



UNIDAD TEMÁTICA DE HISTOLOGÍA 1 (UTH1): MICROSCOPIA Y TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

- Adquirir la habilidad del **Manejo del Microscopio Óptico**
 - Reconocer los componentes ópticos y mecánicos de un microscopio óptico.
 - Realizar una correcta iluminación.
 - Enfocar correctamente con las distintas lentes objetivo.

- Comprender el fundamento y la utilidad de las diferentes **Técnicas Histológicas**.
 - **Técnica Histológica de Rutina**- Hematoxilina y Eosina (**H&E**): conceptos de Basofilia y Acidofilia. Reconocimiento de estructuras con y sin afinidad por HyE. Artificios de técnica.
 - **Técnicas Especiales**: fundamento y utilidad. Dicho conocimiento será aplicado a lo largo del curso de la materia en las respectivas unidades.

- Interpretar **Incidencias de Corte** de diferentes estructuras tisulares.
 - Definir e Interpretar la incidencia de corte longitudinal, transversal, oblicuo y tangencial.
 - Identificar estructuras con diferentes incidencias de corte y justificar.
 - Relacionar la imagen bidimensional observada en un corte histológico con la estructura tridimensional original.

APARTADO DE MICROSCOPIA

Partes del microscopio óptico (MO)

1. ÓPTICA

- Objetivos: sistema de lentes biconvexas que proporciona una imagen real, aumentada e invertida del preparado. Pueden ser secos (si sólo hay interpuesto aire entre éste y el preparado) o de inmersión (si hay otro medio distinto al aire por ejemplo aceite), su aumento puede ser de 4 o 5 X, 10X, 40X y 100X.
- Oculares: están ubicados en el extremo superior del microscopio y proporcionan una imagen virtual, aumentada y derecha del preparado. Su aumento suele ser de 10X.
- Sistema de iluminación: los microscopios más antiguos (monoculares) presentan un espejo que es necesario moverlo para hacer incidir la luz de la lámpara de luz de la mesada de trabajo con el fin de poder iluminar la totalidad del campo. En los más modernos (binoculares) la fuente luminosa está incorporada a la base del mismo.
 - a) Condensador: enfoca la luz sobre el preparado proporcionando un cono de luz.
 - b) Diafragma: limita el haz de luz, eliminando los rayos más desviados.
 - c) Filtros: seleccionan las longitudes de onda de los rayos que van a incidir sobre el preparado.

2. MECÁNICA

- Pie
- Columna
- Platina y carro: la platina da soporte a la muestra, presenta un orificio para permitir el paso de la luz y el carro que permite recorrer el preparado.
- Tubo
- Revólver: es un dispositivo giratorio ubicado en la base del tubo que permite intercambiar objetivos durante la observación.
- Tornillo macrométrico
- Tornillo micrométrico



Indicaciones para el correcto uso del microscopio

Iluminación del Campo

Microscopios Monoculares: colocar el espejo para que se proyecte la fuente de luz hacia el condensador. La cara plana se emplea cuando la fuente luminosa es concreta (lámpara) mientras que la cara cóncava se utiliza cuando se emplea luz difusa (luz ambiente).

Microscopios Binoculares: su fuente de luz esta incorporada en la base del microscopio bastará con encender la luz y regular la intensidad de la iluminación.

IMPORTANTE: observar por el ocular que TODO el campo se encuentre iluminado antes de colocar el preparado.

Enfoque

- Verificar que el objetivo colocado sea panorámico (4X) o seco débil (10X)
- Verifique observando por el ocular que el campo se encuentre bien iluminado.
- Colocar el preparado en la platina con el **cubreobjetos hacia arriba** y ubicar la zona de la muestra en el campo iluminado.
- Acerque el objetivo (4x o 10x) hasta que esté casi en contacto con el preparado** hasta que haga tope, esto se realiza movilizándolo el tornillo macrométrico, mirando desde **AFUERA Y NO POR LOS OCULARES**.
- Observe por el ocular y utilice el tornillo macrométrico.** En el microscopio monocular observara que se desplaza el tubo mientras que en el binocular se desplazará la platina. En ambos casos el preparado se alejara de la lente objetivo hasta lograr el foco donde se observara la imagen. Para lograr un mejor foco puede mover el tornillo micrométrico.
- Luego de recorrer todo el preparado, **cambie el objetivo a seco fuerte (40-45x) rotando el revólver y movilice el tornillo MICROMETRICO hasta obtener foco.**
- Para recorrer** el preparado utilice los tornillos del **carro**. Si necesita realizar foco nuevamente mientras este observando con el **objetivo a seco fuerte SOLO** debe utilizar **el tornillo micrométrico**. En el campo podrá observar una marca o pelo que se utiliza para señalar las diferentes estructuras tisulares con precisión.
- Terminada la observación, rotar el revolver y ubicar nuevamente en el objetivo de menor aumento para retirar el preparado.** **NUNCA** debe retirarse el preparado en seco fuerte (40X) esto podría romper el material de estudio.

Apartado de Técnicas Histológica de Rutina (H&E)

Técnica: conjunto de pasos realizados en una muestra que permiten preservar sus características para una correcta observación permitiendo su descripción en condiciones normales y pudiendo determinar situaciones patológicas. Se denomina muestra histológica cuando se procesa una porción de tejido y citológica cuando se procesan células obtenidas por raspaje o punción aspirativa.

1. Obtención de la muestra:

- Biopsias:** obtención de muestras de tejidos vivos. Las biopsias se realizan con el paciente bajo sedación o anestesia y permiten luego de realizada la técnica histológica observar características microscópicas de los tejidos y diagnosticar condiciones fisiológicas o patológicas de los distintos órganos.
- Autopsias:** obtención de muestras de material cadavérico.
- Raspajes:** permite la obtención de muestras para **observar citología**. **El material debe ser extendido luego se la obtención** sobre un vidrio rectangular llamado portaobjetos antes de continuar con los pasos de la técnica. Ej: extendido vaginal.
- Punción aspirativa:** permite observar **citología**. La muestra se obtiene por aspiración con aguja fina. Similar a los raspajes la muestras obtenidas por punción requieren la extensión del material sobre el portaobjetos para continuar con los restantes pasos de la técnica. Ej: sangre, punción de tiroides, punciones de líquidos orgánicos. La obtención de muestra por raspaje o aspiración con aguja no requiere la sedación previa del paciente.

2.Fijación: Paso fundamental en la técnica que tiene por objetivo preservar la estructura y ultraestructura de los componentes tisulares de la muestra lo mas similares a cuando están vivos, evitando la autólisis del tejido. Los



fijadores pueden ser físicos (someter la muestra a cambios de temperatura como frio o calor) o químicos. Dentro de éstos últimos podemos clasificar fijadores simples y mezclas fijadoras. El más usado es el formol al 10% (formaldehído al 4%) como fijador simple y el líquido de Bouin como mezcla fijadora. En estos casos como la muestra se sumerge en el fijador se habla de fijación por inmersión. Cuando la fijación se realiza por perfusión, ésta precede a la obtención de la muestra que luego recibe una fijación de inmersión de refuerzo.

3. **Deshidratación:** Es la completa eliminación del agua del tejido para luego poder incluirlo en medios no hidrosolubles. Se sumerge la muestra en concentraciones crecientes de alcohol (50%, 70%, 80%, 95% y 100%) para eliminar lentamente el agua y evitar la retracción del tejido.

4. **Aclaración:** Es la sustitución del deshidratante elegido por una sustancia soluble con el medio de inclusión. El aclarante o líquido intermediario más utilizado es el xilol.

5.Inclusión: Tiene como objetivo endurecer la muestra para permitir su corte posterior. El medio de inclusión más usado en MO es la parafina. Para muestras destinadas a microscopía electrónica (ME) se utilizan resinas epoxi. La inclusión requiere que el tejido este deshidratado e inmerso en un medio liposoluble (xilol) para poder aceptar la parafina o resinas.

6.Corte y Montaje: Se realiza con instrumentos especiales llamados micrótomos. Éstos varían si el corte es para MO (secciones de micrómetros, μm , de espesor) o ME (secciones de nanómetros, nm , de espesor). El corte se coloca sobre un portaobjetos de vidrio (este paso suele denominarse montaje inicial)

7.Desparafinar: se sumerge el portaobjetos con la muestra en xilol para retirar la parafina.

8.Rehidratación: debido a que los colorantes utilizados en la técnica de H y E son hidrosolubles se debe recuperar la hidratación del tejido. Para realizar este paso se sumerge la muestra en soluciones con concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 70%,50%).

9.Coloración: primero se colorea con hematoxilina (carga +) y luego con eosina (carga -). Las cargas de los colorantes van a interactuar con las respectivas de los componentes tisulares permitiendo que se observan coloreados.

10.Montaje final: se cubre la muestra ya coloreada con un cubreobjetos de vidrio utilizando un medio de montaje (por ej: bálsamo de Canadá sintético). Si el medio de montaje es liposoluble será necesario repetir los pasos 3 y 4 previos al montaje final.

PREPARADOS FIJOS

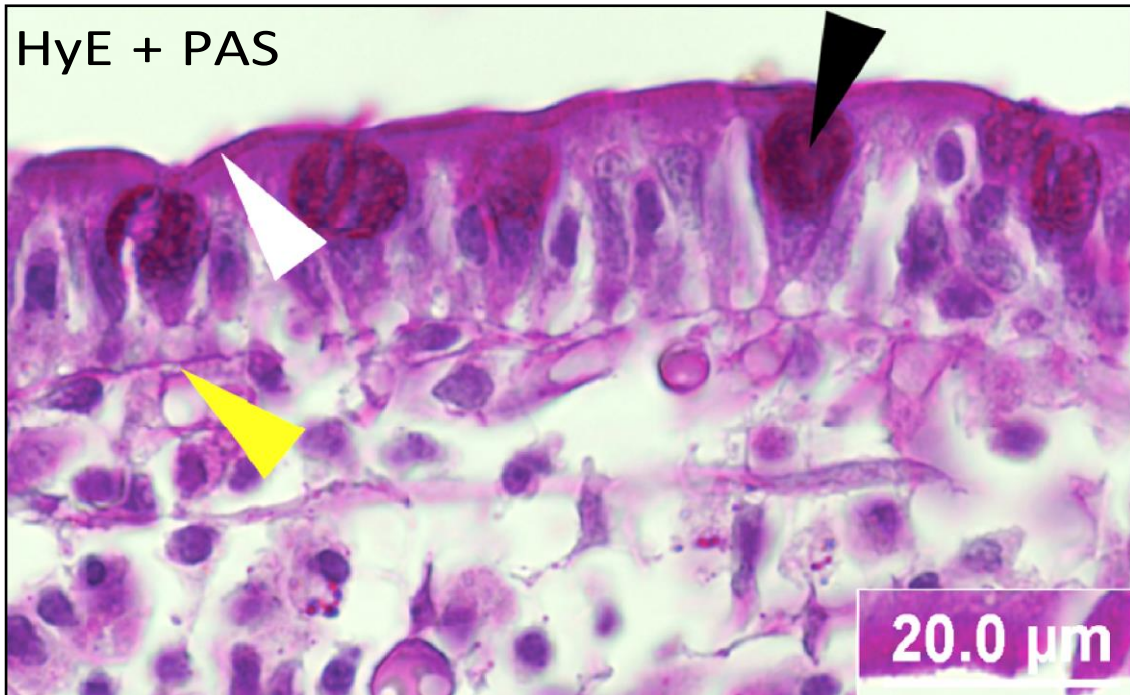
Técnicas Especiales-Preparados Fijos

Tinción de H&E con PAS - preparado fijo de intestino delgado: (puede solicitarse para recorrer)

Mencionar fundamento de la técnica y reconocer estructuras PAS positivas. El fundamento de la técnica se basa en la reacción (**Peryodic Acid Schiff**). Esta implica la ruptura de enlaces de las hexosas con **Ácido Peryódico** para transformar oxidrilos (OH) en aldehídos (C=O) y la posterior coloración de los grupos aldehídos con el reactivo de **Schiff**. La utilidad de la técnica es permitir la observación de estructuras ricas en hidratos de carbono, que no son identificables con H&E ya que por carecer de carga no interactúan con colorantes básicos (+) y ácidos (-) .

En este preparado puede observarse estructuras basófilas, acidófilas y elementos tisulares PAS Positivos como las membranas basales de los epitelios, el glucocálix de la chapa estriada en la membrana apical de los enterocitos y el citoplasma de células de secreción mucosa denominadas caliciformes.

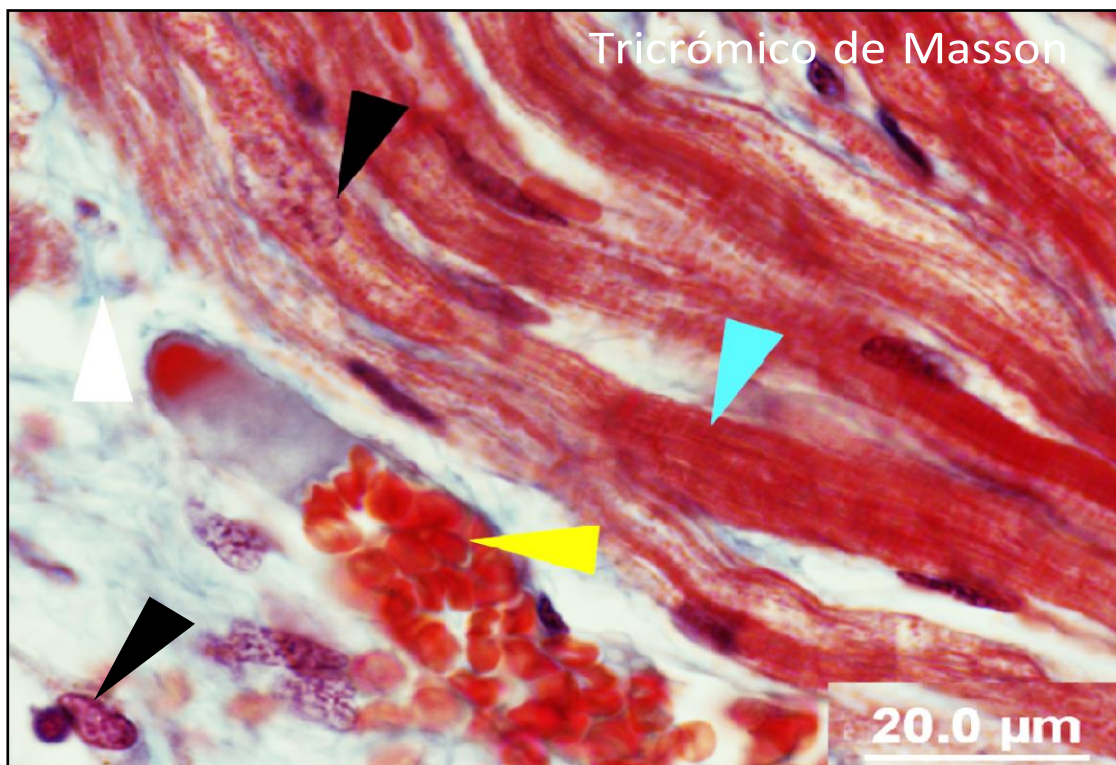
En la imagen se observan estructuras PAS positivas: membrana basal del epitelio (flecha amarilla), el glucocálix de especializaciones de membrana apical (flecha blanca) y el citoplasma de células de secreción mucosa (flecha negra).



Tricrómico de Masson – preparado fijo de corazón de rata:

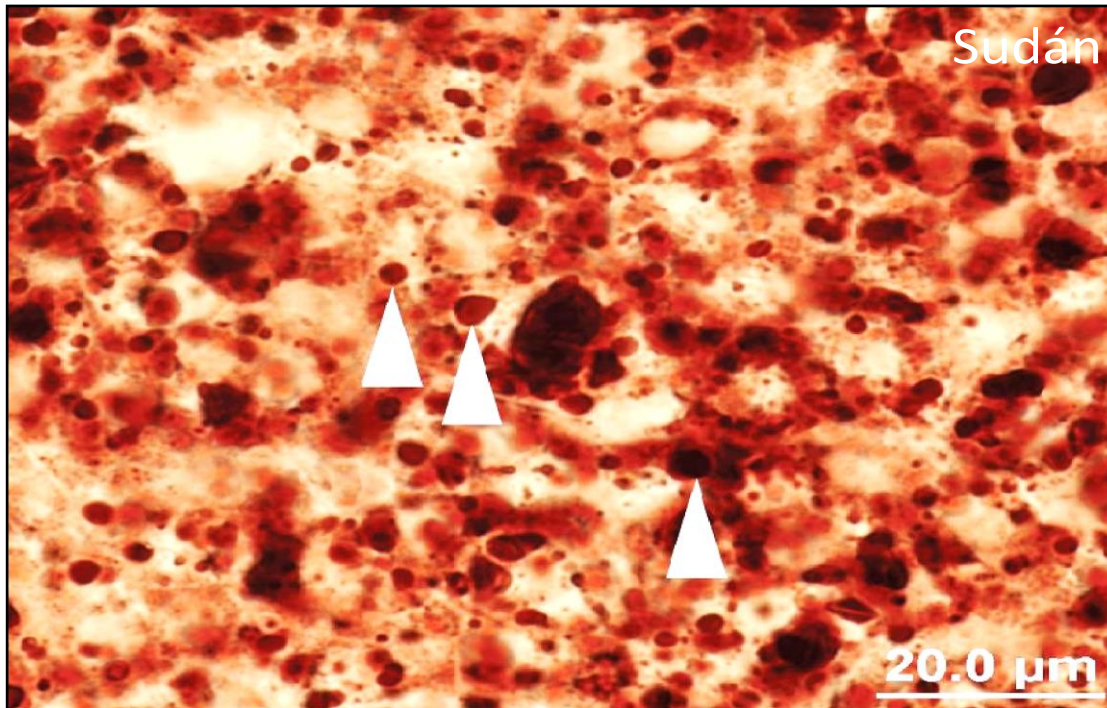
Utiliza solución de Bouin, hematoxilina férrica, escarlata de Biebrich, fucsina ácida, ácido fosfotungstico o fosfomolibdico, verde luz o azul de anilina y solución diferenciadora acuosa de ácido acético glacial. **Resultados:** núcleos (azul negruzco), colágeno (azul o verde), citoplasmas, filamentos de citoqueratina, fibras musculares y eritrocitos (rojo).

En este preparado pueden observarse las fibras colágenas de la matriz extracelular (celeste; flecha blanca), el citoplasma de las fibras musculares esqueléticas cardíacas (rojo; flecha celeste), núcleos (rojos; flecha negra) y los eritrocitos (naranja; flecha amarilla). Comparar con H&E.



Técnica de Sudán - preparado fijo de glándula adrenal:

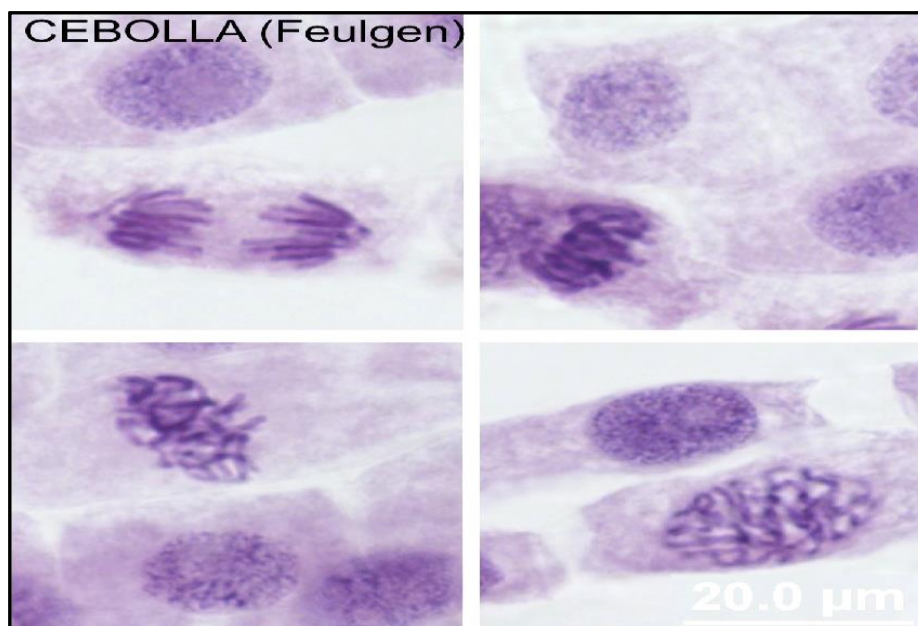
El fundamento de esta técnica se basa en la impregnación de estructuras con alto contenido lipídico por los colorantes sudantes que tiene como utilidad poder observar localización y distribución de lípidos en los tejidos. En este preparado puede observarse la impregnación de las inclusiones lipídicas (flechas blancas) de las células de la corteza adrenal con Sudan Black.



Técnica de Feulgen – preparado fijo de células de cebolla:

El fundamento de esta técnica está basado en la ruptura de las pentosas del ADN con Ácido clorhídrico (HCl), exposición de grupos Aldehídos y posterior interacción de los mismos con el reactivo de Schiff.

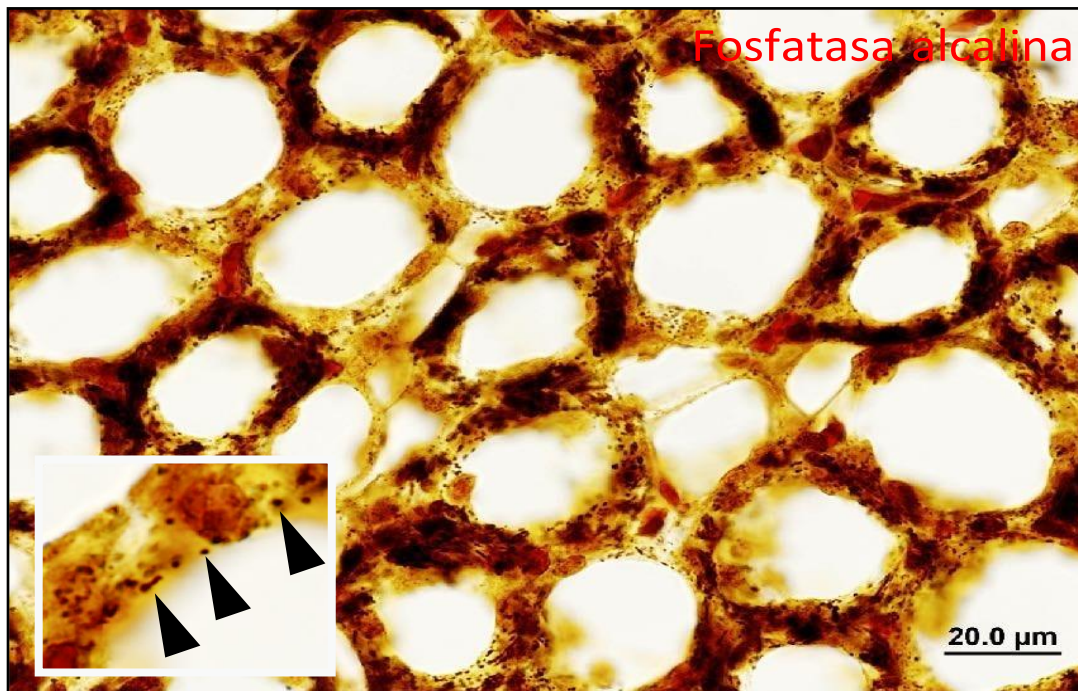
En este extendido celular se puede reconocer la cromatina de células en interfase y los cromosomas en las distintas fases de la mitosis coloreados en rojo magenta.



Técnica de localización de actividad enzimática – preparado fijo de riñón FAL:

El fundamento de las técnicas enzimáticas está basado en la utilización de cromógenos o fluoróforos para detectar actividad enzimática. La utilidad es permitir la detección de localización de determinadas enzimas en tejidos mediante la observación de productos coloreados o emisión de fluorescencia. Esta observación requiere la utilidad de diferentes microscopios ópticos.

En la imagen se identifica la localización de la enzima fosfatasa alcalina en el ribete en cepillo de los túbulos contorneados del riñón.

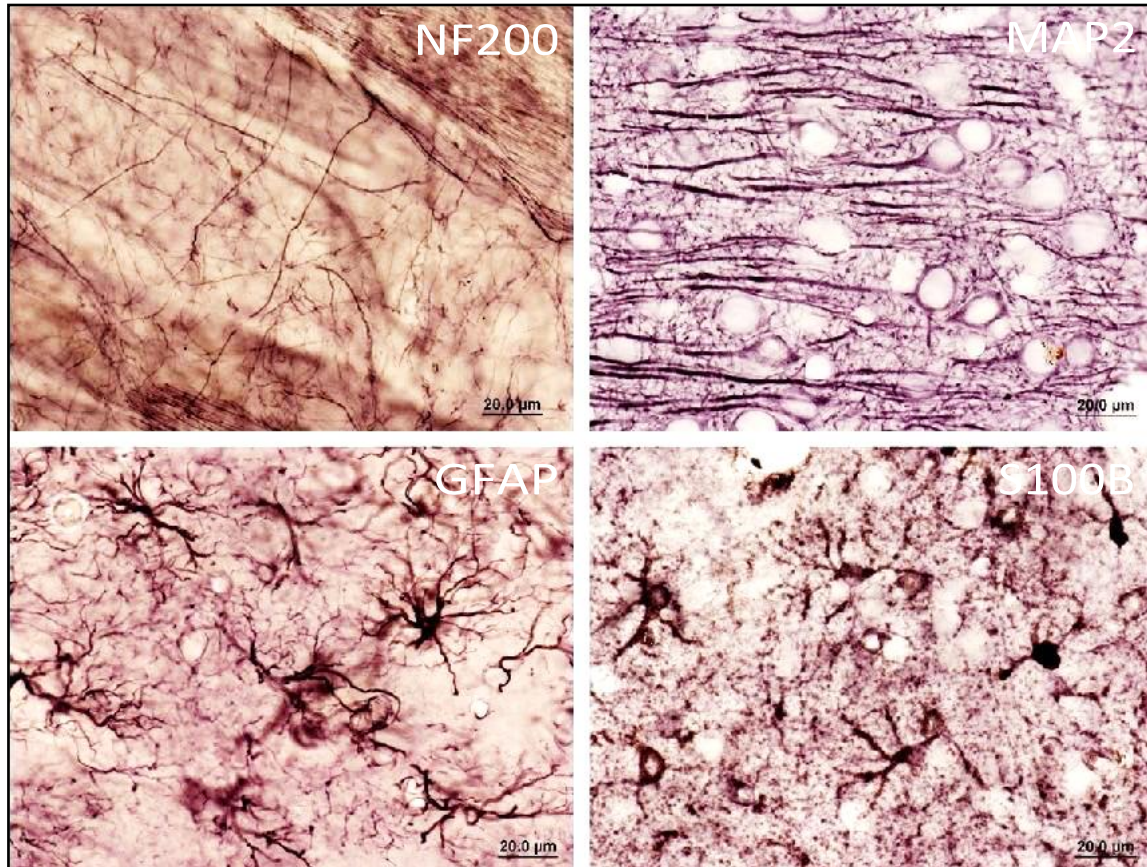


Inmunohistoquímica (IHQ) – preparado fijo de cerebro de rata – GFAP

El fundamento de las técnicas IHQ está basado en la interacción de Antígenos-Anticuerpos. Marcando con Fluoróforos o Enzimas dichos anticuerpos es posible detectar de forma específica presencia y localización de diferentes componentes tisulares. También otorgan posibilidad de obtener datos cuantitativos (% de células con inmunomarcación positiva).

En este preparado puede observarse la expresión de proteínas específicas presentes en los filamentos intermedios de células gliales.

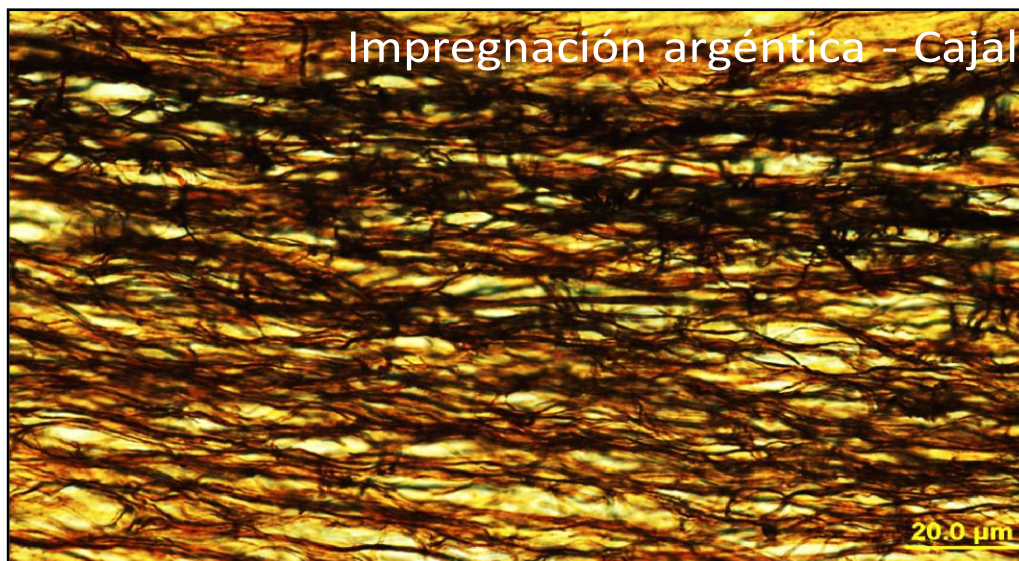
En la imagen se observan: NF200: inmunomarcación específica de una proteína presente los axones de las neuronas (anticuerpo anti-NF200); MAP2: inmunomarcación específica de una proteína presente las dendritas de las neuronas (anticuerpo anti-MAP2); GFAP: Inmunomarcación específica de una proteína presente los astrocitos (anticuerpo anti-GFAP); S100b: inmunomarcación específica de una proteína presente los astrocitos (anticuerpo anti-S100B),



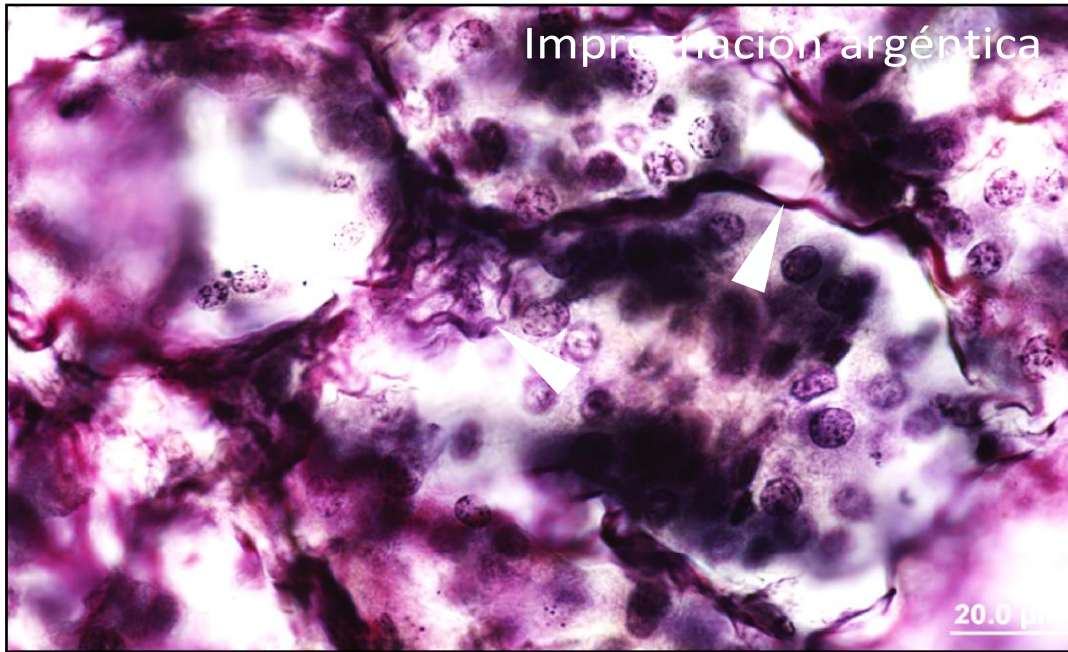
Impregnaciones Argénticas – Cerebelo Cajal. Hígado Reticular.

El fundamento de estas técnicas se basa en la impregnación de estructuras tisulares con sales de plata o metales pesados. Dichas sales precipitan sobre determinadas estructuras tisulares y permite observación. Para realizar las técnicas de impregnaciones es necesario sumergir el taco en el colorante. En este caso el corte y montaje se realiza posterior a la impregnación del tejido.

- **Técnica de Cajal (Cerebelo):** se observan neuronas y sus prolongaciones impregnadas con sales de plata en el cerebelo.



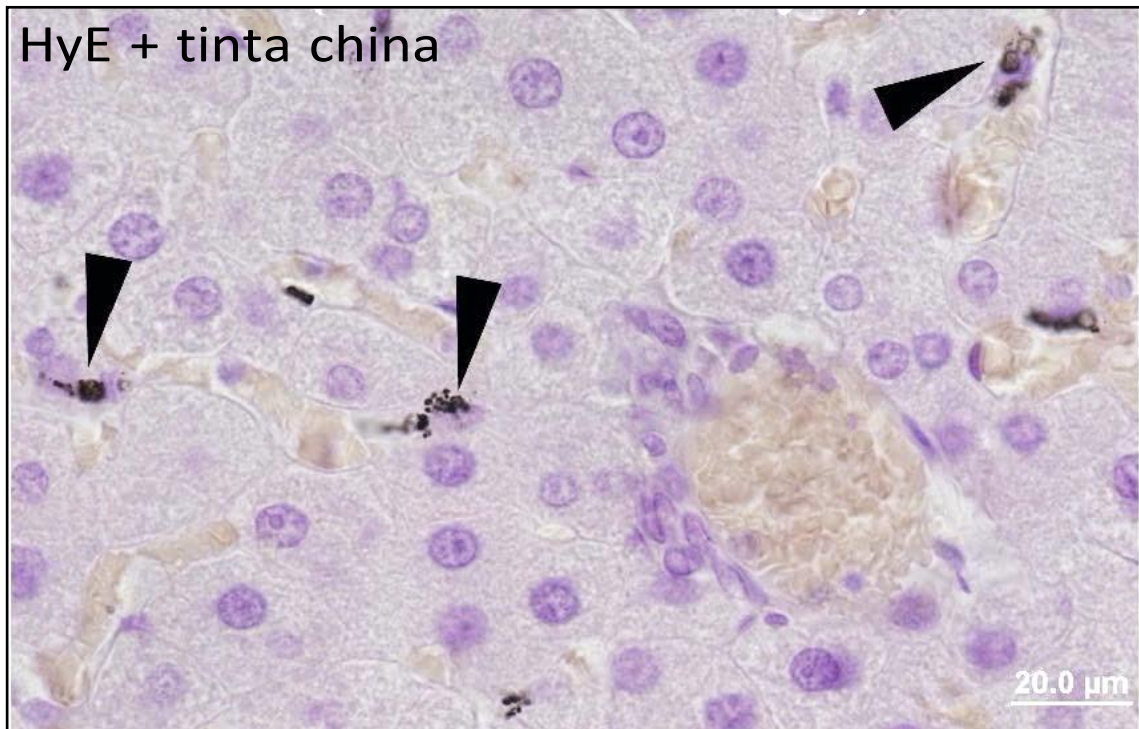
- **Impregnación Argéntica (Riñón):** se observan las fibras reticulares (flechas blancas) del tejido conectivo del riñón impregnadas con sales de plata.



Técnicas Vitales: H&E con infusión de tinta china previa a la fijación— preparado fijo de hígado:

El fundamento de estas técnicas se basa en la infusión endovenosa de colorantes vitales y su posterior circulación y fagocitosis. La utilidad es detectar macrófagos.

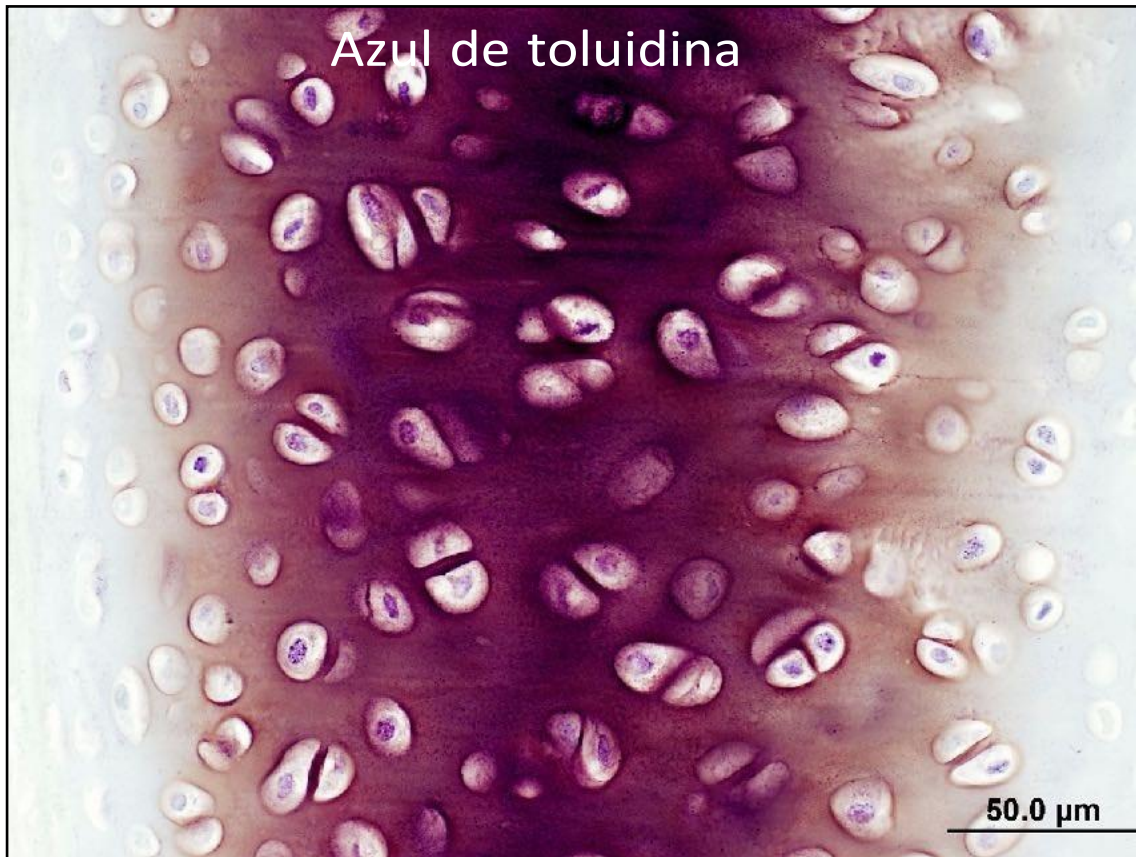
En el preparado se pueden reconocer los macrófagos hepáticos (células de Kupffer; flechas negras) con partículas de tinta china fagocitadas en su citoplasma.



Metacromasia – Tráquea con azul de toluidina.

La metacromasia es una propiedad de determinados tejidos (polianiones) y colorantes básicos metacromáticos (azul de toluidina, azul de metileno) caracterizada por el viraje del color del azul violáceo, típico de la basofilia, al rojo. Para que ocurra este fenómeno tintorial deben interactuar componentes tisulares y colorantes básicos metacromáticos.

En el preparado puede observarse la matriz extracelular del cartilago hialino de la tráquea, rica en GAGs (polianiones) en color rojo luego de interactuar con el azul de toluidina (colorante básico y metacromático).





Actividad de Autoevaluación y Discusión

- 1) **Seleccione** la afirmación correcta respecto a poder resolutorio (PR)
 - a) Aumenta modificando la fuente de luz blanca a ultravioleta.
 - b) Disminuye utilizando objetivos de inmersión.
 - c) Disminuye cuando se utilizan microscopios de fluorescencia.
 - d) Es mayor en microscopios de alto límite de resolución.

- 2) **Señale** en qué microscopio se pueden apreciar más detalles.
 - a. LR:0,4 μm .
 - b. LR:0,3 mm.
 - c. LR:0,4 nm
 - d. LR:0,8 μm

- 3) **Mencione** técnica especial para identificar cada uno de los siguientes componentes tisulares. Justifique.
 - Triglicéridos de un adipocito _____
 - Glicoproteínas de secreción de una célula mucosa _____
 - Peroxidasa de los peroxisomas de un macrófago _____
 - ADN de células que proliferan en cultivo _____
 - Fibras de colágeno de la matriz extracelular _____

- 4) **Defina** Acidofilia y Basofilia. **Cite Ejemplos.**