

MÉTODOS DE ESTUDIO EN HISTOLOGIA

Msc. Belén Z. Iglesias Ramírez. Profesora Auxiliar de Histología. ISCM Habana
Dra. CM Teresita Rodríguez Obaya. Investigador titular. CIM

Para estudiar la estructura de las células, tejidos y órganos que constituyen los componentes del cuerpo humano y organismos pluricelulares, el hombre ha desarrollado diversos métodos y técnicas, y ha ido perfeccionando los instrumentos necesarios para conocer con más profundidad la morfología y función de los diferentes niveles de organización de la materia. Es pues importante conocer, antes de estudiar la estructura y la composición de las células y los tejidos, algunos métodos, técnicas e instrumentos de los que se dispone para llegar a estos conocimientos.

OBSERVACIÓN MICROSCOPICA

A finales del siglo XVI los hermanos Hans y Zacarías Janssen, construyeron el primer microscopio compuesto. Galileo, que es conocido por sus estudios de Astronomía, fue uno de los primeros investigadores que utilizó el microscopio para fines científicos.

El empleo del microscopio originó nuevos términos, tales como el de **célula** (empleado por Robert Hooke, 1635-1703) y las primeras descripciones y grabados de organismos microscópicos (como los realizados por Leeuwenhoeck, 1632-1723); este último empleó lentes compuestas en la observación de protozoarios y otros organismos unicelulares.

El ojo humano es capaz de discriminar dos puntos que se encuentren separados por una distancia mayor de 0.1 mm solamente. Esto constituye un obstáculo para el estudio de las estructuras internas de la célula y es por esto que es necesario el empleo de equipos que aumenten la resolución.

La posibilidad de un sistema óptico de distinguir por separado (resolver) dos puntos muy cercanos, se denomina **poder de resolución**.

El poder de resolución en los microscopios, está en relación inversa con la longitud de onda de la radiación empleada en la fuente de iluminación. La resolución del microscopio óptico aumenta y alcanza su límite cuando se utiliza como fuente de iluminación la luz ultravioleta, producto de su pequeña longitud de onda. El microscopio óptico fue perfeccionándose hasta llegar a los modelos actuales, que pueden alcanzar hasta 0.2 μm de resolución.

A mediados del siglo XX, se inventó un tipo de microscopio que utiliza como fuente de iluminación los electrones. Con este equipo se puede realizar un estudio más detallado de la célula y los elementos subcelulares, moleculares y atómicos.

El microscopio electrónico al emplear una fuente de emisión de electrones, de una longitud de onda de 0.005 nm, puede alcanzar valores resolutivos mucho mayores que el alcanzado por los microscopios ópticos. El límite de poder de resolución del microscopio electrónico es de 0.2 nm.

Actualmente se utilizan las siguientes unidades de medidas

µm - micrómetro (antes, micra)
nm - nanómetro (antes, milimicra)
0.1 nm = 1 Å (antes, Amstrong)

TIPOS DE MICROSCOPIOS

Existen diversos tipos de microscopios, los cuales describiremos brevemente señalando sus características fundamentales.

MICROSCOPIO ÓPTICO DE CAMPO BRILLANTE

Este tipo de microscopio utiliza como fuente de iluminación la luz visible. Cuando la muestra a observar es transparente a la luz empleada, el haz luminoso la atraviesa iluminando el campo que se quiere observar. Aquí se emplea un **sistema de iluminación de luz transmitida**.

Este tipo de microscopio, se encuentra formado por un **sistema de iluminación** compuesto por una fuente de luz que puede ser emitida por una lámpara incandescente, en la base del equipo, o proyectada por un espejo (figura 2.1), Este haz de luz atraviesa una lente condensadora que lo concentra sobre la muestra, para obtener una iluminación óptima de la misma. Otra parte importante del equipo es el **sistema óptico**, el cual está constituido por varias lentes las que están diseñadas y construidas para evitar o corregir los defectos y las aberraciones que pueden producirse durante la proyección de la imagen. La lente *objetivo* recibe este nombre por ser la que se encuentra más cerca del objeto a examinar. Esta lente forma una imagen primaria ampliada del objeto, en el plano focal de una segunda lente compuesta, la lente *ocular*, que recibe este nombre por estar cerca del ojo del observador. La lente ocular amplía la imagen primaria y forma una *final ampliada en la retina del observador*.

Además del sistema de iluminación y del sistema óptico, en el microscopio existe un **sistema mecánico** que está constituido por aquellas partes que sostienen los sistemas de

lentes y de la muestra, y que además sirve para el enfoque y el movimiento de la muestra bajo el objetivo.

Este tipo de microscopio puede trabajar acoplado a distintos instrumentos, uno de ellos, el micromanipulador, que permite mediante movimientos en los distintos planos del espacio, y de una forma muy precisa, hacer disecciones sobre tejidos y células, introducir micropipetas y microelectrodos para suministrar sustancias o medir potenciales eléctricos en las células.

El esquema básico del microscopio de campo brillante, sirve para el estudio de los diferentes microscopios ópticos, los que al presentar un aditamento, dispositivo o accesorio adicional permitirá una observación más especializada; por ejemplo, el invertido, el de polarización, el de fluorescencia, el de contraste de fase, etc.

Debido a esto es importante estudiar detenidamente las partes de que consta un microscopio óptico de campo brillante, para así comprender mejor el funcionamiento de los microscopios ópticos más especializados que serán descritos posteriormente (figura 2.1)

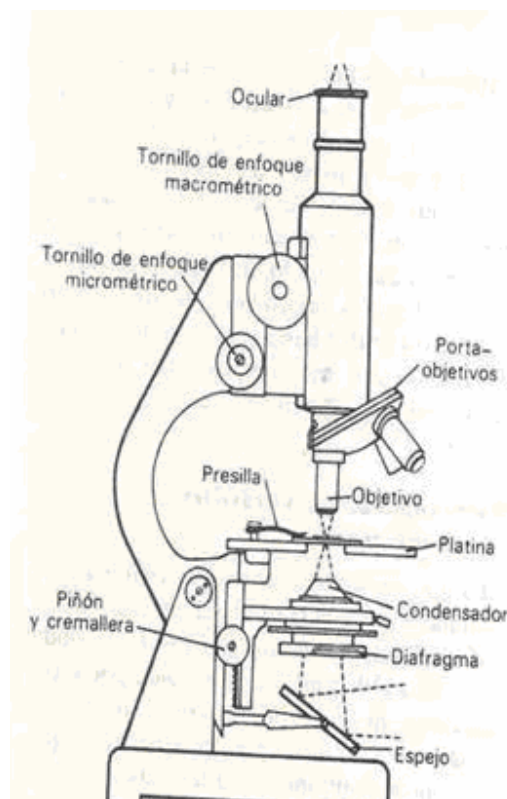


Fig. 2.1 Se observa un microscopio de campo brillante con todos sus componentes.
Sistema de Lentes

MICROSCOPIO ÓPTICO DE CONTRASTE DE FASE.

Cuando una muestra, por ejemplo una célula, debe ser observada viva, no se puede procesar por ninguna de las técnicas que serán descritas más adelante (inclusión, corte y coloración) y, por tanto, al ser vistas en un microscopio de campo brillante, serían pocos los detalles observables de la muestra. Para una visualización con suficiente contraste, se utiliza un microscopio especial que tiene un dispositivo que transforma las diferencias de fase de la longitud de onda de la luz empleada, en diferencias de amplitud. La luz, al atravesar una muestra, es desfasada normalmente con respecto a la luz que atraviesa el medio donde se encuentra dicha muestra (agua, aire, aceite. etc.). Este desfasaje es pequeño y el ojo humano no es capaz de distinguirlo; ahora bien, mediante dispositivos que existen en los llamados microscopios de contraste de fase, la diferencia de fase se aumenta lo suficiente como para que el ojo lo distinga, pudiéndose apreciar distintas intensidades de luz que van desde la oscuridad hasta el brillo intenso. Los diferentes tonos intermedios están determinados por las diferencias de espesor en la muestra.

MICROSCOPIO DE LUZ ULTRAVIOLETA Y DE FLUORESCENCIA

La luz ultravioleta, que no es visible al ojo humano, pero que si se puede utilizar en microfotografía, tiene una longitud de onda muy corta (300 μm) y es absorbida por algunos componentes celulares como los ácidos nucleicos, o por determinadas sustancias que se le pueden suministrar a las células.

El microscopio de luz ultravioleta puede utilizarse para la toma de microfotografías usando una película sensible a esta radiación, o mediante la visualización de las imágenes captadas por una cámara de televisión sensible a la luz ultravioleta.

La luz ultravioleta, por ser una radiación de alta energía, se utiliza en las técnicas de fluorescencia que consisten en la excitación de los electrones de sustancias presentes en las células o tejidos, o que pueden ser suministrados previamente.

Para esto se utilizan colorantes especiales o fluorocromos, los cuales, dependiendo del tipo empleado y de la energía de excitación, emitirán con una longitud de onda que mediante filtros puede ser observado por ojo humano.

Un ejemplo de esta técnica, consiste en suministrar a células vivas en cultivo o a animales de investigación vivos, uno de estos reactivos y examinar después al microscopio de fluorescencia el sitio donde este material se acumula, por ejemplo, usando naranja acridina como fluorocromo se puede demostrar la localización de ADN, al cual se le

observa una fluorescencia de color verde naranja en el núcleo de las células que han captado dicho colorante.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN.

Como ya tratamos, los electrones al tener una longitud de onda muy pequeña (0.005 nm) permiten a este instrumento un alto poder de resolución.

El microscopio electrónico se asemeja en algunos aspectos al microscopio óptico, ya que consta de:

- a) sistema de iluminación;
- b) sistema de manipulación de la muestra;
- c) sistema de formación de la imagen;
- d) sistema de proyección de la imagen

La **fente de iluminación** es un fino filamento de tungsteno (cátodo) que al ser calentado por el paso de una corriente emite electrones, los cuales son desprendidos a gran velocidad al establecerse una diferencia de potencial eléctrico entre el cátodo y el ánodo (este se encuentra cerca del primero), pasando a través de este último por una apertura hacia una columna metálica hueca, donde existe un alto vacío para evitar que los electrones que viajan a través de ella sean difractados por moléculas extrañas.

Una vez acelerados los electrones por el ánodo, a traviesan un campo magnético producido por la condensadora, la cual concentrarán los electrones en un haz fino y lo dirigirán hacia la muestra. Esta última se introduce dentro de la columna por un dispositivo especial que expone el objeto a estudiar al haz de electrones el cual constituye el *sistema de manipulación de la muestra*.

La muestra se contrasta con sustancias que contienen metales pesados de alta densidad electrónica en sus átomos, los cuales presentan diversas afinidades por determinados componentes celulares; una vez que el haz de electrones atraviesa la muestra, los mismos chocan con la nube electrónica de estos compuestos que se han depositado sobre los componentes celulares lo que produce un retardo y dispersión de la trayectoria de alguno de los electrones, mientras que otros continuarán su trayecto hasta llegar a la pantalla fluorescente, donde se forma la imagen.

El dispositivo con la muestra puede moverse en distintas direcciones en un plano perpendicular al eje de la columna o puede ser ligeramente inclinado para algunos estudios en que se requiere este movimiento.

Luego de atravesar la muestra, los electrones pasan inmediatamente a través de la *lente objetivo*, donde se *forma una imagen primaria invertida*, la cual es rectificadada por una lente

intermedia y proyectada hacia una pantalla fluorescente, formando la imagen final aumentada al chocar los electrones y producirse una emisión de ondas en el rango de la luz visible. Por debajo de esta pantalla existe una cámara fotográfica donde se registran las imágenes, una vez retirada la pantalla fluorescente.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO.

Existe otro tipo de microscopio electrónico que recibe el nombre de microscopio electrónico de barrido y que se basa en el estudio de los electrones reflejados por una superficie. Un dispositivo integra la imagen, la cual se observa en un sistema de televisión; mediante este equipo es posible estudiar la estructura tridimensional de las superficies; por ejemplo, los cilios de una célula, la forma bicóncava de los hematíes, etcétera.

Este tipo de microscopio electrónico, dado su poder de resolución (alrededor de 20 nm o más), permite el estudio detallado de estructuras cuyas dimensiones se encuentran entre los límites de resolución del microscopio óptico (0.2 μm) y el microscopio electrónico de transmisión que puede alcanzar de 0.3-0.1 nm

TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA OBSERVARLAS AL MICROSCOPIO.

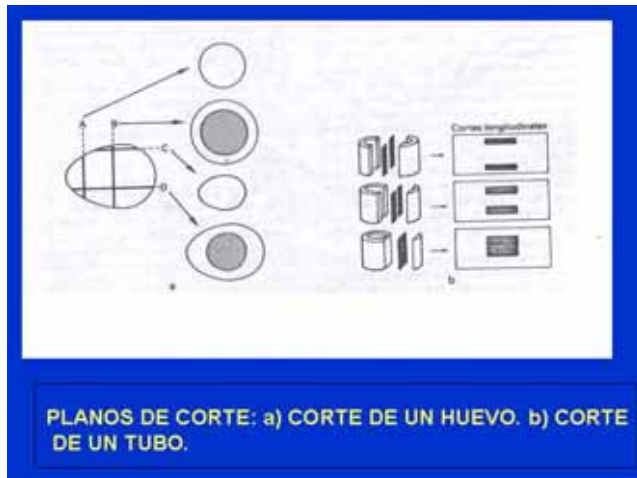
Al observar una estructura al microscopio óptico o al electrónico, la luz o los electrones atraviesan la muestra, dando lugar a la formación de imágenes que son ampliadas por las lentes del microscopio. Para esto es necesario que los objetos examinados sean lo suficientemente delgados, para que la luz o los electrones los atraviesen (figura 2.4).

En el caso de la microscopía óptica las muestras deben tener un grosor de 5-8 μm aproximadamente, y para microscopía electrónica, valores entre 20 y 40 nm. Es necesario, por tanto, cortar el material que ha de ser estudiado en "lascas" muy finas.

La preparación del material biológico muerto, para su estudio al microscopio óptico o al electrónico, consta de cuatro pasos fundamentales.

- 1ro. La fijación.
- 2do. La inclusión.
- 3ro. El corte.
- 4to. La coloración.

Mediante la *fijación* se logra detener los procesos de destrucción, celular o hística, que se producen por las enzimas contenidas en ellos, una vez muerto el organismo o al separarla de él. Este proceso de destrucción celular recibe el nombre **de autolisis**.



Los cortes para su observación al microscopio óptico, se montan en una lámina de vidrio llamada *portaobjetos*. Para microscopía electrónica se montan en unas rejillas metálicas pequeñas que presentan perforaciones, las cuales permiten el paso del haz electrónico. Para el estudio de cortes al microscopio óptico de campo brillante es necesario colorear previamente la muestra con diferentes compuestos químicos (colorantes), que tienen la capacidad de reaccionar con los diversos componentes de las estructuras celulares.

La posibilidad de observar una coloración dada en una estructura se debe a que esta se comporta como un filtro de color, dejando pasar solamente la luz de determinada longitud de onda.

Es importante para el estudiante la comprensión de algunos conceptos relacionados con la coloración. Los colorantes que corrientemente se emplean para la observación de láminas histológicas, son sales neutras que presentan radicales ácidos o básicos, es decir, colorantes ácidos y básicos. Una coloración de uso corriente en histología es la hematoxilina y eosina (H/E) que emplea ambos tipos de colorantes. Con esta coloración se observa que el núcleo se tiñe con el colorante básico (azul), y el citoplasma se colorea con el colorante ácido (rosado).

El núcleo, al tener afinidad por el colorante básico (el ADN capta el colorante básico), es *basófilo* y la propiedad que manifiesta esa estructura se denomina *basofilia*. Por su parte, el citoplasma, excepto en células secretoras de proteínas, es generalmente *acidófilo*, es decir, tiene afinidad con el colorante ácido eosina. La propiedad de reaccionar con los colorantes Ácidos, es la *acidofilia*.

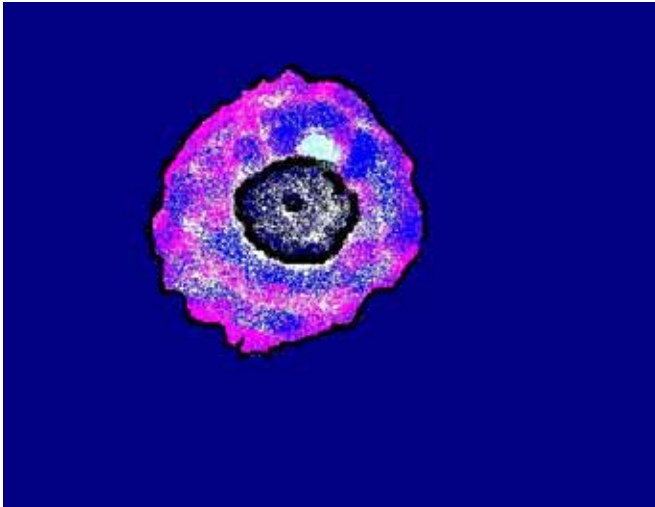


Fig. 2.4 En la figura se muestra un esquema de una célula eucariota coloreada con Hematoxilina/Eosina. El núcleo se aprecia de color azuloso (basófilo) y el citoplasma se observa rosado (acidófilo). No obstante se observa basofilia localizada en el citoplasma que se corresponde con el Retículo endoplasmático rugoso. La basofilia citoplasmática se debe a la presencia de ribosomas asociados al Retículo.

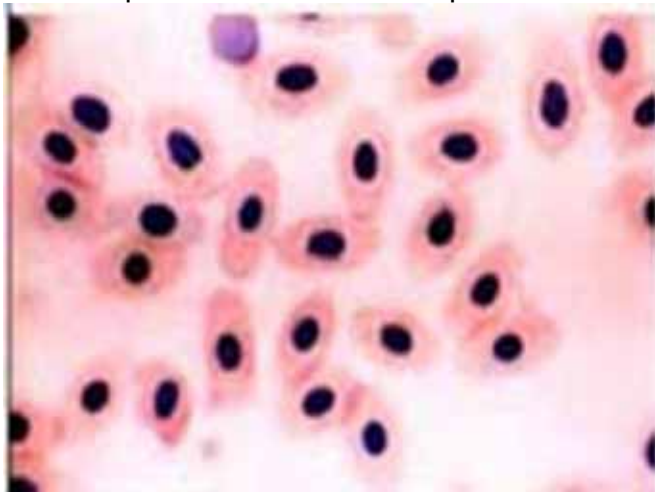


Fig. 2.5 Se observan un frotis de sangre de rana, a 40x. Cada célula se corresponde con un eritrocito, en esta especie los eritrocitos son nucleados. Se aprecia el núcleo oscuro (basófilo) y el citoplasma acidófilo (rosado)

Otro grupo de colorantes, los básicos de anilina, incluyen el azul de toluidina, el azul A, el azul de metileno. Se emplean para identificar los mucopolisacáridos. Al colorearse las estructuras, lo hacen de un color distinto al del colorante original. Esa propiedad se denomina *metacromasia*. Los colorantes básicos de anilina son el azul brillante, el rojo neutro y el verde Janus.

Las técnicas de tinción incluyen también la utilización de varios colorantes. Ejemplo de ellos son los métodos tricrómicos como el Mallory, el Mallory-Azan y el método de Masson utilizados para demostrar las fibras del tejido conjuntivo, etc. Otra técnica de coloración muy empleada es la tinción con sales de plata, que tiñe de negro o carmelita oscuro las estructuras celulares, estas se denominan por la afinidad con las sales de platas *argirófilas*.

Por otra parte, el fenómeno fundamental que permite la visualización de las estructuras al microscopio electrónico, esta dado por la dispersión electrónica que provocan los elementos químicos que componen las estructuras de la muestra. Estos elementos tienen por lo general bajo peso atómico (C, O, N, H, etc.), por lo que se hace necesario asociar a estas estructuras, compuestos que contengan metales pesados de mayor peso atómico, por ejemplo el tetraóxido de osmio y las sales de uranio, que reaccionan con zonas específicas de la muestra, provocando una mayor dispersión y, por tanto, un contraste entre las diferentes zonas.

La imagen que se observa en la pantalla fluorescente del microscopio electrónico está formada por los electrones que atraviesan la preparación sin una gran dispersión. Los diferentes tonos están determinados por la llegada o no de ellos, donde las zonas brillantes corresponden, al lugar en el que un mayor número de electrones chocan con la pantalla fluorescente r

TÉCNICA DE CONGELACIÓN FRACTURA.

Mediante esta técnica es posible estudiar al M/E estructuras celulares superficiales o puestas al descubierto por medio de la fractura de una muestra congelada a muy bajas temperaturas, sin ningún tipo de procesamiento químico que altere la ultraestructura de la misma.

La muestra se congela en nitrógeno líquidos (-196 °C) y se monta en un equipo donde hay un dispositivo especial dentro de una campana, en la cual se hace un alto vacío. Mediante una cuchilla se produce un corte que provoca una línea de fractura en la muestra, quedando expuesta la superficie donde se produjo el corte.

Esta superficie pierde agua por sublimación y posteriormente se le evaporan carbón y metales pesados desde diferentes ángulos, hasta cubrirla en su totalidad, logrando de esta manera, una réplica o mascarilla de la misma. Por un procedimiento donde se elimina el material biológico, la replica se separa de la muestra y se examina al M/E, en ella se pueden apreciar las características de las estructuras que quedaron impresas en la réplica

TÉCNICA CITOQUÍMICAS E HISTOQUÍMICAS.

Las células y los tejidos están constituidas por proteínas, carbohidratos y otros componentes, los cuales se encuentran formando parte de la estructura de los mismos. Estas sustancias son químicamente activas, es decir, que en determinadas condiciones es posible hacerlas reaccionar con otros compuestos.

Esta capacidad de reacción es el principio en que se basan las técnicas citoquímicas e histoquímicas para la demostración, en las células y en los tejidos, de un compuesto o sustancia, o para la determinar la actividad de una enzima, o complejos enzimáticos celulares e hísticos.

El producto de estas reacciones son compuestos coloreados visibles al microscopio óptico, o de alta densidad para su visualización al microscopio electrónico; por ejemplo, la demostración de lípidos acumulados intracelularmente en algunas patologías, o la demostración de lípidos que forman parte de estructuras celulares, se puede llevar a efecto mediante diversas técnicas con sustancias que reaccionan con las grasas; uno de estos es el tetraóxido de osmio, que reacciona con los lípidos no saturados, y da un compuesto de color negro que puede distinguirse tanto al microscopio óptico como al microscopio electrónico debido a su alta densidad.

En otras ocasiones, es posible, mediante esta técnica, demostrar la presencia o ausencia de un orgánulo celular. Las células objeto de estudio se ponen en contacto con sustratos específicos que reaccionarán con los componentes químicos de un orgánulo dado, así dando coloración al M/O.

Estas técnicas brindan una información de la composición química celular, así como de sus elementos estructurales y su localización.

TÉCNICA INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Determinadas células de organismos superiores tienen la capacidad de responder ante sustancias extrañas, **antígenos**, sintetizando otros compuestos llamados **anticuerpos**.

La técnica inmunocitoquímica se basa en el reconocimiento del antígeno por un anticuerpo que previamente se ha conjugado con un fluorocromo, una enzima o un coloide de un metal pesado (por ejemplo el oro).

Al conjugarse con estos compuestos, los anticuerpos pueden reconocer en el tejido o en la célula, los componentes antigénicos contra los cuales fueron desarrollados, poniendo así de manifiesto la localización o presencia de aquellas estructuras objetos del estudio, mediante

reacciones químicas o a través de microscopios especializados (microscopios de fluorescencia y electrónico). Si se emplea un microscopio de fluorescencia, el marcador será un fluorocromo, los cuales emiten fluorescencia al ser excitados por la luz ultravioleta; si la reacción antígeno-anticuerpo se evidencia mediante una enzima se hace necesario el empleo del sustrato de la misma, además de una sustancia que proporcione un color determinado o un precipitado que pueda ser distinguido en un microscopio óptico de campo brillante o con una técnica adecuada al microscopio electrónico.

TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO CELULAR.

Cuando se requieren separar los componentes intracelulares (organitos), la técnica de elección es la centrifugación o la ultracentrifugación en un medio isotónico. Para esto es necesario romper previamente las células mediante procedimientos mecánicos (en un homogeneizador con émbolo de vidrio o teflón), con la consiguiente liberación al medio de sus componentes.

En la centrífuga las partículas de distinta densidad, forma y tamaño, sedimentan a diferentes velocidades y tiempo. De este modo se obtienen distintas porciones o fracciones celulares.

La unidad que define la velocidad de sedimentación de una partícula en un campo gravitacional, se denomina *unidad Svedberg*, la cual relaciona la velocidad angular del rotor de la centrífuga con la distancia de la partícula al eje del rotor. Esta unidad es una constante para cada partícula y generalmente se describe como una unidad S.

Aunque con esta técnica se obtienen fracciones celulares bastante puras, no es posible evitar la contaminación de una determinada fracción con partes de otra. Como se planteó anteriormente, el comportamiento de las diferentes partes de la célula en el campo centrifugacional, está determinado por varios parámetros que pueden coincidir en organitos diferentes; por ejemplo, una mitocondria pequeña puede tener similar forma, talla y densidad que un lisosoma y, por tanto, se obtiene una fracción mitocondrial contaminada por lisosomas. Este hecho es necesario tenerlo en cuenta cuando se está estudiando el contenido enzimático de determinada fracción, ya que se pueden falsear los resultados (figura 2.10).

TÉCNICA DE CULTIVO DE TEJIDOS.

El método consiste en cultivar células o tejidos en un medio nutritivo. En estos cultivos se realizan estudios sobre distintos procesos, tales como la división, el crecimiento, la diferenciación celular y otros.

Estas células de cultivo provienen de órganos o tejidos animales o vegetales, las cuales, manteniéndolas en un medio nutritivo adecuado, y con temperatura, pH y otros

requerimientos especiales, pueden desarrollar muchas de las funciones metabólicas que realizaban cuando formaban parte de los tejidos.

Esta técnica es muy útil para el estudio de los virus, utilizando a las células de cultivo como hospederas de ellos. La técnica en cuestión también se utiliza en el estudio de células cancerosas y su comportamiento en el desarrollo de tumores.

En general, las células de cultivo sirven como material de experimentación sobre el cual se pueden hacer diversos estudios, empleando todas las técnicas descritas.

Como hemos estudiado, son diversos los métodos y técnicas empleados; no obstante, con el desarrollo de las ciencias irán surgiendo nuevas técnicas que permitan a los científicos un conocimiento cada vez más profundo de las células y su funcionamiento.

Es importante tener en cuenta que cada método y técnica tiene sus limitaciones y que solo haciendo un uso racional de ellas, se puede lograr un conocimiento cada vez más completo.