopio de Contraste de Fase, este microscopio permite poder ver estructuras internas de las células sin la necesidad que estas estén coloreadas y por tanto se podrán estudiar células vivas (Fig. 1-13 izquierda). Las ondas luminosas que viajan en fase desde su fuente de origen, al atravesar los tejidos sufren un cierto retraso de unas con relación a otras, este desfase de las ondas luminosas, invisibles al ojo humano, es transformado en visibles gracias a un proceso de interferencia que se da en el microscopio. Esto se logra gracias a un condensador modificado para cada objetivo y una placa de fase que se encuentra en cada objetivo.

Microscopio de Polarización, este tipo de microscopio permite reconocer en los tejidos sustancias birrefringentes o también llamadas anisotrópicas, o sea aquellas que pueden girar el plano de luz polarizada. Un microscopio común lo podemos convertir en microscopio de polarización si le adicionamos dos filtros Polaroid, uno de ellos entre la fuente de luz y la lámina (polarizador) y el otro entre la lámina y el observador (analyzer); estos filtros deberán estar de manera perpendicular uno con relación al otro para poder hacer el estudio correspondiente. Las bandas del músculo estriado deben su nombre de bandas A (anisotrópico) y bandas I (isotrópico) al estudio con microscopio de polarización (Fig. 1-13 derecha).

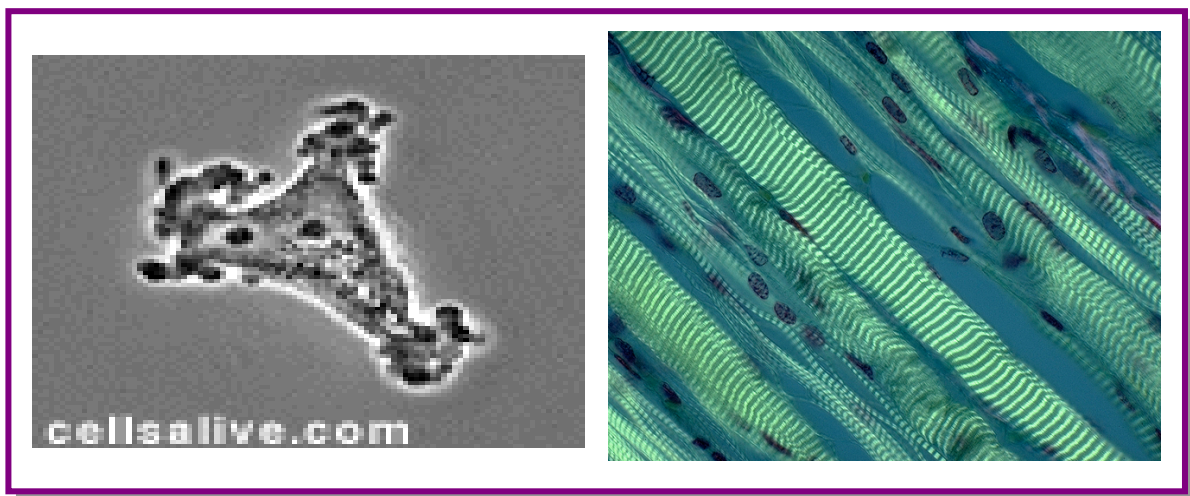


Figura 1-13. Izquierda, célula vista con microscopía de contraste de fase; derecha músculo estriado visto con microscopía de polarización.

Microscopio de Fluorescencia, existen sustancias que tienen la capacidad de transformar la luz de longitud de onda corta (UV) invisible, en luz de longitud de onda larga, visible; esta propiedad se denomina fluorescencia y requiere un microscopio especial, que posea una fuente de luz de alta potencia que genere luz UV y una serie de filtros, unos llamados excitadores que dejan pasar luz UV y eliminan la luz visible, y otros bloqueadores que dejan pasar la luz visible y eliminan la luz UV. Los primeros se colocan entre la fuente luminosa y la lámina, mientras los segundos se colocan entre la lámina y el observador. Algunas sustancias dentro de los tejidos poseen la capacidad de fluorecer (fluorescencia primaria) sin embargo es más común el uso de fluorocromos para resaltar las estructuras que deseamos investigar (fluorescencia secundaria) sobre todo en los métodos inmunofluorescentes (Fig. 1-14).

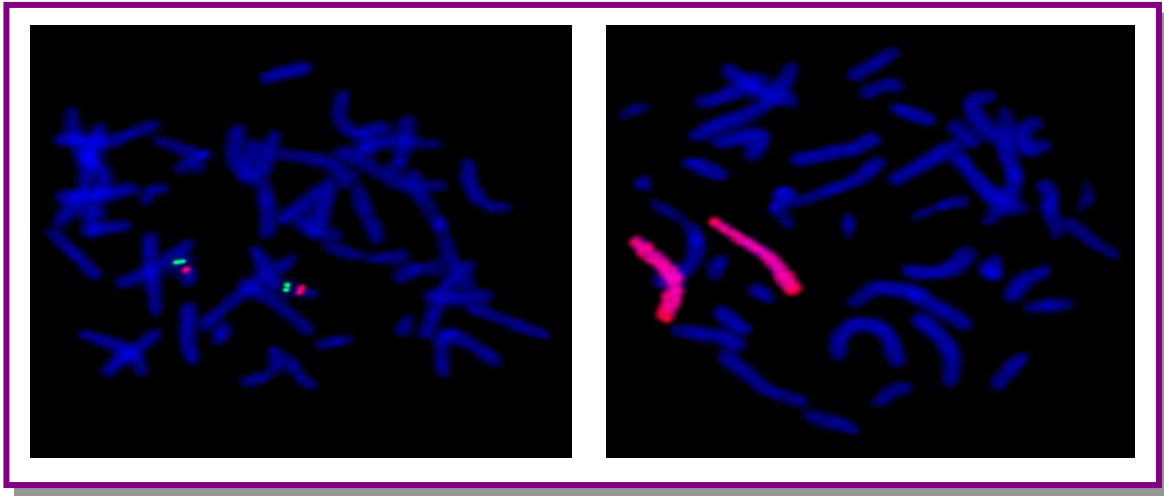


Figura 1-14. Estudio de cromosomas con microscopia de fluorescencia.

Microscopio Electrónico. La capacidad de resolución de un microscopio esta directamente relacionado a la longitud de onda de la luz usada, esto quiere decir que mientras más corta la longitud de onda detalles más pequeños se podrán observa en la muestra; en virtud de ese concepto se ideó el uso de haces de electrones, ya que estos viajan con longitudes de onda de 0.005 nm (a diferencia de la luz visible de 500 nm). El microscopio electrónico consta de una fuente productora de electrones, y un sistema de aceleración de los mismos, los cuales van a pasar por un conjunto de lentes electromagnéticas, (que hacen las veces de los lentes de cristal en la microscopia de luz); cuando los electrones llegan a la muestra unos pasan y otros son dispersados, los que pasan van formando la imagen gracias a los lentes electromagnéticos, los electrones que forman la imagen se proyectan en una pantalla fluorescente o en una placa fotográfica (Fig. 1-15). Este gran poder del microscopio electrónico permite que se puedan tener imágenes con aumentos de 500,000 veces o más, a diferencia de un buen microscopio de luz que solo nos permite aumentos de 1000 a 1200 veces.

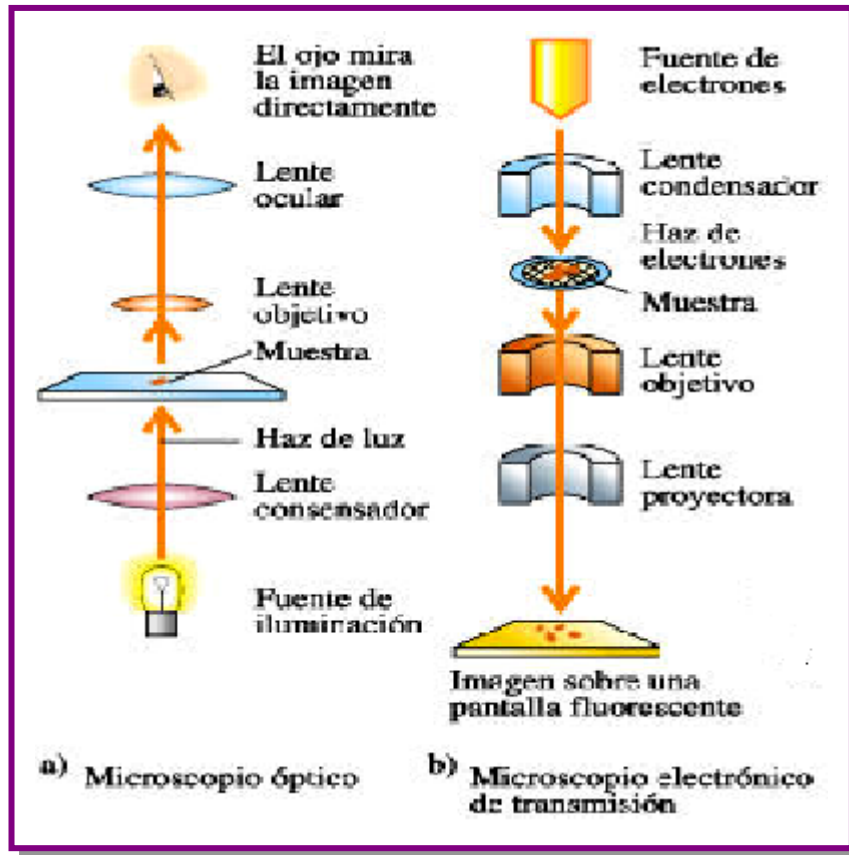


Figura 1-15. Comparación entre un microscopio óptico y un microscopio electrónico.