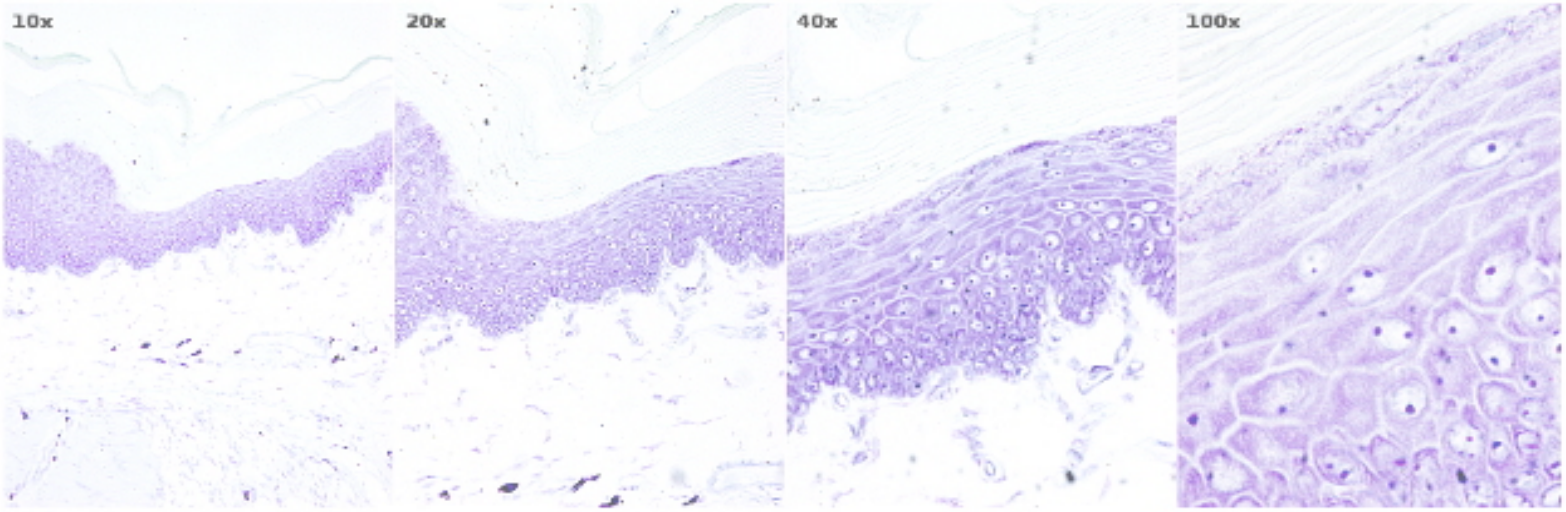
Atlas de Histología Vegetal y Animal

Técnicas histológicas

OBSERVACIÓN



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
Fcacultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 2018)

Este documento es una edición en pdf del sitio
http://mmegias.webs4.uvigo.es/inicio.html.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software LaTeX
(http://www.latex-project.org/), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1 Introducción **1**

2 El proceso histológico **2**

3 Observación **4**

4 Microscopio óptico **5**

5 Microscopio electrónico **8**

1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte y tinción de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos, desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos.También se han añadido algunos vídeos explicativos.

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara mediante la observación directa con los microscopios. Por ello hay procesar las muestras, primero para que no se se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en los que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseemos observar. En el siguiente esquema se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas con unas soluciones líquidas denominadas fijadores, las cuales se usan para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, su estructura se mantendrá hasta su observación. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Normalmente, tras la fijación se procede a incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones ultrafinas (del orden de nanometros), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, fluorescencia, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales.

Como dijimos al comienzo existen múltiples variaciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

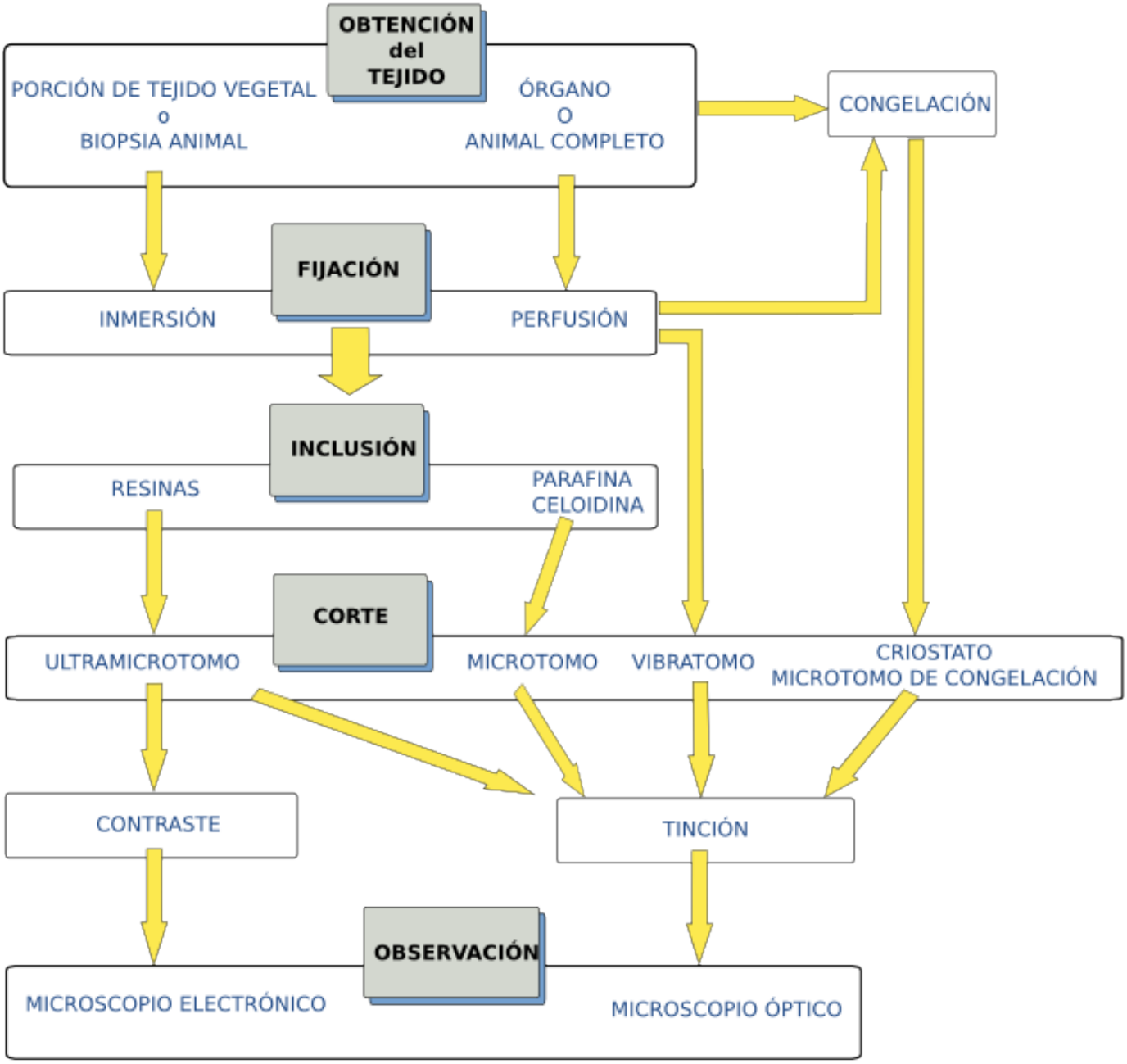


Figura 1. Esquema del proceso histológico.

3 Observación

El último paso de todo proceso histológico es la observación del resultado producido por la técnica realizada. El poder de resolución del ojo humano es de 0,2 mm (poder de resolución: distancia mínima a la que se discriminan dos puntos), mientras que una célula eucariota típica suele tener unas dimensiones que oscilan entre 10 y 50 micrómetros (μm. 1 μm=10-6 mm). Además, si queremos estudiar la ultraestructura celular hay que tener en cuenta que el grosor de una membrana celular es de unos 7 nanometros. Todo ello implica que necesitamos aparatos que nos permitan aumentar al imagen de las muestras para discriminar estructuras tisulares diminutas como son las células o sus compartimentos. Estos aparatos se llaman microscopios.

Hay dos tipos de microscopios: los ópticos y los electrónicos.

Los microscopios ópticos, o de campo claro, utilizan la luz visible y lentes de cristal que permiten un aumento de las muestras de unas 1000 veces, con un poder de resolución de unos 0,2 micrómetros. Ésta es la máxima resolución que permite la luz visible por sus propiedades de onda. Los microscopios se usan para observaciones generales, características celulares y tisulares, y están presentes en todos los laboratorios de histología.

Los microscopios electrónicos se basan en la alta frecuencia de los electrones para conseguir un poder de resolución de 1 nanometro. Se usan para observar la ultraestructura de la célula y los tejidos, es decir, para estudiar el nivel subcelular, como orgánulos, membranas u organizaciones moleculares (por ejemplo, se pueden observar los ribosomas). Hay dos tipos de microscopios electrónicos: los de transmisión, que se usan para estudiar la ultraestructura de la célula en secciones muy finas, y el de barrido, que permite estudiar superficies.

A los microscopios, sobre todo los ópticos, se les pueden añadir dispositivos que permiten ampliar su potencialidad. Por ejemplo, al microscopio óptico se le puede adaptar una fuente luminosa y una serie de filtros para observar moléculas fluorescentes, o filtros para destacar cambios de densidad en el tejido, etcétera. A las diferentes formas de utilizar los microscopios para la observación de características de los tejidos se les llama microscopía. Así podemos hablar de microscopía óptica de contraste de fase, de fluorescencia, electrónica, etcétera.

4 Microscopio óptico

El microscopio óptico es un elemento esencial para los estudios generales de histología puesto que es el que nos permite observar las diferentes características morfológicas de las células y los tejidos. Se basa en el uso de lentes para aumentar los rayos de luz que atraviesan una muestra de tejido. Su invención se remonta al siglo XVII. Desde entonces se ha ido perfeccionando hasta llegar a los modernos microscopios. Durante estos siglos, el mayor avance en cuanto a perfección y calidad se ha producido en su principal elemento, las lentes, las cuales aumentan la imagen de las secciones de tejido y permiten hacer visibles al ojo humano detalles nítidos que de otra manera sería imposible observar.

Los microscopios ópticos tienen un límite máximo de resolución de 0,2 μm. El poder de resolución es la distancia mínima a la que se pueden discriminar dos puntos. Este límite viene determinado por la longitud de onda de la fuente de iluminación, en este caso la luz visible.

Contiene normalmente dos sistemas de lentes: el objetivo y el ocular. El objetivo recoge la luz que atraviesa la sección de tejido, mientras que el ocular es el que proyecta la imagen sobre la retina. El aumento total que permite un microscopio óptico se calcula multiplicando la magnificación que produce el objetivo por la que produce el ocular. Por ejemplo, si estamos usando un objetivo de 40x (aumenta 40 veces) y un ocular de 10x (aumenta 10 veces), el resultado final sera de 400x, es decir, vemos la muestra aumentada 400 veces. Usando microscopios ópticos avanzados se consiguen unos 1000-1500 aumentos (objetivo de 100x junto con oculares de 10x o 15x). Algunos microscopios ópticos tienen lentes internas que producen aumentos adicionales que tendremos que tener en cuenta para calcular la magnificación de la imagen que se observa. No debemos confundir los aumentos con el poder de resolución. Por más que consigamos aumentar una imagen tomada de un microscopio, incluso con metodología digital, no se puede aumentar la resolución de la imagen.

PARTES del MICROSCOPIO

Un microscopio óptico básico está formado por las siguientes partes:

Oculares. Son las lentes que forman la imagen que observaremos con nuestros ojos. Todos los microscopios actuales poseen dos oculares, uno para cada ojo. Por eso a los microscopios actuales se les llama binoculares. Los primeros microscopios eran monoculares, es decir, poseían un solo ocular. Hay que tener en cuenta que en los microscopios más avanzados tanto el objetivo como el ocular suelen estar compuestos por varias lentes. Al menos uno de los oculares puede regularse para alejar o acercar la lente al objetivo, permitiendo ajustar el enfoque a las condiciones de visión, dioptrías, de cada observador.

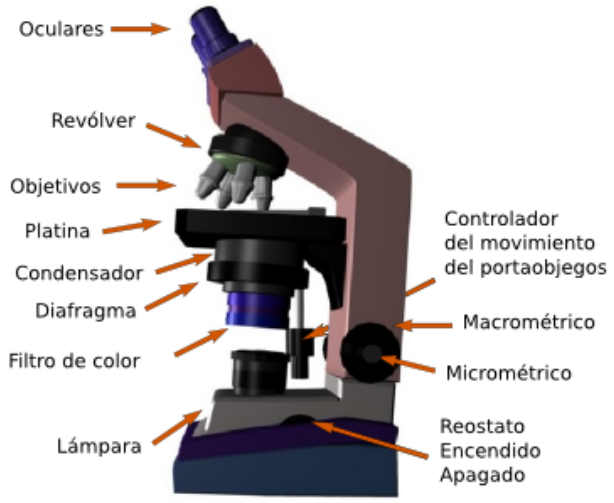


Figura 2. Partes de un microscopio simple.

Objetivos. Los objetivos son las lentes que reciben la lux directamente tras atravesar la sección histológica y quizá sean los elementos más importantes del microscopio. Hoy en día los microscopios ópticos poseen un tambor o revólver donde se encuentran varios objetivos. Cada uno de ellos posee lentes que permiten diferentes aumentos. Las magnificaciones de los objetivos más usados suelen ser de 4x, 10x, 20x, 40x y 100x. Rotando el revólver se puede seleccionar el objetivo y por tanto el aumento al que queremos observar la preparación. Aparte de los aumentos, los objetivos tienen una serie de características para mejorar la imagen. Así, pueden ser acromáticos, de fluorita o apocromáticos, los cuales corrigen alteraciones cromáticas, de campo plano que eliminan la curvatura

del campo de observación, de contraste de interferencia, etcétera.

Cuando se usan objetivos de 100 aumentos (100x) es necesario emplear un líquido denominado aceite de inmersión , que se añade entre el objetivo y la muestra. Esto es debido a que la refracción de la luz es alta en el aire y provoca alteraciones en la imagen que se manifiestan cuando se usan objetivos con esta capacidad de aumento. El aceite de inmersión reduce enormente esta refracción permitiendo imágenes mucho más nítidas.

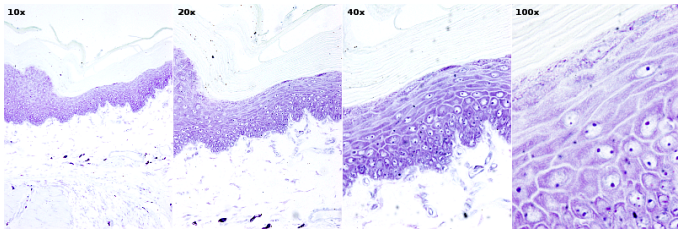


Figura 3. Imágenes resultantes del uso de objetivos con diferentes aumentos (especificados en las imágenes) al observar un epitelio estratificado plano queratinizado.

Platina. Es la plataforma donde se coloca el portaobjetos con nuestro tejido. Posee un dispositivo para sujetar el portaobjetos, el cual se puede desplazar en el plano de la platina, movimiento controlado manualmente.

Condensador. Es un dispositivo con una lente que concentra y focaliza la luz proveniente de la fuente sobre la sección de tejido.

Diafragma. Se sitúa entre la fuente luminosa y el condensador. Permite aumentar el contraste de la muestra y la profundidad de campo, es decir, el espesor de la muestra que está enfocado.

Lámpara luminosa. Es la que proporciona la luz que atraviesa la sección de tejido. Inicialmente se usaba la luz natural, la cual se podía concentrar en la sección de tejido mediante espejos cóncavos. Actualmente se usa una lámpara cuyo haz de luz atraviesa el diafragma, el condensador, la muestra, y tras ello penetra por el objetivo y atraviesa los oculares hasta nuestros ojos. La intensidad de la fuente luminosa se puede regular mediante un reostato.

Macrométrico y micrométrico. El enfoque de la muestra se consigue variando la distancia de la muestra a la lente del objetivo. Esta distancia depende de los aumentos que produzca el objetivo, mayor distancia cuanto menores aumentos, y del tipo de objetivo. La distancia se controla mediante dos ruedas denominadas macrométrico y micrométrico, respectivamente. La primera permite movimientos ascendentes y descendentes amplios de la platina y la segunda ajustes finos.

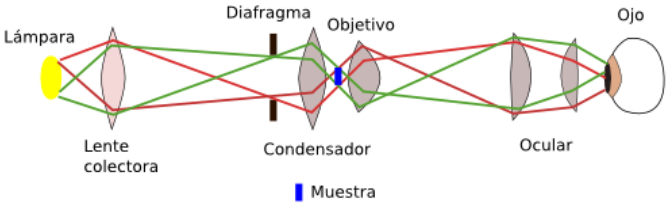


Figura 4. Recorrido de la luz desde la fuente, pasando a través de los diferentes lentes de un microscopio básico, hasta el observador.

MODIFICACIONES

Contraste de fase. Esta modificación del microscopio de campo claro necesita de objetivos especiales y se basa en el ligero retraso que sufre la luz cuando pasa por las estructuras tisulares en función de su densidad. De esta manera se consiguen diferentes luminosidades para distintas estructuras tisulares. Se emplea para ver muestras sin teñir o acuosas, así como células vivas, por ejemplo en cultivos celulares.

Campo oscuro. La observación en campo oscuro es un buen sustituto del contraste de fase para observar especímenes sin teñir o medios acuosos. Consiste en la incorporación de un objeto opaco bajo el condensador, entre la fuente luminosa y la sección de tejido. Este objeto sólo deja pasar la luz más lateral que incidirá sobre la muestra de forma oblicua y sólo aquella luz que sea reflejada por la muestra llegará a los objetivos. Allí donde no haya tejido aparecerá obscuro y distintas densidades o propiedades del tejido reflejarán diferente cantidad de luz.

Contraste de interferencia y Nomarski. Este tipo de microscopía aparece sólo en los microscopios más avanzados y supone tener objetivos especiales. Estos métodos dan a los tejidos un aspecto tridimensional, es decir, aumentan la profundidad de campo (espe-

sor de tejido que está simultáneamente enfocado, es decir, que se ve nítidamente). Se basa en el uso de filtros que polarizan la luz, lo cual consiste en dejar pasar sólo a la ondas electromagnéticas que vibran en un determinado plano. Posteriormente pasan por un prisma que reagrupa esta luz en elementos separados por una distancia que es similar al poder de resolución del objetivo que se está usando. Existe un prisma para cada objetivo. Entonces la luz pasa por el muestra y las diferencias de densidad del tejido, como los bordes de las células o densidades del interior celular o matriz extracelular, provocarán alteraciones en la luz que se dirige hacia los objetivos, los cuales transformarán esas diferencias en cambios en la luminosidad. Todavía existe una lente adicional entre el objetivo y los oculares que permiten modular la luminosidad aún más.

FLUORESCENCIA

El microscopio de fluorescencia se usa para observar sustancias fluorescentes denominadas fluoróforos. Una molécula fluorescente es aquella que es capaz de captar radiación electromagnética con una longitud de onda determinada y emitir otra radiación electromagnética con otra longitud de onda diferente, normalmente dentro del espectro de la luz visible. Los fluoróforos se utilizan como marcadores para la detección de otras moléculas tisulares, normalmente mediante la técnica de inmunofluorescencia. Los usados en microscopía absorben en el rango de la luz ultravioleta, normalmente producida por una lámpara de mercurio, y emiten en el rango de la luz visible. Para seleccionar el rango de longitud de onda con que serán iluminados se utilizan filtros específicos localizados entre la fuente y la muestra que sólo dejan pasar un determinado rango de frecuencias. Con un tambor de filtros se consigue iluminar la muestra con diferentes rangos de ondas electromagnéticas y por tanto activar selectivamente a diferentes fluoróforos.

La microscopía de fluorescencia nos permite usar más de un fluoróforo para detectar varias moléculas tisulares de forma simultánea siempre que los espectros de absorción y emisión de estos fluoróforos no se solapen, puesto que entonces sería imposible discriminarlos.

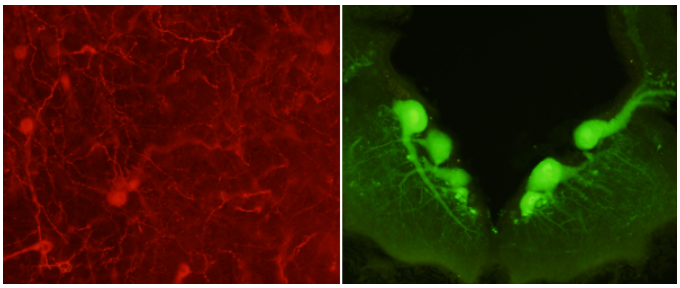


Figura 5. Imágenes de fluorescencia. A la izquierda, inmunocitoquímica para el neuropétido Y en cerebro de rata, utilizando el fluoróforo Texas-Red. A la derecha, motoneuronas en el encéfalo de lamprea marcadas con el trazador neuronal fluoresceína que es en sí mismo un fluoróforo. Cada uno de los fluoróforos se ha estimulado con frecuencias diferentes y lo que se observa es la emisión en el espectro de la luz visible de cada uno de ellos, rojo y verde, respectivamente.

Una aplicación más avanzada de la fluorescencia se da en los microscopios confocales, los cuales permiten eliminar la luz difusa procedente de fluoróforos que están en el tejido fuera del plano de enfoque. Esta luz difusa, que aparece en los microscopios de fluorescencia convencionales, provoca una difuminación y pérdida de nitidez de la imagen. Por tanto, con el microscopio confocal se consiguen imágenes mucho más nítidas y mediante la digitalización y solapamiento de planos de foco sucesivos se pueden conseguir imágenes tridimensionales.

5 Microscopio electrónico

Cuando se quieren observar estructuras celulares que están por debajo del límite de resolución del microscopio óptico, como algunos orgánulos, membranas, estructuras citosólicas, complejos moleculares de la matriz extracelular o virus, se recurre al microscopio electrónico. Se inventó en la primera mitad del siglo XX y su aplicación a la histología desveló las estructuras celulares más pequeñas denominadas en su conjunto ultraestructura celular. Por tanto, observar ultraestructuralmente a la célula significa observarla con el microscopio electrónico. Este tipo de microscopio tiene un límite de resolución más pequeño que 1 nanómetro gracias a que no usa la radiación electromagnética de la luz visible sino la alta frecuencia de un haz de electrones que incide sobre la muestra, y permite aumentos de varios millones de veces.

El microscopio electrónico no usa lentes sino imanes que concentran los haces de electrones emitidos por un filamento. Normalmente son aparatos grandes puesto que el viaje de los electrones tiene que ocurrir en vacío. Por eso, son grandes tubos dentro de los cuales se crea y manipula el haz de electrones.

En histología se usan dos tipos de microscopios electrónicos: de transmisión y de barrido.

Microscopio electrónico de transmisión

En este tipo de microscopio electrónico se produce el haz de electrones en un filamento de tungsteno que funciona como cátodo. Los electrones se condensan mediante electroimanes y se focalizan sobre una sección de tejido. Las secciones de tejido deben ser muy finas, se denominan ultrafinas (de unas decenas de nanómetros), para permitir que sean atravesadas por los electrones y para conseguir imágenes nítidas. Previamente las secciones deben ser tratadas con metales pesados como el osmio, el plomo y el uranilo. La función de estos metales es similar a las tinciones usadas en el microscopio óptico, dar color a las estructuras celulares, pero sólo en tonalidades de grises. Estos metales se concentran fundamentalmente en membranas y en los complejos macromoleculares. Los electrones que chocan con estos metales rebotarán y no cruzarán el tejido. Aquellos que consigan atravesar el tejido chocarán contra una pantalla fluorescente que emitirá un destello luminoso tras cada choque. Esa imagen emitida por la pantalla fluorescente es la que podemos observar nosotros. Por ello las imágenes observadas con el microscopio electrónico son siempre en blanco y negro, aunque posteriormente se pueden colorear con un ordenador.

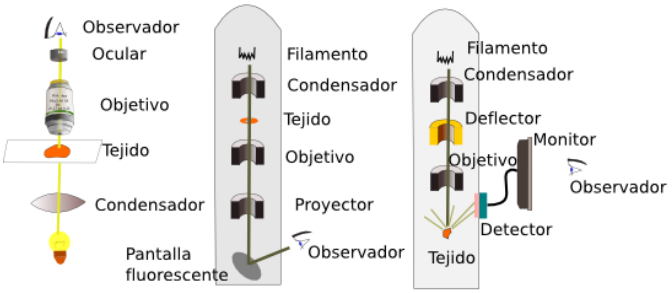


Figura 6. Comparativa de la composición básica de un microscopio óptico (izquierda), electrónico de transmisión (centro) y electrónico de barrido (derecha).

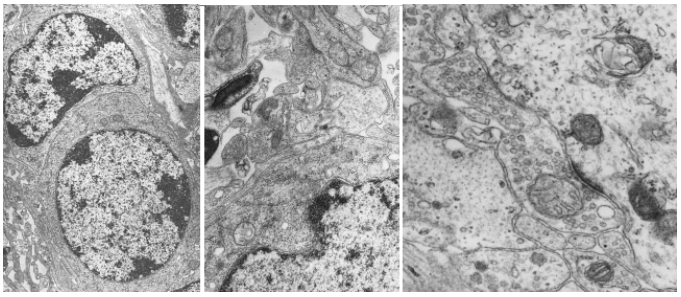


Figura 7. Imágenes tomadas en con microscopio electrónico de transmisión. Se puede ver la capacidad de estos microscopios observando el incremento de resolución de las imágenes de izquierda a derecha. Las líneas negras de la imagen de la derecha corresponden a las membranas celulares

Microscopio electrónico de barrido

Los microscopios electrónicos de barrido sirven para observar superficies tisulares. Ello es posible porque los electrones no atraviesan la muestra sino que interaccionan con su superficie y rebotan. Para que esto ocurra hay que cubrir a la muestra con una máscara de metales que se adapta perfectamente al relieve de la muestra. La muestra se barre con el haz de electrones y los electrones reflejados por un punto de la superficie son captados por una pantalla receptora que creará una imagen en una pantalla digital. La ima-

gen completa se formará cuando el haz recorra toda la superficie de la muestra y se consiga información de cada uno de los puntos. Es decir, se escanea la muestra, y de ahí el nombre de microscopio de barrido, o en inglés "scannig".

Por supuesto, las muestras que se observan no son secciones, sino porciones de órganos con superficies de interés. Se pueden observar superficies de secciones hechas con un vibratomo o con un microtomo de congelación, pero no aquellas que han sido incluidas en resina o parafina.

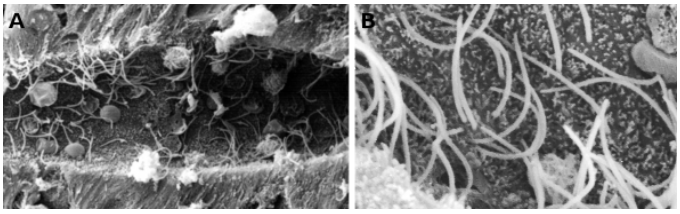


Figura 8. Imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de barrido. Muestran el interior del canal central de una médula espinal de lamprea. Se pueden observar numerosos cilios (con más detalle en B) y pequeñas microvellosidades en los dominios apicales de las células que forman las paredes de dicho canal. (Ver imagen de barrido de estomas de una hoja).