

Trabajo Práctico N°1 MÉTODOS E INSTRUMENTOS DE ESTUDIO DE LA HISTOLOGÍA

PARTE I: TÉCNICA HISTOLÓGICA

DEFINICIÓN:

Se denomina Técnica Histológica al conjunto de operaciones a que se somete una materia organizada, a fin de que sea posible su estudio por medio del microscopio, posibilitando la observación de estructuras no visibles al ojo humano.

METODOLOGÍA DE ESTUDIO:

Los métodos para el estudio de una materia organizada son:

1) Examen inmediato o in vivo:

a) Al estado fresco: Animales microscópicos uni o multicelulares, células libres de animales superiores (descamadas naturalmente, por raspado o por extracción, por pincelamiento, etc.), componentes celulares que quedan libres por métodos que desintegran la célula (mitocondrias, núcleo, membrana plasmática), órganos muy delgados (mesenterio, o cortes finos directos de tejidos como el cartilaginoso), células obtenidas de cultivos de tejidos. En éstos casos, para evitar la desecación y prolongar las posibilidades de observación, se agregan líquidos como suero sanguíneo, suero fisiológico a temperatura semejante a la del animal, usando platinas calientes a 36° - 37° C.

b) Examen con coloración vital: Usando soluciones muy diluidas de colorantes no tóxicos, que se introducen por vía digestiva o por inyecciones, o que actúan sobre células libres, método que se describe más adelante. (Ver página 9).

2) Examen mediato o de post – mortem:

Exigen la muerte de las células y seguir una serie de pasos que constituyen la Técnica Histológica Universal, ya que se utiliza en todos los laboratorios y sus resultados se interpretan de la misma manera.

PASOS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA CORRIENTE (Parafina – Hematoxilina – Eosina):

En el desarrollo de la misma, se pueden distinguir la sucesión de los siguientes procesos:

- 1) **Obtención del material histológico.**
- 2) **Proceso de fijación.**
- 3) **Proceso de inclusión.**
- 4) **Obtención de cortes.**
- 5) **Proceso de coloración.**
- 6) **Montaje final.**

1) OBTENCIÓN DEL MATERIAL:

El mismo generalmente proviene de:

- a) Biopsias quirúrgicas.
- b) Material obtenido de necropsias.
- c) Utilización de animales de laboratorio.
- d) Estudios experimentales en animales o vegetales.
- e) Material obtenido por cultivo de tejidos.
- f) Frotis o extendidos.

En la obtención del material histológico hay que cumplir con varias reglas, como ser:

- * Realizar la toma del tejido del lugar correcto.
- * Es preciso obrar con cuidado y precaución, a fin de evitar la destrucción de los tejidos.

- * Cortar la pieza de órganos macizos en trozos pequeños (entre 1 y 3 cm. x 0,5 cm.), teniendo en cuenta la configuración anatómica.
- * Los órganos huecos no deben ser muy distendidos para que se conserve su aspecto normal.
- * Realizar éste proceso con la mayor rapidez posible para evitar la autodestrucción del tejido (autólisis).

2) PROCESO DE FIJACIÓN:

Por medio de la fijación se busca interrumpir el desarrollo de los procesos orgánicos fijando y conservando de la manera más fidedigna posible el estado y la situación en que se encontraban los tejidos en vida. Los tejidos deben ser fijados inmediatamente después de extirparlos; ésta es la única forma de interrumpir instantáneamente los procesos vitales. Si la fijación se produce algún tiempo después de la obtención del material, puede suceder que ya hayan comenzado los procesos de post – mortem. En un organismo muerto pueden tener lugar varios tipos de desintegración, como por ejemplo, “*la autólisis*”, que consiste en la destrucción de los tejidos por sus propias enzimas locales producidas por los lisosomas. El segundo tipo de desintegración consiste en la “*putrefacción*”, en donde se produce la destrucción de los tejidos en acción conjunta con las bacterias.

Por lo enunciado, podemos definir a la “*Fijación*” como un proceso que consiste en alcanzar una situación estable de los constituyentes tisulares, debido a la interrupción de las reacciones enzimáticas.

Clasificación de los fijadores:

Simples	Formol al 10 %. Glutaraldehído. Acetona. Tetróxido de osmio. Alcohol absoluto, 96 %, 80 % y metílico. Bicloruro de mercurio.
----------------	---

A - QUÍMICOS

Compuestos o mezclas fijadoras	Líquido de Fleming. Líquido de Zenker. Líquido de Bouin.
---	--

**Desecación.
Calor seco y calor húmedo.**

B – FÍSICOS

**Frío.
Congelación y desecación.**

FIJADORES QUÍMICOS SIMPLES:

* **Formol al 10 %:** Es el más utilizado. Su empleo debe aconsejarse en todos los casos en que no se disponga de un fijador especial, principalmente cuando se trata de fijar órganos o tejidos para estudios histológicos. Conserva bien los tejidos y por ello está indicado en el estudio del sistema nervioso y es muy utilizado en anatomía patológica para la fijación de piezas operatorias o de biopsias. En el comercio se lo encuentra a una solución de Formaldehído al 40 %.

* **Glutaraldehído y Tetróxido de osmio (ácido ósmico):** Son muy buenos fijadores, muy utilizados en microscopía electrónica, ya que preservan las estructuras finas y algunos sistemas enzimáticos.

* **Alcohol etílico, absoluto y de 96 %:** Son malos fijadores. Su uso se indica sobre todo en microquímica, pues conserva sin alterarlos a muchos componentes celulares (glucógeno, mucina, etc.) y en citología.

* **Alcohol metílico:** Se emplea para fijar extendidos de sangre y de líquidos de punción, que se colorean posteriormente con métodos especiales.

FIJADORES QUÍMICOS COMPUESTOS O MEZCLAS FIJADORAS:

En su composición entra un número variable de fijadores simples, elegidos según sus cualidades. Ellas son:

* **Líquido de Bouin:** Consiste en una mezcla picro – formol – acética. Es el mejor fijador, ya que es muy penetrante y permite fijar piezas de hasta 1 cm. la duración de la fijación es de hasta 8 días, pero el tiempo óptimo es 3 días. No se debe lavar la pieza al sacarla del fijador.

* **Líquido de Fleming.**

* **Líquido de Zenker.**

FIJADORES FÍSICOS:

* **Desecación:** Se lo utiliza en extendidos de sangre, líquidos de punción. Si se efectúa rápidamente detiene los procesos de post – mortem y permite el empleo posterior de fijadores químicos o calor seco para completar la fijación.

* **Calor seco:** Es utilizado a menudo en bacteriología sobre extendidos desecados, poco empleado en histología.

* **Calor húmedo:** En forma de agua hirviente es utilizado en algunas investigaciones microquímicas o para fijar invertebrados.

* **Frío:** No es un verdadero fijador, pero detiene los procesos vitales y los cadavéricos de necrosis y autólisis, pero en cuanto deja de actuar, se reanudan las actividades vitales si la célula no ha muerto, o se desarrollan los procesos de post – mortem.

* **Congelación – desecación (Método de Altmann – Gersh).**

Reglas de la fijación:

* El material debe ser cortado en trozos pequeños y no demasiado grueso, para facilitar la penetración del fijador.

* La relación del volumen entre el objeto a fijar y el fijador, varía según el fijador empleado, pero como mínimo la relación debe ser de 1 a 20.

* El líquido fijador se debe verter primero en el frasco y luego se introducen los trozos de tejido; en caso contrario quedan éstos pegados en el fondo y no se fijan por ese lado. Si son tejidos que tienden a ir al fondo (hígado, músculo, glándulas), se debe agitar el frasco durante unos minutos. Los tejidos que flotan (pulmón, grasas), se recubren con un trozo de algodón o papel de filtro para que se pongan totalmente en contacto con el fijador.

* La duración del tiempo de fijación varía según el fijador utilizado, el tamaño y la textura del tejido. El general y como promedio, 24 horas es suficiente, pero puede quedar en el líquido fijador, sobre todo con el formol taponado durante varios años.

* la osmolaridad es un factor importante y debe en lo posible tener una concentración iónica en el fijador similar al tejido que se va a fijar. Las variaciones de la osmolaridad se logran por la adición de cloruro de sodio, sacarosa o dextrán.

Mecanismo de acción de los fijadores:

Va a depender de la sustancia utilizada, pueden describirse 4 mecanismos de acción:

a) Por coagulación de las proteínas: Sin combinarse con ella, como por ejemplo lo hace el alcohol, ácido pícrico, yodo, formol, etc.

- b) Formando combinaciones químicas con las sustancias orgánicas de las células o tejidos como por ejemplo el ácido crómico y sus sales, bicromato de potasio, bicromato de amoníaco, etc.
- c) Por reducción al contacto con las sustancias orgánicas formando un precipitado muy fino, como por ejemplo el ácido ósmico, bicloruro de mercurio, etc.
- d) Por oxidación, como por ejemplo el bicromato de potasio.

3) PROCESO DE INCLUSIÓN:

Para obtener cortes delgados, en un solo plano y uniformes, es necesario que las piezas adquieran una dureza determinada

Si bien en ésta guía de estudio se describe los pasos de la Técnica Histológica corriente, en la cual se utiliza para la obtención del corte el método de inclusión, es necesario aclarar que existen 2 procedimientos fundamentales para la obtención del corte, ellos son:

a) Previa congelación del material de estudio: Este procedimiento confiere a los tejidos un endurecimiento uniforme y permite realizar diagnósticos inmediatos de piezas operatorias y estudios histoquímicos, ya que la congelación no altera la composición química de los componentes histológicos del material a examinar.

b) Previa inclusión del material en una sustancia denominada Parafina: El material congelado no reúne de manera suficiente las condiciones óptimas, ya que los cortes obtenidos por congelación son siempre más gruesos que los obtenidos por inclusión. Por lo dicho y si se cuenta con el tiempo necesario, es preferible impregnar los tejidos con una sustancia líquida que luego pasa a una fase sólida y homogénea. Este procedimiento se denomina “Inclusión”. En su transcurso, se deposita el medio de inclusión en todos aquellos lugares en donde se encuentra el agua, o donde ésta ha sido extraída. Los medios o sustancias de inclusión pueden ser: **Solubles en el agua:** Como ser la “Celoidina, Gelatina, Plexiglas, o bien **Insolubles en el agua:** Como por ejemplo la “Parafina” y otros.

En la Técnica Histológica corriente, solo nos interesa el empleo de la parafina como medio de inclusión, y dado que no es soluble en agua, su empleo condiciona la previa extracción del agua contenida en el tejido que se va a someter al proceso de inclusión. Es así que la inclusión consta de los siguientes pasos:

- a) Deshidratación.
- b) Aclaración.
- c) Impregnación en parafina y confección del taco o bloque.

a) Deshidratación:

Tiene por finalidad la extracción del agua del tejido para que la parafina ocupe su lugar. Si el material no se deshidrata suficientemente, la inclusión es defectuosa. En éste paso se emplea una serie de alcoholes en concentración creciente: 70°, 80°, 96°, 100°. Las piezas se dejan en la serie creciente de alcoholes adaptando el tiempo de permanencia al contenido de agua de la pieza, a su tamaño y a la pureza de los alcoholes. Las piezas deben permanecer en la capa superior colgándolas. El tiempo varía según el tamaño de la pieza de 1 a 12 horas en cada alcohol generalmente.

b) Aclaración:

Una vez obtenida la deshidratación absoluta de la pieza, se coloca a la misma en el seno de un líquido, que mezclándose con el alcohol, tenga al mismo tiempo la propiedad de disolver la parafina, es por ésta propiedad que recibe el nombre de “Líquido intermediario”. Pertenecen a éste grupo de sustancias el **cloroformo, toluol, xilol y benzol**, siendo éste último el más utilizado. Al ser la parafina insoluble en alcohol, es necesario que el líquido intermediario lo reemplace por completo, por tal motivo conviene renovarlo una o dos veces para asegurarnos que todo el rastro de alcohol ha desaparecido. Para darnos si la penetración del líquido intermediario es completa, debemos observar la pieza; éste al penetrar en el tejido anhidro, produce una transparencia característica en el mismo, y es por ésta razón que también se los llama “Aclarantes”. El tiempo varía según la sustancia usada y el tamaño de la pieza, generalmente de 1 a 3 horas en cada baño.

c) Impregnación en parafina (inclusión propiamente dicha):

La parafina utilizada en la Técnica Histológica es una mezcla de cadenas de 22 carbonos hasta 29 carbonos, variando su punto de fusión entre 45° a 60° C, según su composición. Como su nombre lo indica, es una sustancia químicamente inactiva, por lo que puede conservarse indefinidamente en la estufa. Se liquefacta con facilidad a los 56° C y a temperatura ambiente se encuentra en estado sólido. Las piezas, después de haber sido aclaradas, se pasan a una mezcla de parafina líquida y líquido intermediario en partes iguales y se las lleva a la estufa durante una hora. Luego se las introduce en un recipiente que tenga parafina líquida y se guarda en la estufa para que la parafina impregne totalmente el tejido en toda su intimidad. La inclusión completa de las piezas dura aproximadamente 4 horas.

Confección del taco o bloque:

Después de los pasos arriba mencionados, viene la inclusión definitiva del trozo de tejido, que nos dará no-solo la solidificación de la parafina interna de la pieza, sino también una envoltura que facilitará su ulterior manejo y corte, utilizándose para cumplir con lo cometido, un molde especial de metal denominado “barras de Leuckart”, dentro del cual se vierte parafina líquida a 60° C. Allí se deposita la pieza que se saca del baño de parafina en que se encontraba, cuidando de orientarla convenientemente para saber después la dirección en que debe ser cortada. Se deja a enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos o más, y una vez solidificada se retira del molde obteniéndose de éste modo el taco que queda listo para ser cortado por el micrótopo.

En ésta situación la pieza puede conservarse indefinidamente. El objeto de la inclusión en parafina es proporcionar al tejido la consistencia suficiente y necesaria para que pueda ser reducido a cortes finos que posean un grosor tal en micras para que permita el paso de la luz y ser examinados con el microscopio.

4) OBTENCIÓN DE LOS CORTES:

Con el objeto de realizar los cortes adecuados para el estudio al microscopio, se utilizan distintos métodos y variados aparatos de gran precisión, a los que se denominan “*Micrótopos*”. Su empleo está condicionado al estudio que se desee realizar en los diversos tejidos. Así se cuenta con micrótopos de deslizamiento, micrótopo Tetrander, micrótopo de parafina tipo Minot (cuchilla fija), el ultramicrótopo, criótopo, entre otros. El de cuchilla fija o tipo Minot es el más utilizado en la Técnica Histológica corriente; es uno de los más perfectos, pues nos da cortes seriados automáticamente en forma de cinta; el espesor del corte puede variar de 2 a 20 μm . Los espesores más utilizados van desde 5 a 8 μm . La elección del grosor depende de la textura del tejido y de los elementos y detalles que se quieran observar y estudiar.

El micrótopo de tipo Minot consta de dos grandes partes:

* **El carril de la cuchilla:** Es una pieza fija durante el corte, provista de tornillos en su base, de la que emergen dos pilares paralelos en cuya parte superior se encuentran dos discos cilíndricos ranurados y móviles provistos de tornillos. En la ranura se introduce la cuchilla por su borde menos ancho, se la orienta con relación a la superficie del corte y se la ajusta. la calidad de los cortes, dependerá de las propiedades de la cuchilla. Existen varios tipos de cuchillas: Planocóncavas, plano hipercóncavas, biplano simple, biplano conofacetada, de vidrio, de diamante, entre otras.

* **La platina:** Es una pieza de metal que posee canales excavados en la superficie dispuestos concéntricamente, su tamaño es variable y forma es cuadrangular o circular. En la platina se debe fijar la pieza a cortar, lo que se logra fundiendo la parafina con una espátula de metal calentada a la llama y que tendrá contacto con la superficie canaliculada. Siempre el lado elegido para esto será el lado opuesto al que se desea cortar. La platina conjuntamente con el carro en que se encuentra montada es lo que se desliza verticalmente cuando se hace girar la manija y al mismo tiempo cada vez que llega a su extremidad superior, se corre hacia delante en un número de micras previamente elegido, que nos dará el espesor del corte.

Montaje del corte:

Los cortes se retiran del micrótopo con un pincel de pelo fino y se extienden en agua corriente contenida en una bandeja o cápsula de Petri. Luego de ser lavados, se vierte en el mismo recipiente agua a 45° C para que los cortes se extiendan bien y uniformemente. Luego en esa misma agua se introducen los portaobjetos desgrasados y bien limpios, sobre los cuales anteriormente se ha depositado una fina capa de albúmina glicerizada o albúmina de Mayer (mezcla en partes iguales de clara de huevo y glicerina con un cristal de timol como antiséptico), para que la adherencia del tejido sea mayor y con la ayuda de una aguja histológica se empujan los cortes que flotan en el líquido hasta colocarlos en el portaobjeto. Posteriormente se llevan los portaobjetos ubicados en una escalerilla de madera a la estufa para mejorar su adherencia por coagulación de la albúmina.

5) PROCESO DE COLORACIÓN:

Definición: Coloración es el proceso por el cual un cuerpo toma color bajo la acción de un colorante y no desaparece con lavados de la misma sustancia en que se disolvió el colorante.

Fundamentación: Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas, poseen poco contraste o carecen de él completamente, por lo que no van a poder ser distinguidas al microscopio. Este inconveniente queda salvado por la propiedad que tienen los distintos componentes celulares y tisulares de incorporar con variable intensidad sustancias colorantes. En la Técnica Histológica corriente solo nos interesa dos colorantes: Hematoxilina y Eosina.

Definición de colorantes: Son todas aquellas sustancias que pueden comunicar su color a otros cuerpos, sea el mismo color que ellas tienen (colorantes ortocromáticos), o bien teñir de un color distinto (colorantes metacromáticos, ejemplo: Azul de Toluidina, tinte de rojo determinados grupos químicos de las células y azul todo lo demás)

Clasificación de colorantes:

1 - Naturales

Animales: **Carmín**
Hematoxilina
Vegetales: **Orceína**
Azafrán

2 – Artificiales o sintéticos

Ácidos: Sales con base incolora y ácido coloreado.
Ejemplo: **Eosina**, colorante citoplasmático.

Básicos: Sales con base coloreada y ácido incoloro.
Ejemplo: **Azul de metileno**, colorante nuclear.

Neutros: Sales con base y ácido coloreados.
Ejemplo: **Eosinato de azul de metileno**,
Colorea al núcleo de un color y citoplasma de otro.

3 – Indiferentes:

No forman sales. Tiñen aquellas sustancias que tienen poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante.
Ejemplo: **Sudán III, Rojo escarlata.**

Sustancias basófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con colorantes básicos.

Sustancias acidófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con colorantes ácidos.

Sustancias neutrófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con colorantes neutros.

Sustancias azurófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con azul de metileno.

Sustancias osmiófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con tetróxido de osmio.

Sustancias argirófilas:

Son los componentes de las estructuras que se tiñen con sales de plata.

Métodos de coloración:

* **Coloración directa o sustantiva:** Cuando existe una verdadera afinidad entre el objeto y la sustancia colorante.

* **Coloración indirecta o adjetiva:** Cuando requiere la intervención de intermediarios o *mordientes* para que la coloración tenga lugar. El mordiente puede actuar antes del baño con el colorante o formar parte de él. En éste último caso, la combinación formada recibe el nombre de “*Laca*”. Ejemplo: Alumbre de Potasio o de Sodio.

* **Coloración progresiva:** Se hace actuar al colorante hasta que llegue hasta su punto óptimo.

* **Coloración regresiva:** Se realiza primero una sobrecoloración y luego se elimina el exceso de colorante por medio de diferenciadores. Este proceso se denomina “*diferenciación*” y se lleva a cabo con agua, alcoholes, bases o soluciones metálicas.

* **Coloración simple:** Cuando se colorean solamente algunos elementos del preparado. Como núcleos, fibras elásticas, glucógeno, etc.

* **Coloración combinada:** Cuando se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos, recurriéndose en general al empleo sucesivo de colores básicos y ácidos que contrastan por sus colores. Ejemplo: Hematoxilina, tiñe de violeta el núcleo; Eosina, tiñe de rosado el citoplasma.

* **Coloración panóptica:** Es una coloración combinada realizada sucesivamente por colorantes neutros. Ejemplo: May – Grünwald – Giemsa.

* **Coloración pancrómica:** Cuando en un solo baño colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesitan. Ejemplo: Pancrómico de Laverman, de Pappenheim.

* **Coloración en bloque:** Colorea a la pieza en su conjunto antes de cortarla. Es poco utilizada.

* **Coloración en cortes:** Colorea cada corte por separado. Es el método más largo pero de resultados superiores.

Técnica de coloración con Hematoxilina y Eosina:

Hematoxilina: Es un colorante nuclear, está cargado positivamente y es por lo tanto un colorante básico. Se deposita en los grupos fosfatos del ADN y ARN que tienen carga negativa. Es el colorante nuclear más utilizado. Se lo obtiene a partir de la extracción del palo de campeche (hematoxilon campechianum). La sustancia es incolora y ha de ser transformada primero por oxidación en **hemateína** que es el auténtico colorante. La hemateína es un colorante **indirecto**, por lo que requiere el uso de un mordiente, que en la práctica el más usado es el Hemalumbre de Mayer, que forma parte de la coloración hematoxilina – eosina, y que está compuesto por hemateína, alumbre de potasio y ácido cítrico. Colorea al núcleo de color violeta. Es una coloración **progresiva**.

Eosina: Es un colorante artificial, débilmente ácido que pertenece al grupo de las fluoresceínas. Es fácilmente soluble en agua. Colorea al citoplasma, tejido

conjuntivo, fibras colágenas de rosado intensas. Químicamente es un eosinato de potasio, siendo el ácido eosínico el que actúa en la coloración. Es una coloración **regresiva y directa**.

Procedimientos para colorear la muestra:

a) Desparafinización e hidratación del corte: Dado que los colorantes se hallan en soluciones acuosas, la parafina impedirá su entrada. Como solvente de la parafina se utiliza Benzol o Xilol, completando con el pasaje por alcoholes en orden decreciente 100°, 96°, 80°, 70°, finalizando con agua destilada.

b) Coloración propiamente dicha: comienza con la hematoxilina, virado con agua corriente (débilmente alcalina) o agregando carbonato de litio. Se pasa luego a la eosina, con la cual se sobrecolorea, para luego eliminar el exceso.

Coloración vital:

Consiste en el empleo de soluciones muy diluidas de sustancias colorantes no tóxicas, para estudiar a una muestra de células o tejidos. Los colorantes utilizados son el Verde Jano, Azul tripán, Rojo congo, Rojo neutro, Azul pirrol, etc. La coloración vital se clasifica en:

a) Coloración intravital: Se basa en la introducción de colorantes no tóxicos en el organismo vivo por vías digestiva, subcutánea, al torrente sanguíneo o linfático. Luego se mata al animal y se sigue los pasos de la Técnica Histológica corriente. En la observación microscópica se verán determinadas estructuras que contienen el colorante.

b) Coloración supravital: Se realiza sobre células libres, extraídas del organismo, como el caso de células sanguíneas, células de raspado de la mucosa bucal o vaginal, cortes finos de tejido cartilaginoso que conserva su vitalidad. Hay que proceder a la observación rápida antes de que comiencen los procesos de post – mortem.

Coloraciones especiales:

Técnica de Papanicolaou: Se la utiliza para citología exfoliativa. El método permite estudiar cantidad, forma y color de las células de la mucosa vaginal, obtenidas con fines diagnósticos. Los colorantes utilizados son: Hematoxilina – orange G, verde brillante, eosina pardo de Bismarck.

Las células que se observan desde la superficie hasta la profundidad son: Acidófilas y basófilas superficiales (cariopícnóticas), Intermedias, y Profundas (basófilas).

Técnica Tricrómica de Masson: Se la utiliza para diferenciar tejido conjuntivo del tejido muscular. El primero se tiñe de azul o verde y el muscular de distintos tonos de rojo. Los colorantes utilizados son: Punzó de xilidina y azul de anilina.

Técnica panóptica de Pappenheim (colorantes de May Grünwald Giemsa): Se la utiliza para extendidos de sangre. La técnica consiste en: * Obtener una gota de sangre periférica.

* Hacer el extendido.

* Secar a temperatura ambiente.

* Cubrir con 15 gotas de May Grünwald, 15 minutos.

* Agregar igual cantidad de agua destilada en gotas, dejar 1 minuto y volcar sin lavar.

* Cubrir con solución de Giemsa (30 cc de agua destilada y 35 gotas del colorante), dejar 10 – 15 minutos.

* Enjuagar con agua destilada, secar y montar.

Técnica de Impregnación Argéntica: Coloración especial que utiliza sales metálicas como cloruro de oro, nitrato de plata, sales de cromo, originando precipitados metálicos. La técnica consiste en tratar el material (ejemplo fibras reticulares) con una solución de una sal reducible de plata y a continuación con un agente reductor, que actúa como lo hacen los reveladores de fotografías, convirtiendo la sal de plata en plata metálica, que torna de negro a los componentes que la toman. Una sustancia es “*Argentafin*” cuando reduce la plata, y es “*Argirófila*” cuando la impregnación es posible luego de una reducción con mordientes o formalina.

Técnicas Histoquímicas:

a) **Técnicas de coloración para proteínas:** Se basan en el reconocimiento y localización de determinados aminoácidos o bien se utilizan anticuerpos específicos marcados para determinadas proteínas.

b) **Técnicas de coloración para nucleoproteínas y ácidos nucleicos:** Para identificar al ADN y ARN se cuenta con dos métodos:

* **Métodos comunes a ambos ácidos nucleicos:** A través del uso de **colorantes nucleares o básicos** como la Hematoxilina, Azul de metileno o de Toluidina; a través la **absorción de rayos ultravioletas** de determinadas longitudes de onda; o bien, con el empleo de **isótopos radioactivos**, como timidina tritiada que pone en evidencia la Timina del ADN, o uridina tritiada para demostrar Uracilo en el ARN.

* **Métodos de identificación diferencial: REACCIÓN DE FEULGEN O DE FEULGEN – ROSEMBECK:** Es específica para ADN, pues depende del azúcar Desoxirribosa. Tras una hidrólisis ligera por la acción breve sobre los cortes de ácido clorhídrico diluido, se logra la extracción del ARN y la desintegración de la unión desoxirribosa – purina, con liberación de grupos aldehídos, sobre los cuales actúa el reactivo de Schiff (fucsina básica decolorada con anhídrido sulfuroso), con el que se tratan los cortes. Se obtiene un color púrpura o violeta oscuro en las estructuras que contienen ADN, color tanto más marcado, cuanto mayor es su concentración. Se demuestra así la ubicación del ADN en la cromatina de núcleos interfásicos, en cromosomas durante la mitosis, y muy pequeña cantidad en mitocondrias y en los cloroplastos de las células vegetales.

c) **Técnicas de coloración para Hidratos de Carbono (Carbohidratos o Glúcidos):** Se utilizan los siguientes métodos:

* **Reacción de PAS (Peryodic acid Schiff):** Se basa en la liberación de grupos aldehídos por la acción oxidante del ácido periódico y su evidencia ulterior por medio del reactivo de Schiff. Tiñe de rojo o rojo púrpura a las estructuras que han liberado los aldehídos. Será positiva para las siguientes estructuras: Membrana basal, células caliciformes, células que contengan glucógeno como por ejemplo los Hepatocitos y las células musculares. Existen otras sustancias que no son hidratos de carbono pero que son Pas positivas como los lípidos no saturados, fibras colágena y reticular.

* **Método de Alcian Blue:** Tiñe selectivamente los polisacáridos ácidos en solución de pH de 2,2 o menos. Tiene también especial afinidad por los grupos sulfatados, coloreando de azul a los mucopolisacáridos ácidos, y no tiñe a los neutros.

d) **Técnicas de coloración para lípidos:** Utilizando colorantes tipo **Sudán III**, insolubles en agua y muy solubles en grasa. No es un verdadero método de coloración, sino un proceso de transferencia de color por disolución de la sustancia empleada en el lípido. Otros colorantes son **Sudán IV, Rojo escarlata, Sudán negro B**, entre otros. Tener en cuenta que cuando se quiere proceder al reconocimiento de lípidos, es necesario elegir un fijador que no los disuelva, aconsejándose formol al 10 % o líquido de Bouin en cortes con micrótomos de congelación.

6) MONTAJE FINAL:

Tiene por objeto mejorar la observación, facilitar el manejo y aumentar la duración de los preparados histológicos. La coloración deja totalmente embebido en agua al preparado y debe ser eliminada. Esta parte de la Técnica Histológica consta de 4 pasos:

a) **Deshidratación:** A través de alcoholes en forma creciente 70°, 80°, 96°, 100°.

b) **Homogenización (aclaramiento o diafanización):** Con benzol o xilol, adicionando ácido carbónico o fénico, muy ávidos de agua.

c) **Colocación del cubreobjeto:** Para proteger la preparación, se recubre con una laminilla de vidrio muy fina y de diversos tamaños. Para adherir el cubreobjeto al porta, quedando entre ambos el corte, se utiliza Bálsamo de Canadá, sustancia soluble en benzol o xilol, de modo que difunde bien en el corte aclarado. Además su índice de refracción es semejante al del vidrio, lo cual evita la desviación de los rayos luminosos.

TÉCNICA HISTOLÓGICA PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

- 1) Utilizar fragmentos de menos de 1 mm.
 - 2) Fijar con tetróxido de osmio, o aldehído glutárico, con el agregado o no de ácido tánico.
 - 3) Deshidratar la muestra.
 - 4) Inclusión en resina epoxi, que dan la dureza necesaria para obtener cortes de 200 A° a 0,1 *um*.
 - 5) Cortar con ultramicrotomo de avance muy lento y cuchillas de vidrio o diamante.
 - 6) Recepción de los cortes en agua y luego en una rejilla de cobre recubierta por una delgada rejilla plástica (Formvar), que será la que sostenga el corte.
 - 7) Pasar por ácido ósmico, acetato de uracilo, sales de plomo, etc., que se depositarán sobre determinados componentes celulares.
 - 8) Observación en pantalla fluorescente.
 - 9) Toma de fotografías y ampliaciones a voluntad.
- La Técnica es la misma para la microscopia de barrido.

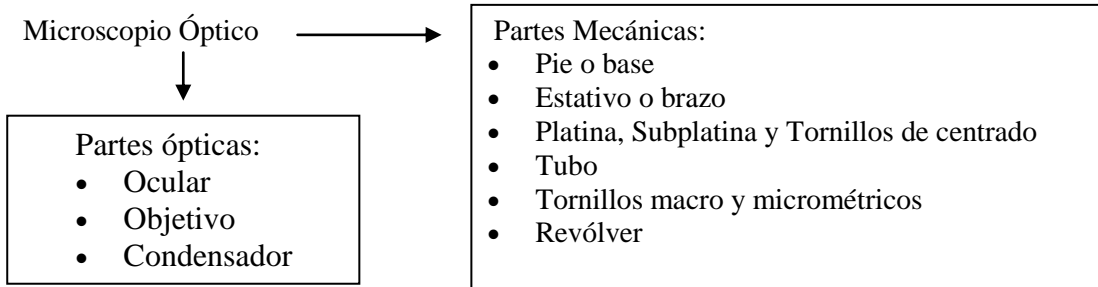
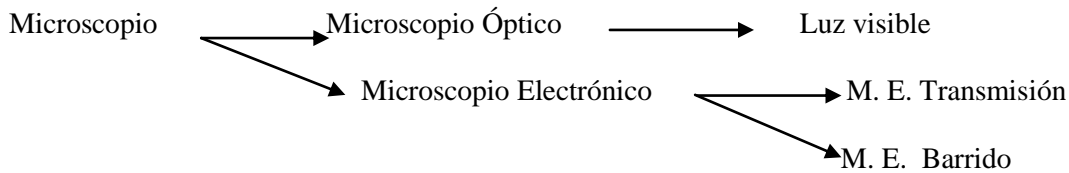
MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

- Usa anticuerpos para moléculas específicas para detectar su presencia en los tejidos
- Los anticuerpos se obtienen inoculando proteínas a animales y extrayéndolos luego del suero
- La reacción Antígeno - Anticuerpo se evidencia mediante una coloración marrón dorado.

PARTE II: MICROSCOPIA

MICROSCOPIA

Se dispone de varios tipos de microscopios para el estudio de material biológico (células y tejidos).



Microscopio Electrónico de Transmisión: (MET)

Reemplaza la luz visible por un haz de electrones que produce un muy alto poder de resolución.

En este sistema se reemplazan los lentes (cristales) por campos electromagnéticos, estos producen la amplificación de la imagen. Este haz de electrones viaja en un tubo de alto vacío, la imagen formada es registrada en la pantalla (monitor) o en una placa fotográfica. La formación de la imagen depende de la dispersión de los electrones. La imagen se debe a la ausencia de esos electrones. Depende del número atómico (de los átomos presentes en el objeto) y del grosor del objeto.

Los cortes son de 1/40 micras (250 Armstrong) de espesor. Se pueden obtener aumentos de hasta 160.000 veces.

Microscopio Electrónico de Barrido: (MEB)

A diferencia de los microscopios ópticos, el MEB utiliza un haz de electrones que se trasladan en una trayectoria libre de colisiones (columna de alto vacío) e interactúan con el espécimen, recorriendo la topografía de la muestra. El bombardeo de la muestra con el haz produce un elevado número de señales, las que son captadas por un detector y transformadas en una imagen.

Para la observación en alto vacío el material debe cumplir con dos requisitos: estar seco y ser conductivo. Los pasos a seguir para acondicionarlas son los siguientes:

- Fijación: Se realiza a fin de detener los procesos fisiológicos del material y conservarlos lo más parecido posible al estado vivo. Se usa una mezcla de solventes como el FAA (formol, alcohol y ác. Acético).
- Deshidratación: El agua presente en las muestras y/o en los fijadores al evaporarse, produce contaminación de la columna del MEB y deformación de la superficie de la muestra. Por ello los especímenes deben deshidratarse y secarse para su observación. La deshidratación se realiza por tratamiento del material en una serie acetónica ascendente. El secado se lleva a cabo por el proceso de punto crítico, que consiste en reemplazar la acetona por anhídrido carbónico (CO₂) líquido, el cual pasa a la fase gaseosa sin generar calor de evaporación. De este modo las muestras se secan sin colapsarse, ya que no están sujetas a los daños causados por la tensión superficial.

- **Metalización:** Los especímenes a observar se recubren con una delgada capa de material conductor (Au, Au/Pd, C), a fin de evitar los fenómenos de carga y daño por barrido de electrones a la muestra. El procedimiento para lograr este recubrimiento es la evaporación del metal en atmósfera de plasma de Argón.

ACTIVIDAD PRÁCTICA CITOLOGÍA

Preparado N° 1: EXTENDIDO CÉRVICO-VAGINAL. MÉTODO DE PAPANICOLAOU.

La superficie del cuello uterino y de la vagina están recubiertas por un epitelio plano estratificado, con múltiples capas. Este epitelio puede estudiarse obteniendo células con ayuda de espátulas, extendiéndolas sobre un portaobjetos y tiñéndolas con el método de Papanicolaou (citología cérvico-vaginal); esta técnica se conoce como ***citología exfoliativa*** y constituye el método de elección para la detección precoz del cáncer cervical y lesiones precursoras.

Se distinguen los siguientes tipos celulares:

A - Células superficiales: son de contorno poligonal, citoplasma amplio, en algunas acidófilo o eosinófilo y en otras basófilo. El núcleo es central, pequeño, picnótico, cromatina condensada.

B - Células intermedias: son de contorno poligonal, citoplasma amplio, siempre basófilo. El núcleo es central, más amplio, cromatina más laxa.

C - Células profundas: son de contorno redondeado, citoplasma reducido, siempre basófilo. El núcleo es central, más amplio, cromatina más laxa.

Entre las células epiteliales pueden observarse células sanguíneas, como respuesta a la inflamación, las que serán analizadas en actividades posteriores.

La observación de extendidos cérvico-vaginales tiene como objetivo la práctica del enfoque microscópico de los preparados histológicos y la apreciación de células y sus componentes principales, así como el reconocimiento de formas, dimensiones y propiedades tintoriales.

En el círculo que se encuentra al final de página, dibuje según lo que se indica:

1. Enfoque la preparación a menor aumento, establezca que se trata de células aisladas, libres, sin asociación o sea un extendido.
2. Ubique una de las células en el centro del campo microscópico y enfóquela a mayor aumento:
 - a. Indique citoplasma y núcleo.
 - b. Describa: forma, tamaño, citoplasma (basófilo-acidófilo; homogéneo-heterogéneo), núcleo (forma, tamaño, posición, nucléolo/s, cromatina).
 - c. Señale el límite núcleo-citoplasmático.
3. Correlacione:
 - a. Forma celular con forma nuclear.
 - b. Tamaño celular con tamaño nuclear.

