CAPÍTULO 3
Introducción a las técnicas histológicas básicas

Mirta Alicia Flamini y Claudio G. Barbeito

Introducción

La mayoría de las células animales tienen un tamaño muy pequeño, de solamente pocos micrómetros (µm), por lo que es imposible observarlas a simple vista. El **poder resolutivo** del ojo humano es de 0,1-0,2 mm (100-200 µm); por lo tanto; cualquier objeto menor de a 0,1 mm (100 µm) no puede distinguirse de las estructuras que lo rodean. Aunque existen algunas excepciones, como el ovocito de las aves (la yema del huevo) que mide varios centímetros, las células animales tienen un tamaño menor al poder resolutivo del ojo humano y solo pueden ser observadas con ayuda de un instrumento especial: el microscopio.

Este instrumento permitió grandes avances en la ciencia y en especial en las ciencias biológicas. Si bien es difícil de precisar quién fue la persona que inventó el **microscopio óptico**, se atribuye a los hermanos Jansen a fines del siglo XVI la creación del microscopio compuesto, formado por dos lentes. Sin embargo, fue en el siglo siguiente cuando su uso se extendió y permitió a Robert Hooke realizar su primera observación de células vegetales en muestras de corcho. Por la misma época, Anton van Leeuwenhoek, utilizando microscopios de una sola lente, descubrió bacterias, protozoos, eritrocitos, espermatozoides, entre otras células. Estas observaciones se realizaban en células libres y en muchos casos vivas, lo que le posibilitó ver, por ejemplo, movimientos celulares.

Sin embargo, durante casi trescientos años fue muy difícil la visualización microscópica de los tejidos animales, porque sus distintos componentes tienen índices de refracción similares y los microscopios no permitían su discriminación. Durante el siglo XIX se desarrollaron técnicas de conservación, procesamiento, corte y coloración de las muestras obtenidas de animales que facilitaron el reconocimiento de las estructuras presentes en los tejidos. Estas técnicas permitieron la obtención de láminas delgadas coloreadas, en las que se pudieron diferenciar y distinguir distintos componentes tisulares. En ese siglo el microscopio óptico también tuvo grandes mejoras; una muy importante fue que se lograron corregir muchas aberraciones de las lentes. Además, el enunciado de la teoría celular por Schleiden y Schwann (capítulo 1) generó las bases teóricas para la interpretación de estas muestras y rever el concepto de tejido. Esta combinación de avances tecnológicos y teóricos permitió al surgimiento de la Histología moderna.

En el siglo XX se inventaron microscopios de distintos tipos, en muchos casos fueron modificaciones del microscopio óptico convencional, como los microscopios de luz ultravioleta, de fluorescencia, de fondo oscuro, de luz polarizada y confocal láser. En cambio, en el caso de los **microscopios electrónicos** la tecnología utilizada fue muy distinta, ya que la luz fue reemplazada por haces de electrones.

Al avance de la histología contribuyeron otras técnicas como el cultivo celular y diversas técnicas de biología celular y molecular, cuya descripción sobrepasa a los objetivos de este libro.

Tipos de microscopio

Microscopio óptico

El microscopio óptico tradicional utiliza la luz del espectro visible que atraviesa la muestra y luego un sistema de lentes que aumentan el tamaño de lo observado, de esta manera se logra generar una imagen amplificada del material original. Este instrumento consta un **sistema óptico** y una **parte mecánica** (**Fig. 1**).

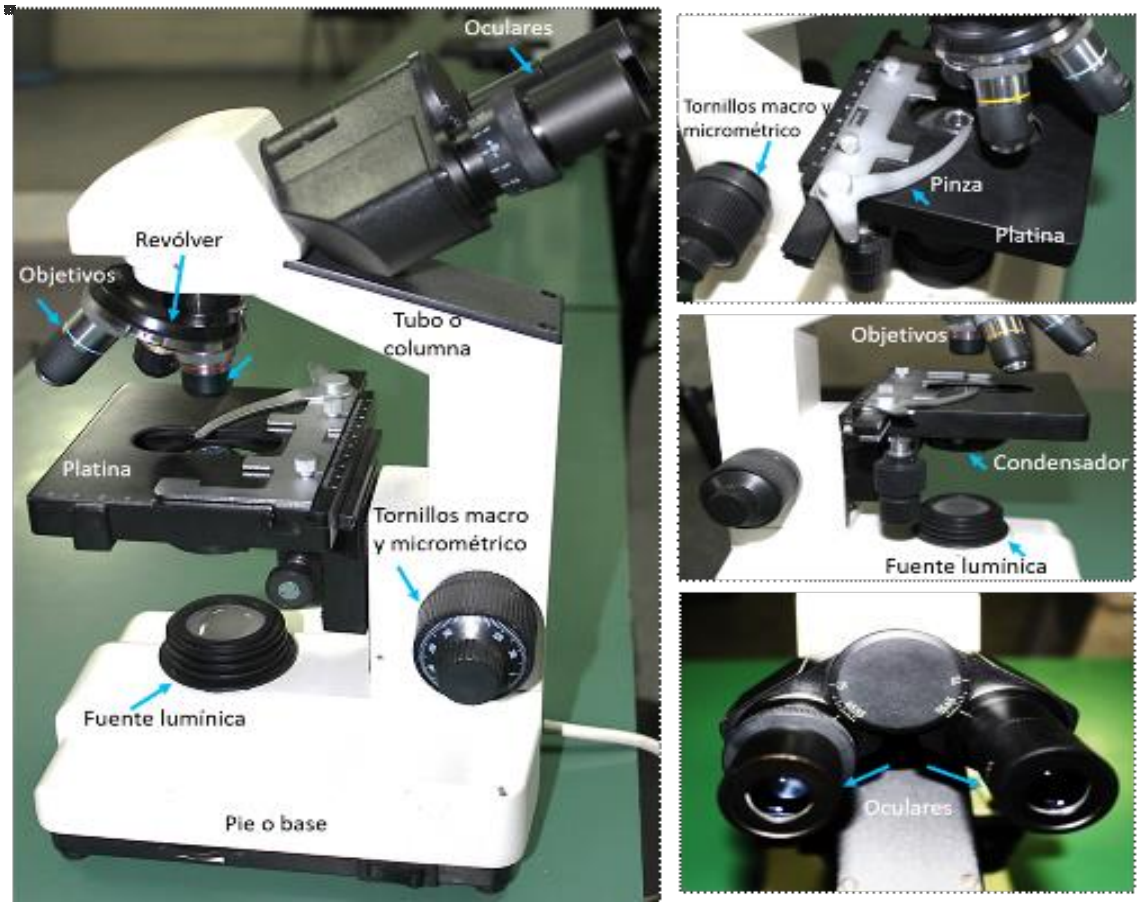

Figura 1. *Fotografía. Microscopio óptico. Partes que lo componen. Dra. Mirta Alicia Flamini (MAF).*

El **sistema óptico** incluye todos los elementos necesarios para recibir la luz y desviarla en las direcciones necesarias para generar una imagen aumentada de la muestra. La **fuente de luz** puede ser externa (luz solar o lámpara) o estar incorporada al propio microscopio. El **condensador** recibe la luz que proviene de la fuente y la transforma en un haz que ilumina puntualmente al objeto enfocado. El diafragma es una pieza que, si bien no es parte del sistema óptico, regula la cantidad de luz que incide sobre la muestra. Los **objetivos** son las lentes que están cerca del objeto a estudiar. En general, los microscopios tienen varios objetivos de diferentes aumentos que se reconocen por la inscripción 4X, 10X, 40X o 100X. La imagen aumentada por el objetivo llega al sistema de lentes denominado **ocular** donde se magnifica aún más. La imagen desde el ocular es captada por quien observa. Los microscopios pueden tener uno, dos o tres oculares y, por lo tanto, serán denominados monoculares, binoculares o trinoculares, respectivamente. Actualmente, en algunos microscopios, la imagen en vez de generarse en el ojo se transmite a una cámara y de allí se muestra en monitores, computadoras, proyectores u otros sistemas.

La **parte mecánica** está formada por: el **pie o base** que sostiene al microscopio, la **platina,** movida por un sistema de tornillos, donde se coloca el portaobjetos sostenido por una **pinza**, el **revólver** que permite cambiar la lente objetivo que se utilizará, el **tubo** que sostiene a los sistemas objetivo y ocular, y los **tornillos macro y micrométricos** que posibilitan un enfoque correcto.

El aumento real que se obtiene en un microscopio óptico surge de multiplicar la magnificación del objetivo por la del ocular. Por ejemplo, si el objetivo es de 4 aumentos (4X) y el ocular de 10 aumentos (10X) el tamaño del objeto que se observa se amplificará 40 veces. Los microscopios ópticos de mejor calidad solo logran aumentar unas 1200 veces el tamaño de un objeto, en este último caso se requieren objetivos de 100X, llamados objetivos de inmersión y oculares de 12X. Para el uso de estos objetivos de inmersión es necesario colocar sobre el portaobjetos sustancias como el aceite de cedro que impiden la difracción y pérdida de rayos de luz antes de llegar al objetivo. Recientemente se han diseñado objetivos que permiten llegar a esos aumentos sin necesitar del uso de aceite de cedro.

La limitación en la capacidad de aumentar el tamaño de los objetos es consecuencia del poder resolutivo, que en los microscopios ópticos es de 0,2 µm como máximo.

Existen variantes del microscopio óptico. Entre ellas se encuentran el **microscopio de fluorescencia**, basado en la propiedad que poseen ciertas sustancias químicas denominadas fluorocromos de absorber una luz de una longitud de onda determinada y emitir otra luz de mayor longitud de onda **(Fig. 2)**. En las últimas décadas se diseñó una variante del microscopio de fluorescencia, el **microscopio de barrido confocal láser***,* que permite generar reconstrucciones tridimensionales de las preparaciones histológicas. Otra variante del microscopio óptico es el **microscopio de luz polarizada** que se basa en la propiedad que poseen algunos tejidos de desviar la luz. Su empleo ha sido muy útil para determinar, entre otros aspectos de la morfología tisular, la estructura de las fibras musculares.

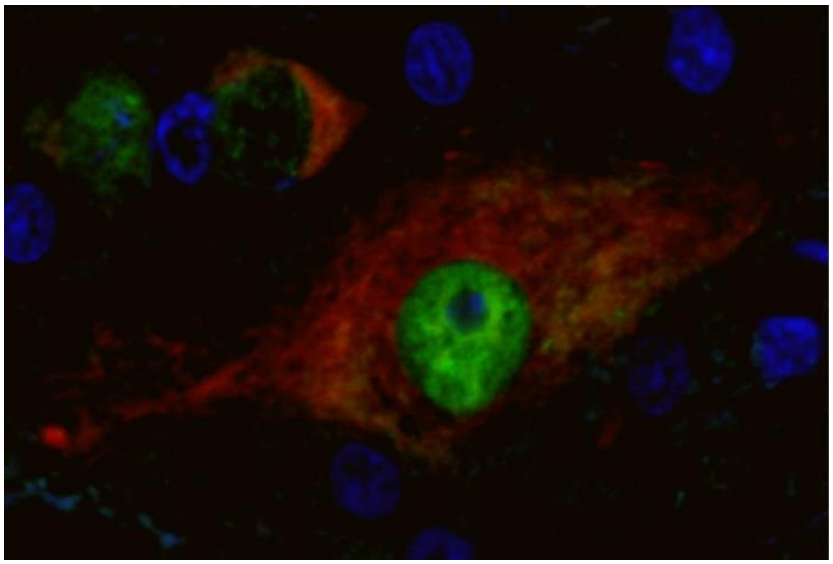

Figura 2. *Médula espinal. Microfotografía. Núcleo de neurona (verde), núcleos de otras células del tejido nervioso (azul), citoplasma de neurona (rojo). Microscopía de fluorescencia con distintos fluorocromos. 100X. Imagen gentileza del Dr. Enrique Portiansky.*

Microscopio electrónico

En el microscopio electrónico (**Fig. 3**) la muestra no es atravesada por la luz sino por un haz de electrones. Este microscopio consiste en tubo que posee un cátodo y un ánodo, y los electrones fluyen del primero hacia el segundo (**Fig. 4**). Las lentes son bobinas electromagnéticas y la imagen generada no puede ser observada directamente porque el ojo humano no distingue los electrones; por lo tanto, se requiere de la observación en una pantalla o un monitor. Luego se obtienen fotografías para ser estudiadas.

Figura 3. *Microscopio electrónico de transmisión (Servicio de microscopía electrónica, FCV-UNLP). MAF y CB.*

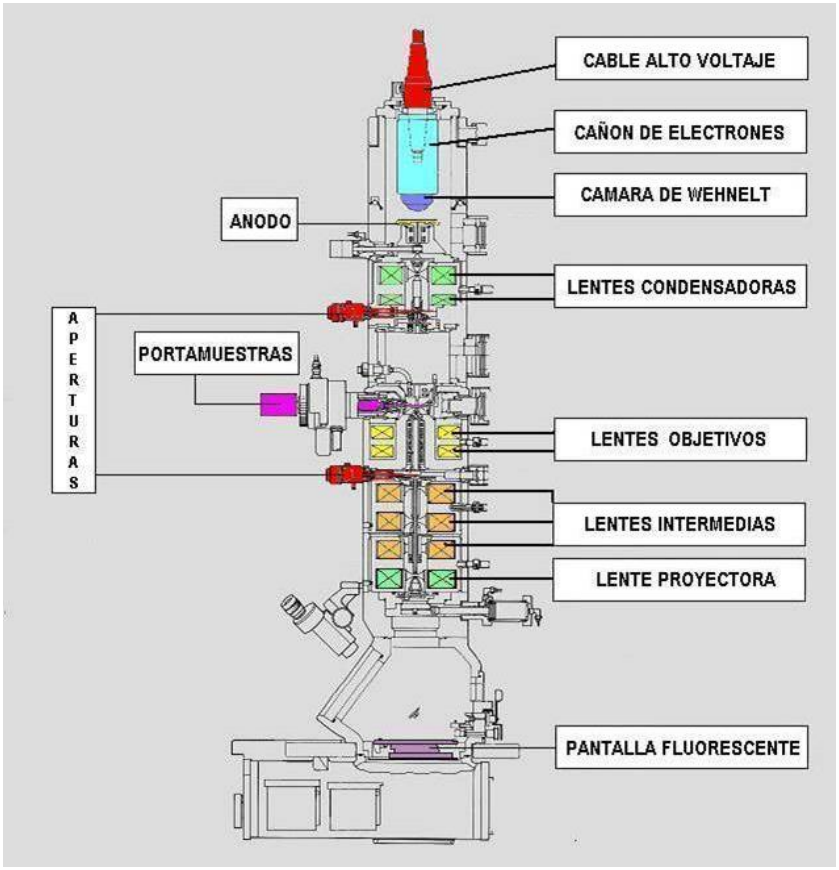

Figura 4. *Esquema. Partes del microscopio electrónico de transmisión JEOL 1200 EX II (Servicio de microscopía electrónica FCV-UNLP). La cámara de Whenelt es el cátodo en esta variante de microscopio electrónico. Autora: Med. Vet. Fernanda Faisal.*

Existen dos tipos de microscopio electrónico: el de transmisión y el de barrido. En el **microscopio electrónico de transmisión** el haz de electrones atraviesa la muestra. La resistencia al paso de los electrones determina que diferentes partes de la muestra se vean distintas. Esta resistencia es muy similar entre los diversos componentes de los tejidos, por lo que deben utilizarse átomos pesados o sustancias como el ácido ósmico para generar diferencias reconocibles. Si bien estos no son colorantes como los que se utilizan para microscopia óptica, cumplen una función similar. Los componentes de la muestra que no son atravesados por los electrones se dice que son **electrondensos** y se observan de un gris muy oscuro y los que son atravesados son **electronlúcidos** y se observan claros (**Fig. 5A**). El microscopio electrónico de transmisión alcanza un poder resolutivo de 2 nm que permite amplificaciones de hasta 500 000 veces. Esta mayor capacidad para aumentar posibilita observar con detalle aspectos subcelulares como las características de las organelas.

El **microscopio electrónico de barrido** se caracteriza porque el haz de electrones no atraviesa el objeto, sino que se desplaza sobre su superficie, de allí el nombre de barrido. Tiene menor poder resolutivo que el de transmisión; por lo tanto, no genera magnificaciones tan grandes como este pero, en cambio, permite observar con gran nitidez la superficie de los objetos y comprender la tridimensionalidad de la muestra (**Fig. 5B**).

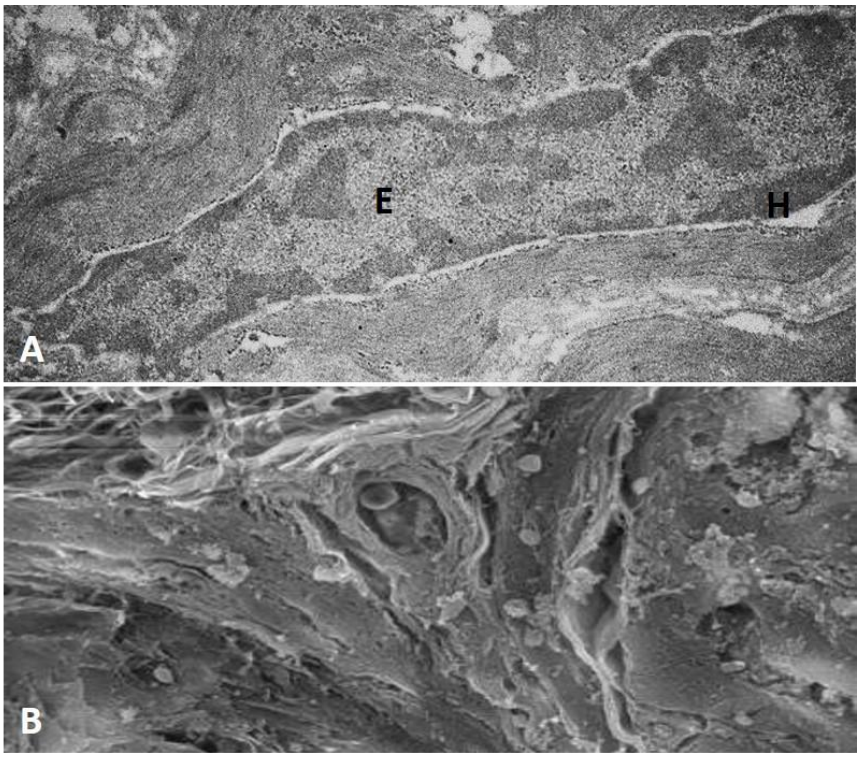

Figura 5. *Microfotografías. A. Núcleo de un fibroblasto. E: eucromatina electronlúcida; H: heterocromatina electrondensa. Microscopía electrónica de transmisión 10 000X. B. Tejido conectivo. Microscopia electrónica de barrido 600X.*

Pese a sus importantes aplicaciones, la utilización de la microscopía electrónica en las ciencias biológicas presenta dos desventajas: al utilizar vacío no permite observar muestras vivas y al no emplear luz genera imágenes solamente en escalas de grises que luego pueden ser coloreadas de forma digital.

Técnica histológica

Se denomina **técnica histológica** al conjunto de operaciones a que es sometido el material biológico (animal o vegetal) con la finalidad de conferirle las condiciones óptimas para poder ser examinado y analizado a través de la observación microscópica.

Los objetivos fundamentales de la técnica histológica son permitir que los tejidos que se observarán se mantengan con la mayor similitud posible a cómo eran cuando el organismo estaba vivo y posibilitar el suficiente contraste entre las diversas estructuras, de modo que puedan ser diferenciadas sin dificultad.

Para cumplir con el primer objetivo es fundamental evitar que ocurra la destrucción de los tejidos por los procesos de autolisis *posmortem,* provocados por efecto de enzimas lisosomales, y de putrefacción, que ocurre por la acción de bacterias que se encuentran en el propio organismo.

En este texto centraremos la atención en los pasos que se requieren para la obtención de preparaciones histológicas permanentes para microscopia óptica a partir de órganos de animales

(preparados histológicos). No es un objetivo profundizar en conocimientos técnicos, para ello al final del capítulo se consigna la bibliografía específica. En la **figura 6** se mencionan los pasos secuenciales de la técnica histológica de rutina.

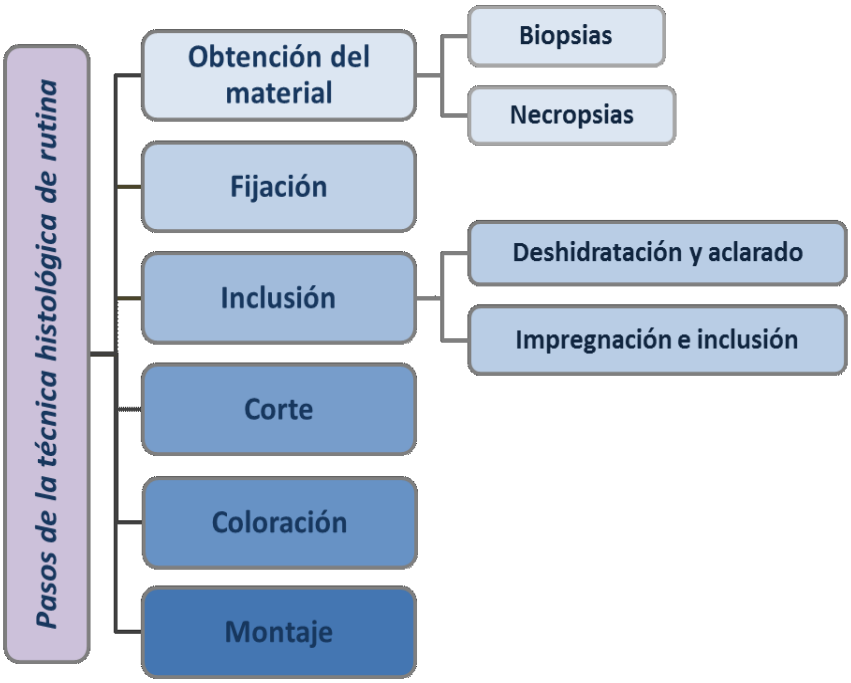

***Figura 6**. Esquema. Pasos secuenciales de la técnica histológica. Dra. Mirta Alicia Flamini (MAF).*

Pasos de la técnica histológica

Obtención del material

Las muestras obtenidas para preparaciones histológicas deben permitir la correcta representación de las características que poseía el órgano en el animal. La calidad final del preparado histológico que se va a observar luego en el microscopio depende de varios aspectos, uno de los más importantes es la rapidez y el cuidado para obtener una buena muestra.

Una recolección adecuada requiere, además de respetar las normas de seguridad e higiene del laboratorio, tener en cuenta las siguientes condiciones:

- **conocer la anatomía del animal** con la finalidad de realizar la operación lo más rápido posible y con la menor cantidad de errores;
- **extraer el material rápidamente**, cuando se tomen muestras de varios órganos, deben extraerse primero los que sufren primero la autolisis (ejemplo: cerebro) o son más sensibles a la putrefacción por su gran carga bacteriana (ejemplo: intestino);
- **utilizar instrumental adecuado**, tijeras correctamente afiladas, hojas de bisturí nuevas y pinzas que no lesionen el tejido;
- **realizar cuidadosamente el corte** sin presión ni aplastamiento. Todo daño que se le produzca al material se amplificará cientos de veces en la observación microscópica posterior;

- el **tamaño** de las **muestras** no debe superar 1 o 1,5 cm de espesor.

Las muestras de tejido pueden obtenerse por biopsia o por necropsia. La biopsia (del griego bios= vida y opsis= visión), consiste en tomar un fragmento de un órgano en el animal vivo. En la necropsia las muestras se obtienen de animales recientemente muertos.

Fijación

Después de la muerte, una vez que cesa la llegada de sangre y, como consecuencia, de oxígeno y nutrientes a los tejidos, las células se deterioran rápidamente por los procesos de putrefacción y autolisis mencionados anteriormente. Por lo tanto, deben detenerse estos procesos con la fijación. Un defecto generado en los tejidos por una mala fijación **no** puede ser reparado en los pasos posteriores, por lo tanto, lograr una fijación adecuada es una de las tareas más importantes durante la técnica histológica.

La fijación puede realizarse por métodos físicos o químicos. Dentro de los físicos, el más utilizado es la congelación, que permite la obtención rápida de preparaciones histológicas; sin embargo, este método altera más las características de los tejidos que la fijación química y generalmente no se utiliza para la preparación de muestras de conservación permanente. Además, el material fijado por este método requiere de instrumentos especiales para realizar los cortes.

Las sustancias utilizadas para la fijación química se denominan **fijadores.** No existe el fijador ideal, pero es conveniente que reúna la mayor cantidad de las siguientes propiedades:

- prevenir la autolisis y la putrefacción,
- preservar las estructuras con un **mínimo de distorsión**,
- **endurecer** los tejidos para facilitar su corte,
- actuar como **mordiente** (favorecer la coloración),
- **insolubilizar las biomoléculas** para evitar su pérdida**,**
- **tener bajo costo**, debido a que el fijador una vez utilizado debe descartarse.

Los fijadores pueden ser simples cuando están formados por una sola sustancia o compuestos o mezclas fijadoras cuando lo componen dos o más fijadores. Dentro de las mezclas fijadoras una de las más utilizadas es la solución de Bouin (ácido pícrico, formol y ácido acético), ideal para fijar órganos del sistema nervioso, embriones y gónadas. El fijador simple más utilizado es el **formol**, porque reúne varias de las propiedades antes mencionadas. Tiene bajo PM, lo que determina una buena penetración, es de bajo costo y endurece sin sobrefijar. El formol comercial es una solución acuosa de formaldehído al 40 %. Esta solución de formol se utiliza para fijar muestras biológicas, en una dilución al 10 %: una parte de la solución de formol y nueve partes de agua (1/10).

Además, para realizar una buena fijación el **volumen de fijador** debe ser de diez a veinte veces superior al de la muestra. Los recipientes que se utilizan deben tener una boca ancha para que la muestra ya fijada y endurecida pueda extraerse con facilidad. Además, deben poseer un

diámetro suficiente para que el fijador contacte con todas las caras de la muestra y estar correctamente rotulados. Para poder fijar varias muestras en un mismo frasco, se puede colocar cada una de ellas en una cápsula o casete rotulada (**Fig. 7**).

Es fundamental respetar el **tiempo de fijación** que requiere cada fijador, para evitar que el centro de la muestra se fije insuficientemente. En la fijación con formol, para una muestra de 1 cm de espesor es suficiente un periodo de 24 h.

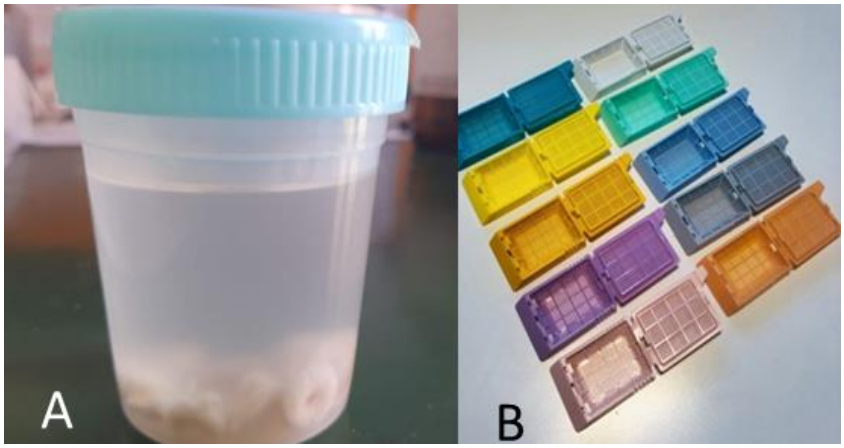

Figura 7. *A. Frasco de plástico con boca ancha. B Cápsulas o casetes para separar muestras para fijar. MAF y Luca Di Césare.*

Inclusión

El tejido una vez fijado aún carece de la suficiente dureza para ser cortado en láminas muy delgadas como se requiere para su observación microscópica. Los órganos huecos, como el intestino, o con muchas cavidades, como el pulmón, se deforman al cortarlos; las muestras pequeñas son difíciles de cortar si no poseen un sostén firme que las contenga. Para poder superar estos obstáculos, se realiza la inclusión; esta consiste en impregnar la muestra con sustancias que le otorguen la resistencia necesaria para que la navaja del micrótomo (instrumento que se utiliza para realizar los cortes) pueda cortarla sin dificultad.

Los medios para realizar la inclusión pueden ser acuosos, como la gelatina, o anhidros, como las parafinas; estas últimas son las más utilizadas. Las **parafinas** son derivados del petróleo compuestos, principalmente, por hidrocarburos saturados petróleo. A temperatura ambiente son sólidas, blancas y semitranslúcidas (**Fig. 8 A-B**). Las que se usan en histología tienen un punto de fusión de entre 55 ºC y 60 ºC. El procedimiento para incluir en parafina es sencillo y se requiere contar con una estufa que alcance la temperatura adecuada para fundirla (**Fig. 8C**).

Figura 8. *A. Parafina en panes. B. Parafina en perlas. C. Estufa para fundir la parafina, con dos recipientes con parafina sólida (izquierda) y semisólida (derecha). MAF.*

Como las parafinas no son hidrosolubles, las muestras deben deshidratarse antes de ser sumergidas en ellas. Por lo tanto, el proceso de inclusión se divide en dos etapas:

-deshidratación y **aclarado**. Para deshidratar se usa una serie de soluciones de **alcohol etílico de graduación creciente** (70°, 96° y 100°), mientras que para el aclarado se utilizan solventes orgánicos como el **xilol**. Este último es un líquido intermediario, miscible tanto con el alcohol como con la parafina (**Fig. 9**);

-impregnación e **inclusión propiamente dicha**. El proceso de **impregnación** se realiza en la estufa para mantener líquida la parafina en la que se sumerge la muestra deshidratada y aclarada. Se espera el tiempo suficiente para que la parafina penetre en todo el tejido reemplazando al xilol. Esta impregnación es lenta y requiere dos o tres cambios sucesivos de parafinas. La **inclusión propiamente dicha** se realiza fuera de la estufa. Consiste en formar un bloque de parafina que contenga la muestra en su interior. Para ello, se debe tener otra parafina líquida, nueva y libre de impurezas y un recipiente que será el "contenedor" (**Fig. 10**). La parafina líquida se vuelca en el contenedor y luego se introduce la muestra en ella. Se deja a temperatura ambiente y una vez solidificada se separa del contenedor. Se obtiene así un bloque de parafina con la muestra en su interior. Por último, ese bloque se adhiere a un soporte de madera o plástico se obtiene así el taco que, en el siguiente paso, se colocará en el micrótomo para realizar el corte.

Cuando se realiza la fijación por congelación, el mismo proceso también permite la inclusión.

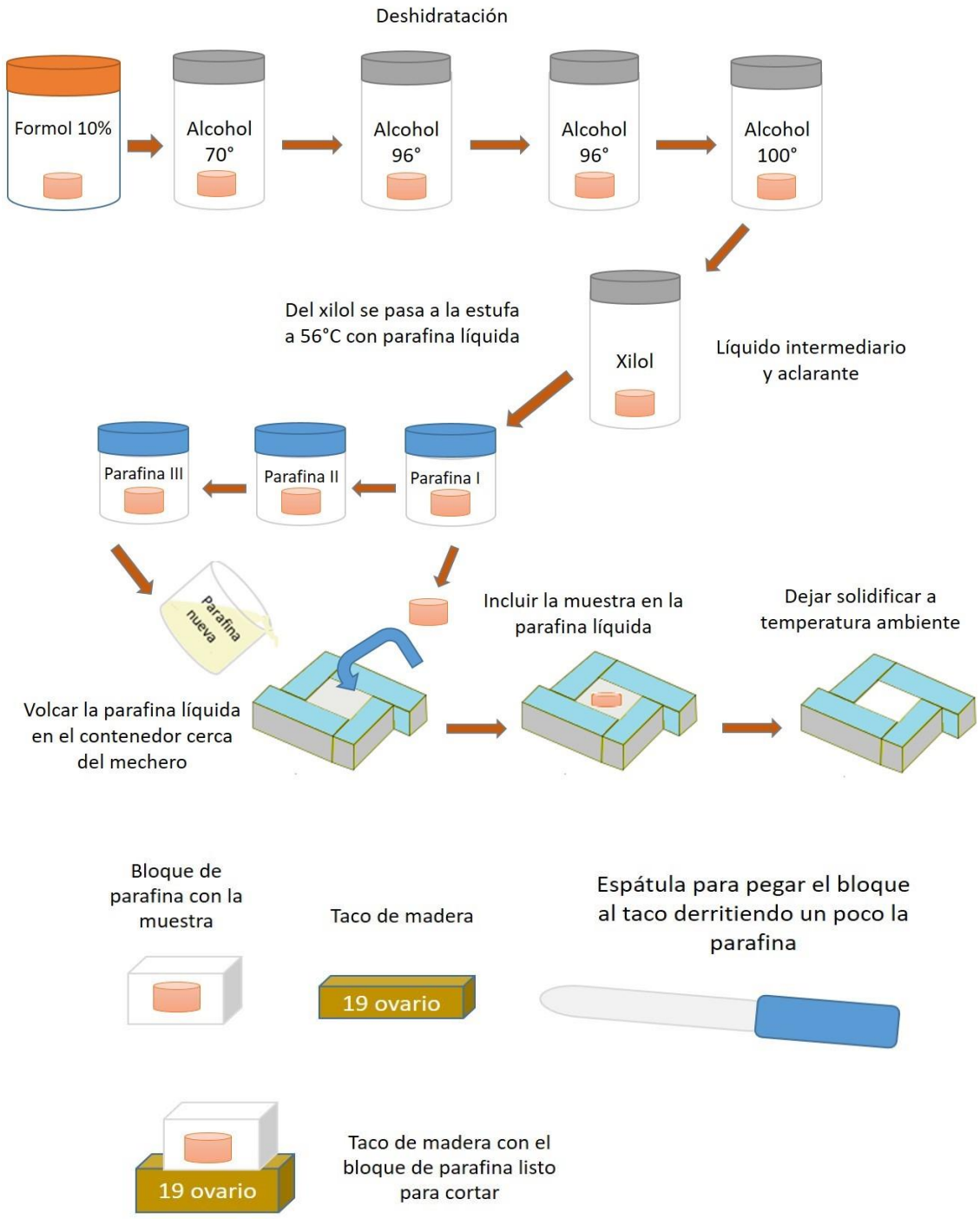

Figura 9. *Esquema. Etapas de la inclusión con parafina. MAF (ver ref.).*

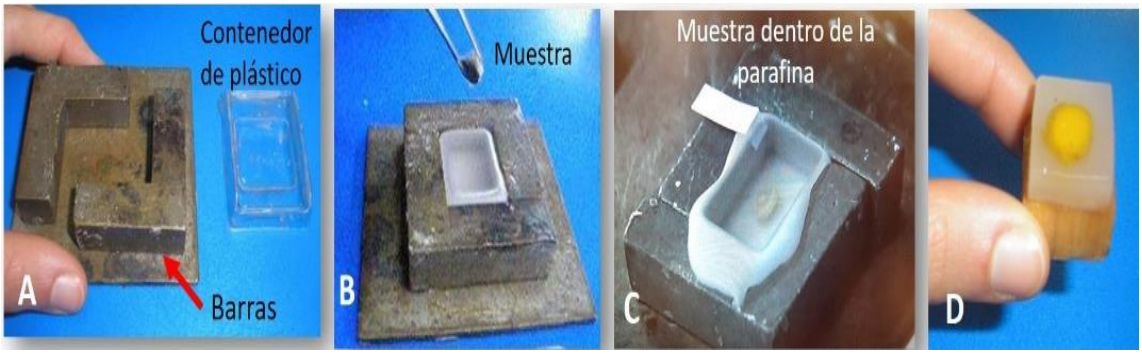

***Figura 10**. A. Contenedor. B y C. Contenedor con parafina. D. Taco final. MAF.*

Corte

Para cortar en láminas muy delgadas, de 3 a 20 µm de espesor, es necesario utilizar un equipo especial llamado **micrótomo** (del griego, *micro*: pequeño; *tomos*: corte). El micrótomo posee un sistema de soporte del taco, una navaja o cuchilla muy afilada y un sistema de regulación del espesor del corte (**Fig. 11**). Una vez obtenidas las láminas, se colocan sobre un **portaobjetos** y quedan listas para ser coloreados.

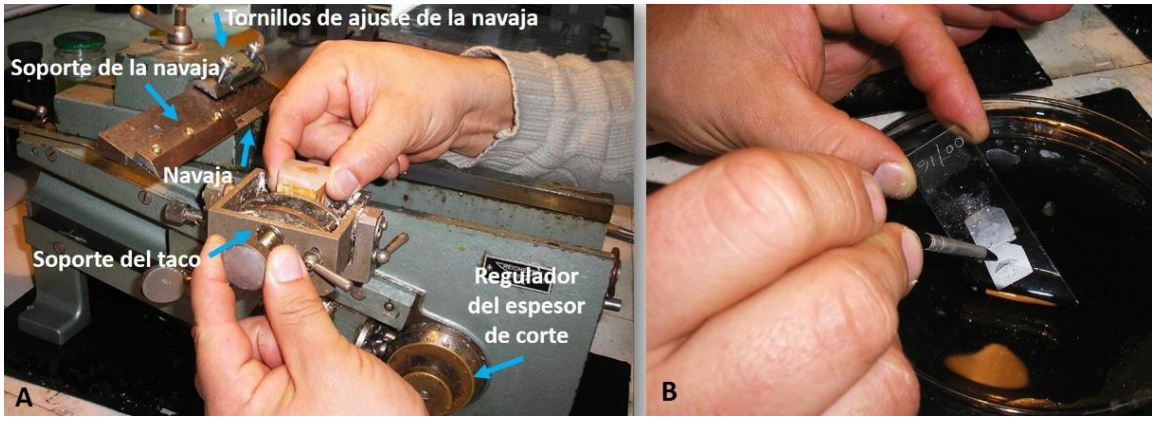

***Figura 11.** A. Partes del microtomo de deslizamiento. B. Recolección del corte sobre el portaobjetos. MAF.*

Existen diferentes tipos de micrótomos que se diferencian por el mecanismo de corte. Cualquiera sea el que se utilice, lo que se logra mediante el corte son láminas delgadas. Una variedad de ellos es el criostato que permite realizar cortes de muestras incluidas por congelación (**Fig. 12**).

***Figura 12.** Tipos de micrótomos. A. Deslizamiento. B. Minot. C. Criostato. MAF.*

Coloración

Los distintos componentes de los tejidos tienen propiedades ópticas muy semejantes, por lo tanto, para su mejor diferenciación, deben aplicarse colorantes que generen contrastes.

La **coloración** es una reacción química en la que el colorante se combina con el componente celular y le otorga color. Los colorantes se pueden clasificar de diversas maneras. Las clasificaciones más utilizadas son de acuerdo con su procedencia (naturales o sintéticos) y con el pH (ácidos, básicos o neutros).

Montaje final

Este paso permite conservar las preparaciones histológicas por mucho tiempo. Para ello se necesitan un cubreobjetos, que es un vidrio mucho más delgado que el portaobjetos sobre el que se encuentra el corte, y el bálsamo de Canadá que actúa como sustancia de adhesión (**Fig. 11B**). Se coloca una gota de bálsamo sobre el cubreobjetos, se apoya este último sobre el corte coloreado, se ejerce una leve presión y se seca en estufa (**Fig. 13**).

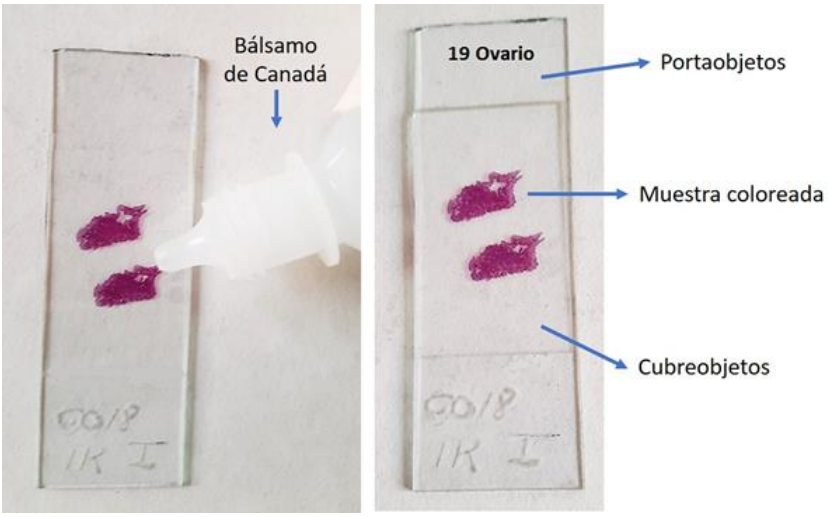

Figura 13. *Montaje final. A. Colocación del bálsamo de Canadá y el cubreobjetos B. Preparado montado para ser observado. MAF.*

Técnica de hematoxilina-eosina

La coloración más frecuente en histología consiste en la combinación del uso de dos colorantes: la hematoxilina (básica) y un miembro del grupo de las eosinas (ácida). La **hematoxilina** se obtiene a partir de una planta, el palo de Campeche (*Haematoxylum campechianum*). Este colorante les otorga color azul violáceo a los componentes celulares con los que se une. Las **eosinas** son colorantes sintéticos que al unirse a los componentes tisulares por los que tiene afinidad, les otorgan un color rosado de diferente intensidad. A esta técnica se la conoce como técnica de la hematoxilina-eosina (HE).

Los componentes ácidos de los tejidos son **basófilos** (de origen griego, *filo*: amar) porque tienen afinidad por los colorantes básicos. El núcleo celular, por contener grandes cantidades de ácidos nucleicos, es basófilo y se observa de color azul violáceo por unirse a la hematoxilina. En cambio, las fibras de colágeno y las zonas del citoplasma celular ricas en mitocondrias poseen abundantes proteínas básicas, son **acidófilas** y se colorean de rosado con la eosina (**Fig. 14**).

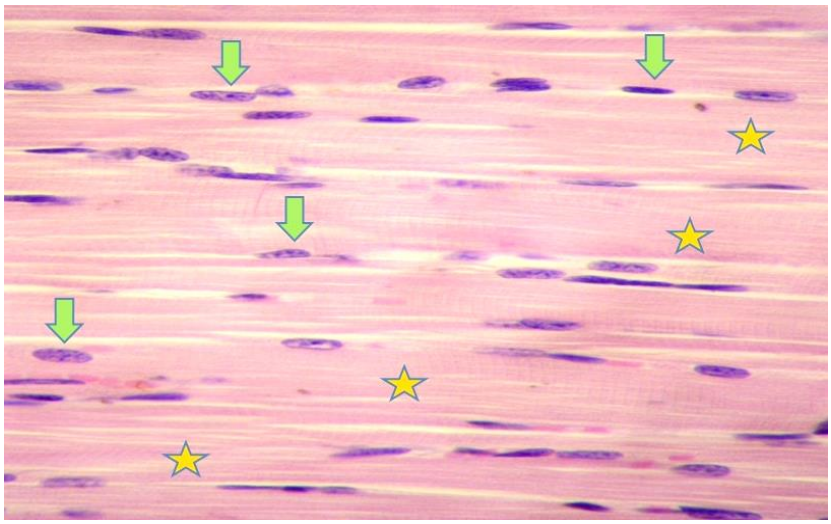

Figura 14. *Microfotografía. Técnica de hematoxilina-eosina en un corte de tejido muscular liso. Flechas: núcleos coloreados con hematoxilina; estrellas: citoplasma de las células musculares coloreado con eosina. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP. 40X.*

Los cortes obtenidos con el micrótomo contienen parafina, que no es miscible con el agua; este es un inconveniente importante para utilizar colorantes en solución acuosa como la hematoxilina y la eosina. Por ello, previamente a la coloración, se debe extraer la parafina del corte e hidratarlo utilizando xilol y una batería de soluciones de alcohol etílico de concentraciones decrecientes (100°, 96°, 70°) respectivamente. Luego se colorea primero con hematoxilina y a continuación con eosina. Posteriormente debe deshidratarse nuevamente el corte mediante una batería de alcoholes de concentración creciente y, finalmente, xilol. En la **figura 15** se ilustran los pasos consecutivos de la técnica.

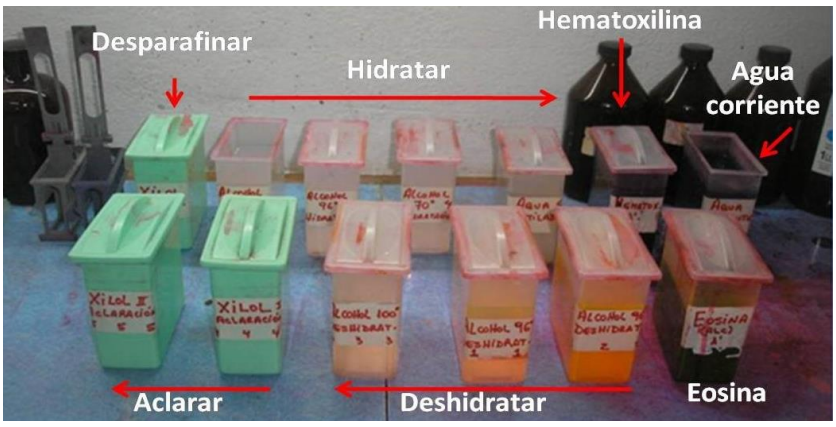

Figura 15. *Fotografía. Batería de coloración con hematoxilina y eosina. MAF.*

Coloraciones tricrómicas

Se agrupan con este nombre a un conjunto de técnicas que utilizan distintos colorantes con el fin de otorgarle colores diferentes a algunos componentes de los órganos que no pueden ser diferenciados entre sí con la técnica de HE. Inicialmente se elaboraron para discernir mejor el tejido muscular de las fibras colágenas del tejido conectivo, ya que con la eosina ambos son acidófilos. Las más usadas son las técnicas de Masson y de Mallory. Ambas utilizan hematoxilina como colorante nuclear y fucsina ácida para destacar el tejido muscular, los eritrocitos y el tejido epitelial. Solo varían en el colorante para identificar las fibras colágenas, que en la técnica de Masson es el verde luz, por lo que las fibras colágenas se observarán verde brillante, mientras que para la de Mallory se aplica el azul de anilina, que les otorga color azul (**Fig.16**).

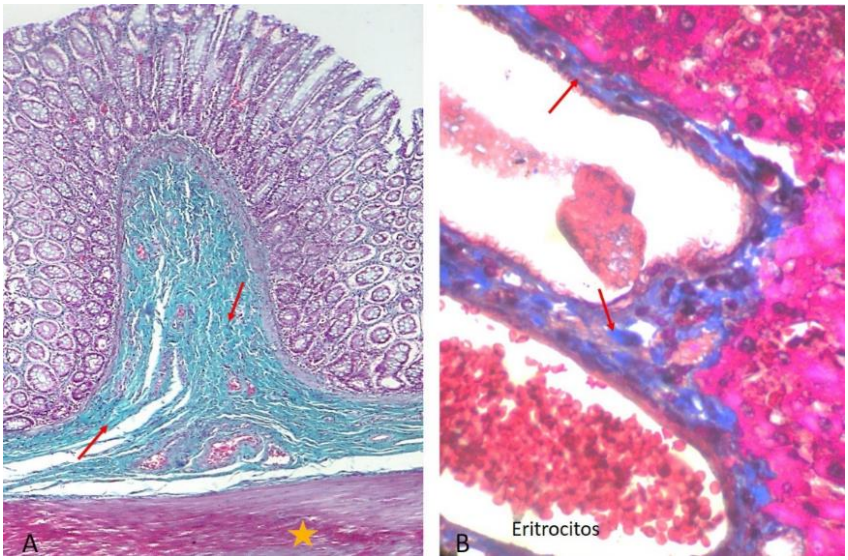

Figura 16. *Microfotografías. Coloración tricrómica de Mallory. A. Intestino. Flechas: tejido conectivo; estrella: tejido muscular. B. Hígado. Flechas: tejido conectivo; núcleos violetas. 4X. MAF.*

Coloración para identificación de fibras elásticas

Orceína

Las fibras elásticas son muy difíciles de identificar con la técnica de hematoxilina y eosina por su delgadez. La orceína de Pranter es un colorante que permite la identificación selectiva, por su color marrón rojizo intenso, de las fibras y las láminas elásticas. El resto de los componentes tisulares se observan naranja pálido (**Fig. 17**).

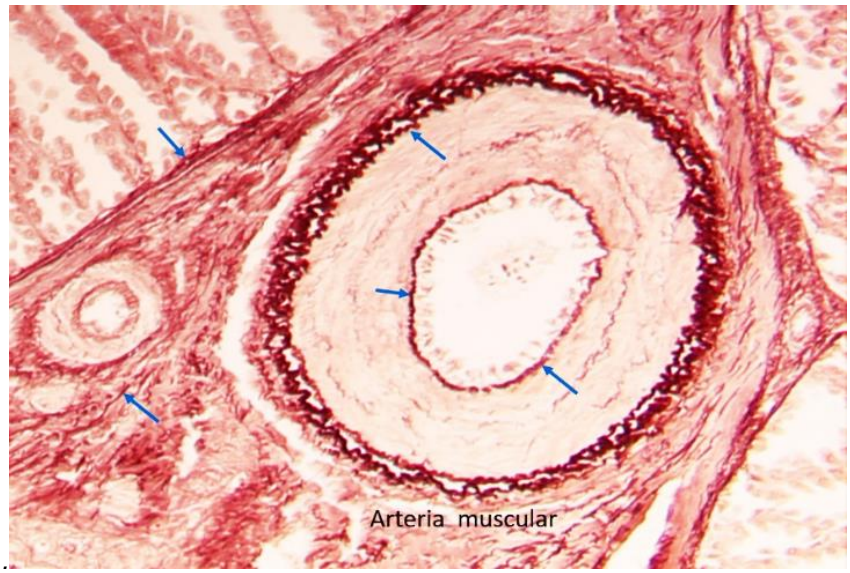

Figura 17. *Microfotografía. Estómago glandular de gallina. Flechas: láminas y fibras elásticas. 10X. Orceína. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.*

Coloraciones metacromáticas

La **metacromasia** (del griego *meta:* variación, *kroma*: color) es la propiedad que tienen algunas sustancias de las células y la sustancia intercelular de unirse a ciertos colorantes básicos y adquirir un color diferente al que estos poseen. Por ejemplo, el azul de toluidina y el Giemsa, colorean habitualmente de azul, pero cuando se unen a ciertos componentes tisulares (como los gránulos de los mastocitos del tejido conectivo) muy ricos en algunos glicosaminoglicanos ácidos, les otorgan un color rojo violáceo (**Fig. 18**).

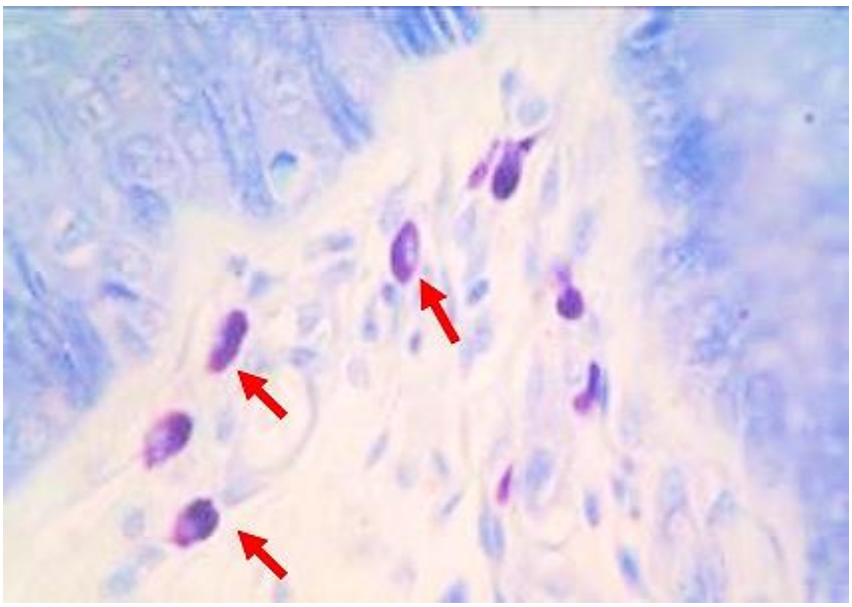

Figura 18. *Microfotografía. Piel de vizcacha de llanura (Lagostomus maximus). Flechas: mastocitos (flechas). 40X. Azul de Toluidina. MAF.*

Técnicas histoquímicas

Los términos **citoquímica** o **histoquímica** se utilizan habitualmente para designar a aquellas técnicas que permiten la identificación y localización de compuestos químicos específicos en las células aisladas y tejidos, respectivamente. Son técnicas que proporcionan valiosa información adicional sobre las células y tejidos ya que los colorantes habituales discriminan a las sustancias solamente por su propiedad ácida o básica.

Técnicas para el reconocimiento de carbohidratos

La técnica de **PAS (ácido periódico-Reactivo de Schiff)** es la técnica histoquímica más utilizada para determinar la presencia de carbohidratos. El ácido periódico, por su acción oxidante, rompe las ligaduras 1-2 glicol de los carbohidratos presentes en los tejidos y deja expuestos grupos aldehídos libres. Estos grupos reaccionan a su vez con la fucsina decolorada del reactivo de Schiff y generan un compuesto de color magenta e insoluble. Cuando esto ocurre, se considera que la reacción es PAS positiva (**Fig. 19**).

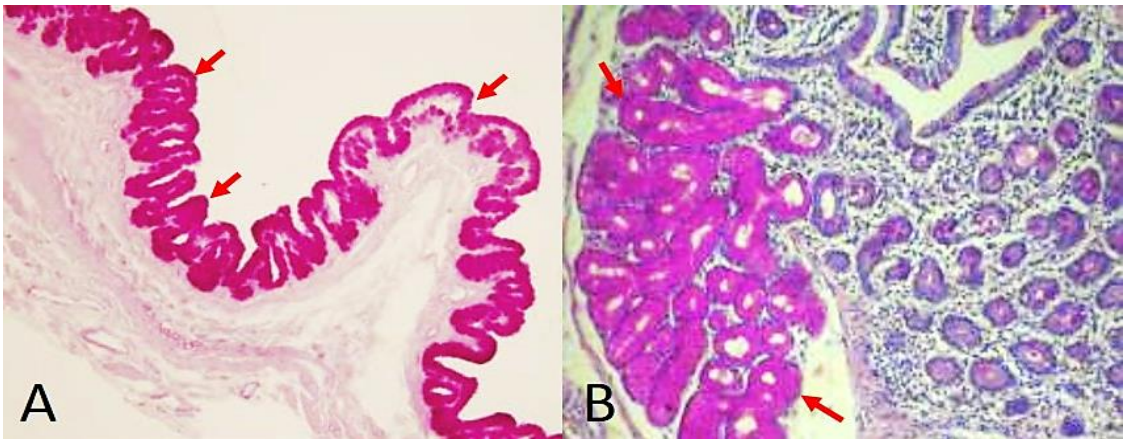

Figura 19. *Microfotografías. Flechas: reacción PAS+. A. Epitelio el de la vagina. B. Glándulas de Brunner en el intestino. Vizcacha de llanura (Lagostomus maximus). Técnica de PAS. 10X. MAF.*

Otras técnicas para localizar carbohidratos con mayor especificidad son las técnicas de los alcianes (por ejemplo, azul alcián) (**Fig. 20A**) y la **lectinhistoquímica** (**Fig. 20B**). Esta última se basa en la utilización de lectinas, un grupo de proteínas que reconocen con gran especificidad distintos carbohidratos.

Inmunohistoquímica

La técnica histoquímica que permite una mayor discriminación es la **inmunohistoquímica.** Esta técnica se basa en el uso de anticuerpos (capítulo 13) que reconocen específicamente a una sola sustancia, por lo general proteica.

Para permitir la visualización de las estructuras positivas, tanto en la lectinhistoquímica como en la inmunohistoquímica, se generan reacciones que dan como resultado **productos coloreados**, que pueden ser reconocidos con el microscopio óptico tradicional o se utilizan sustancias fluorescentes que se reconocen con el microscopio de fluorescencia.

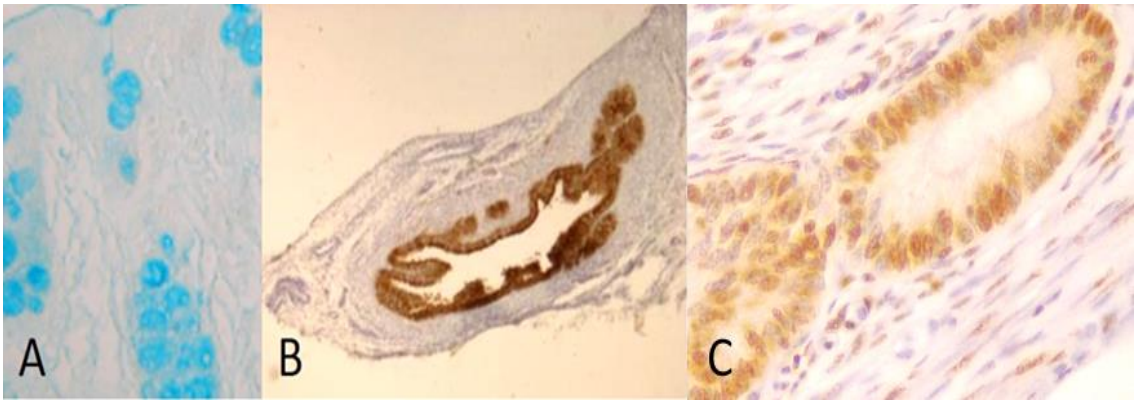

Figura 20. *Microfotografías. A. Técnica de azul alcián. Células mucosas del intestino delgado. 40X. B. Lectinhistoquímica con la lectina SBA. Epitelio del oviducto de color marrón. 4X. C. Inmunohistoquímica para detectar PCNA, núcleos de células del útero de color marrón. 40X. A-B: MAF. C: Lic. Francisco Acuña.*

Impregnaciones metálicas

Estas técnicas se basan en que ciertas sales metálicas, en especial de plata, oro o cromo, al reaccionar con algunos componentes tisulares liberan el metal en su forma no ionizada y este precipita sobre el tejido. No son verdaderas coloraciones porque el metal no se combina con los componentes tisulares, sino que se deposita sobre ellos. Estas técnicas se crearon a fines del siglo XIX y principio del siglo XX y con su utilización Camilo Golgi descubrió la organela que lleva su nombre y Santiago Ramón y Cajal demostró que las neuronas eran células aisladas. También permiten detectar fibras reticulares (**Fig. 21**).

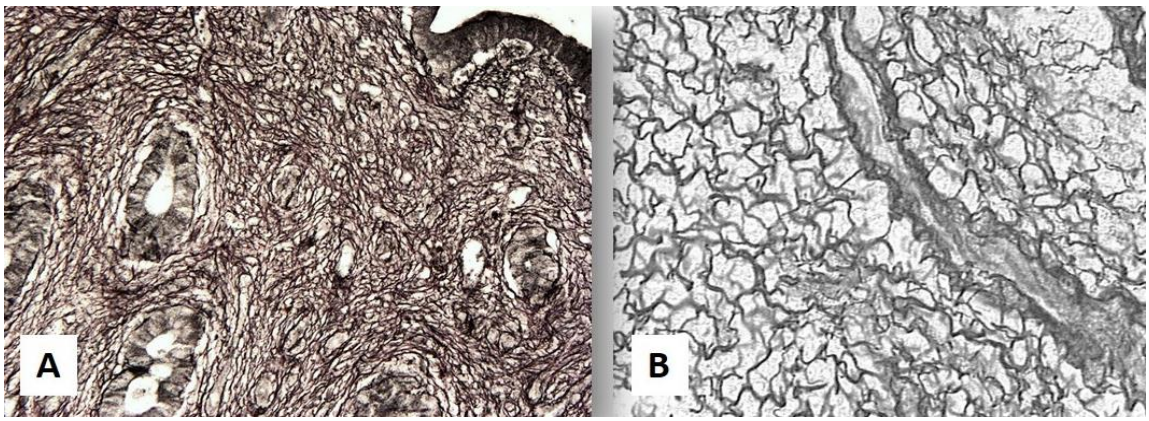

Figura 21. *Microfotografías. Fibras reticulares A. Estroma del útero. 10X. B. Llinfonodo. 20X. Reticulina de Gomori. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.*

Técnicas para reconocer lípidos: técnica de los sudanes

Los lípidos se pierden al disolverse en los aclarantes, como el xilol, utilizados en la técnica histológica (**Fig. 22A**). Es por ello por lo que la muestra se debe fijar e incluir por congelación formando un pequeño bloque de hielo y cortándolo con un criostato.

Los sudanes se utilizan para demostrar la presencia de lípidos en los tejidos. No son verdaderos colorantes porque no reaccionan químicamente con los lípidos, sino que se disuelven en ellos. Existen varios tipos de sudanes, uno de los más utilizado es el Sudán III que otorga un color naranja a los lípidos en los cuales se disuelve (**Fig. 22B**).

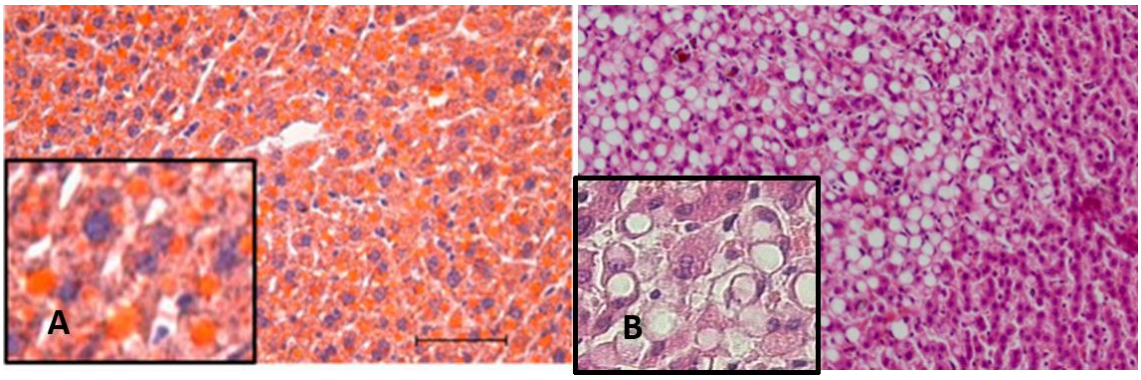

Figura 22. *Microfotografías. Hígado graso[33]. **A.** Técnica de Sudán III hematoxilina. 20X; recuadro 40X. B. 10X; recuadro 40X. HE. A. Tomada de Morais Mewes et al., 2019 (ver ref.). B. Archivo de la Cátedra de Patología General Veterinaria, FCV-UNLP.*

Técnicas para el estudio de los tejidos duros

Los tejidos mineralizados como los que componen los huesos y los dientes son muy difíciles de incluir y cortar con los métodos descriptos. Existen dos técnicas que se utilizan para poder estudiar los órganos que poseen tejidos mineralizados: la técnica de **descalcificación** y la de **pulido** o **desgaste**. La primera consiste en realizar una **descalcificación** previa a la realización de la técnica histológica habitual. Permite observar la forma general e identificar y conocer detalles de las células. Tras la fijación, la muestra se coloca durante varias horas o días en un líquido descalcificante, que extrae el calcio de los tejidos que, como consecuencia, pierden su dureza y pueden procesarse como cualquier otro tejido. Los líquidos que cumplen esta función por lo general son ácidos como el nítrico, el tricloracético o el EDTA (etilen-diamino-tetracético) entre otros. En general los ácidos más débiles como el EDTA, que actúa como quelante (fijador de calcio), tardan mucho más en descalcificar, pero alteran menos los tejidos (**Fig. 23A**).

[33] El hígado graso es una condición, generalmente patológica, en la que los hepatocitos, que son células del parénquima del hígado, acumulan cantidades excesivas de lípidos (especialmente triacilglicéridos).

El método por **desgaste** o **pulido** consiste en frotar primero sobre una piedra gruesa y luego sobre una fina un pequeño trozo de la muestra hasta obtener una lámina tan delgada que pueda ser atravesada por la luz y observada con el microscopio. Con esta técnica no se conservan los componentes orgánicos, por lo que se puede realizar con una muestra proveniente de un animal muerto mucho tiempo atrás; con ella se observan las estructuras que se han mineralizado. Una vez colocada sobre el portaobjetos, esta lámina puede colorearse con azul de anilina u otros colorantes, que penetran en las cavidades que en la vida del animal estuvieron ocupadas por células. También es posible observarlos sin colorear, aunque la definición de las estructuras es menor (**Fig. 23B**).

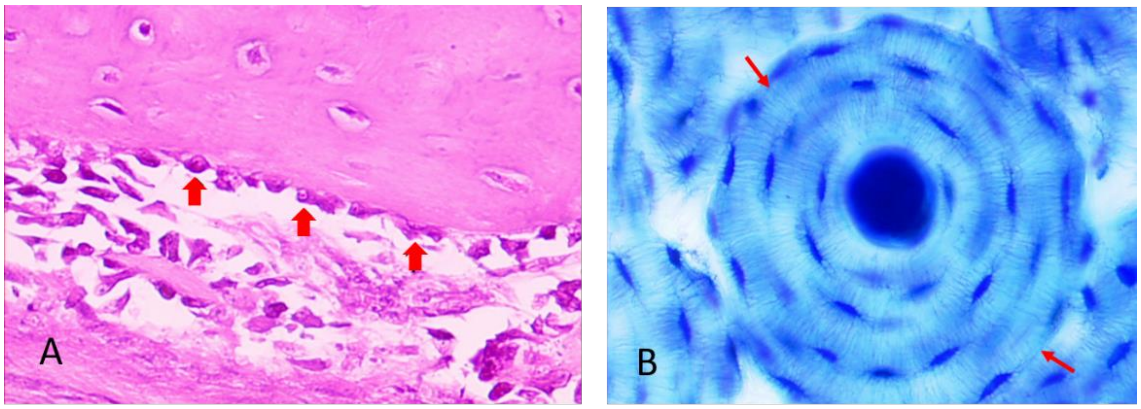

Figura 23. *Microfotografía. Hueso largo. A. Descalcificación y coloración con HE. Trabéculas óseas. Flechas: osteoblastos. B. Pulido y coloración con azul de anilina. Osteona. Flechas: laminillas óseas calcificadas. Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP. 40X.*

Estudio de células aisladas

Las técnicas descriptas previamente son las utilizadas para estudiar los tejidos animales con todos sus componentes. Las células aisladas pueden analizarse de forma más sencilla mediante **frotis** o **extendidos** que consisten en esparcir una muestra biológica sobre un portaobjetos, fijarla con métodos químicos (ejemplo: etanol) o físicos (ejemplo: calor) y por último colorearla. La coloración utilizada varía según la muestra que se analice. Para extendidos de células vaginales son muy utilizadas las coloraciones de Shorr y de Papanicolau. También es posible aplicar sobre los extendidos algunas de las técnicas descriptas previamente. La muestra puede tomarse a partir de hisopados, aspiración, raspados o improntas. Una aplicación muy frecuente de los extendidos realizados a partir de un hisopado vaginal de la perra es la posibilidad de establecer la fase del ciclo sexual en que se encuentra la hembra y el momento en que es potencialmente fértil y receptiva para la cópula. También pueden realizarse extendidos del material obtenido como producto de la aspiración de células mediante una jeringa a partir de lesiones en un órgano. Esta última aplicación es muy útil para diferenciar un proceso inflamatorio de uno neoplásico; inclusive puede orientar el diagnóstico hacia la identificación de algunas neoplasias como el mastocitoma canino, que se caracteriza por la metacromasia de sus células.

Sin dudas, el uso más extendido de este tipo de técnicas es el frotis sanguíneo. Dado que la sangre es un tejido líquido, pueden obtenerse y observarse con facilidad sus células mediante esta técnica.

Estos extendidos o frotis se realizan siguiendo una serie de pasos que se describen a continuación.

1. Se coloca una pequeña gota de sangre sobre un portaobjetos (**Fig. 24A**).
2. Un extensor (otro portaobjetos que tiene los bordes pulidos) se apoya sobre la gota permitiendo que ésta por capilaridad se distribuya uniformemente a lo largo de su borde (**Fig. 24B**).
3. Luego mediante un movimiento firme del extensor hacia el otro extremo del portaobjetos se transforma la gota en una película muy delgada (**Fig. 24C**).
4. Se deja secar a temperatura ambiente y una vez seco se colorea con técnicas adecuadas como la de May-Grunwald Giemsa.

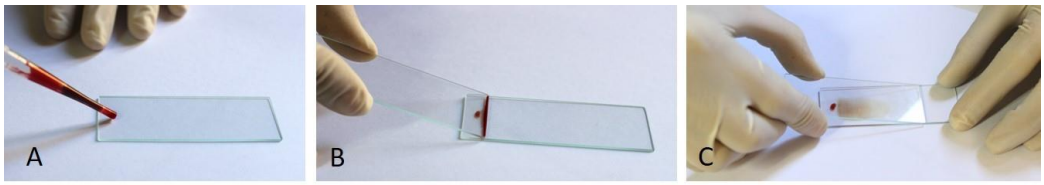

Fig. 24. *Fotografías. Técnica de extendido o frotis para sangre. MAF.*

Referencias

Bancroft, J. D. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques*. 6ta ed. Amsterdam: Churchill Livingstone Elseiver.

Brüel, A., Christesen, E., Tranum-Jensen, J., Qvortrup, K. y Geneser, F. (2015). *Geneser Histología*. 4ta ed. México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.

Fawcett, D.W. (1995) *Tratado de Histología*. 12ma ed. Nueva York: Interamericana Mc Graw Hill.

Gimeno, E.J. y Barbeito, C.G. (2004). Glicobiología, una nueva dimensión para el estudio de la biología y la patología, *Anales de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria*, *Tomo LVIII, pp.1-34.*

Harvey, J.W. (2001). *Atlas of Veterinary Hematology E-book: Blood and Bone Marrow of Domestic Animals.* Amsterdam: Elsevier Health Sciences.

Ham, A.W. y Cormack, D.H. (1983). *Tratado de Histología*. 8va ed. Madrid: Interamericana Mc Graw Hill.

Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP) (1995). *Métodos Histotecnológicos*. Washington D.C: Registro de Patología de los Estados Unidos.

Junqueira, L. y Junqueira, M. (1983). *Técnicas Básicas de Citología e Histología*. San Pablo: Editorial Santos.

Junqueira, L.C. y Carneiro J. (2015). *Histología Básica. Texto y atlas*. 10ma ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

Martoja, R. y Martoja, M. (1970). *Técnicas de Histología Animal*. Barcelona: Editorial Toray-Masson S.A.

Musiał, A, Gryglewski, R.W., Kielczewski, S, Loukas, M. y Wajda, J. (2016) Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries, *Folia Medica Cracoviensa* 56, pp. 31-40.

Pawlina, W. (2020) *Ross-Histología texto y atlas*. *Correlación con Biología Molecular y Celular*. 8va ed. Barcelona: Wolters Kluwer.

Preece, A. (1973) *A Manual for Histologic Technicians*. 3ra ed. Edimburgo: Editorial Churchill/Livingstone.

Puchtler, H. y Meloan, S.N. (1985) On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions, *Histochemistry,* 82, pp. 201-204.

Ramos-Vara, J.A. (2017) Principles and Methods of Immunohistochemistry, *Methods in Molecular Biology,* 1641, pp. 115-128. DOI:10.1007/978-1-4939-7172-5_5.

Ramos-Vara, J.A. y Webster, J.D. (2014) Special focus on investigative techniques. *Veterinary Pathology*, 51, pp.5-6. DOI:10.1177/0300985813514949.

Suvarna, K., Layton, C. y Bancroft, J. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques.* 8va ed. Amsterdam: Elsevier.

Ulloa Rosero, B., Tapia Cadena, M., Toscano Gallardo, C. y Pozo Larco, C. (2017). *Fundamentos de Hematología.* Quito: Editorial Edimec.

Referencias de figuras

Figuras 1, 3, 8, 10-13, 15 y 24. Fotografías Dra. Mirta Alicia Flamini.

Figura 2. Microfotografía realizada y cedida por el Dr. Enrique Portiansky. Cátedra de Patología General Veterinaria. Laboratorio de Análisis de Imágenes, FCV-UNLP.

Figura 4. Esquema realizado por la Méd. Vet. Fernanda Faisal. Servicio de Microscopía Electrónica. FCV UNLP.

Figura 5. Microfotografías propiedad del autor y la autora, obtenidas en el Servicio de Microscopía Electrónica, FCV-UNLP.

Figuras 6 y 9. Esquemas realizados por la Dra. Mirta Alicia Flamini.

Figura 7. Izquierda: fotografía Méd. Vet. Luca Di Cesare. Derecha: fotografía Dra. Mirta Alicia Flamini.

Figuras 14, 17, 21 y 23: Microfotografías Dra. Mirta Alicia Flamini, material del Archivo de la Cátedra de Histología y Embriología, FCV-UNLP.

Figura 16, 18, 19: Microfotografías Dra. Mirta Alicia Flamini sobre material propio.

Figura 20: A y B, microfotografías Dra. Mirta Alicia Flamini sobre material propio; C microfotografía Licenciado Francisco Acuña sobre material propio.

Figura 22: A. Tomada de Morais Mewes, J., Rodrigues Silva Gasparin, F., Yoshida, T., Amâncio Daniel da Silva, M., Raquel Marçal Natali, M., Francisco Veiga Bizerra, P., Sayuri Utsunomiya, K., Hideo Gilglioni, E., Shigueaki Mito, M., Cristiane Mantovanelli, G., Thais Lima de Souza, B., Makiyama Klosowski, E., Luiza Ishii-Iwamoto, E., Constantin, J., & Polimeni Constantin, R. (2019), The role of mitochondria in sex-dependent differences in hepatic steatosis and oxidative stress in response to cafeteria diet-induced obesity in mice. *Nutrients*, 11(7), 1618. DOI: 10.3390/nu11071618. Licencia CC-BY-4.0. B. Archivo de la Cátedra de Patología General Veterinaria, FCV-UNLP.