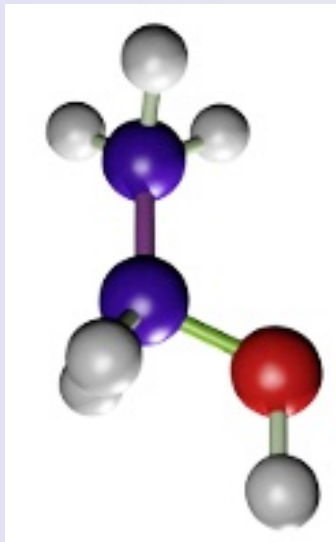


ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL

Técnicas histológicas

FIJACIÓN



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal
Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
Facultad de Biología. Universidad de Vigo.
(Versión: Diciembre 2015)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs2.uvigo.es/mmegias/inicio.html>

y

ha sido creado con el programa Scribus

(<http://www.scribus.net/>)

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).

ÍNDICE

Introducción	4
El proceso hisológico	5
Fjiación	7
Métodos de fijación	8
Tipos de fijadores	10

Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procesos 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.

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 estructura de los tejidos está basada en la organización de los tipos de células que los componen y, salvo contadas ocasiones, las

características morfológicas de las células sólo se pueden observar con estos aparatos.

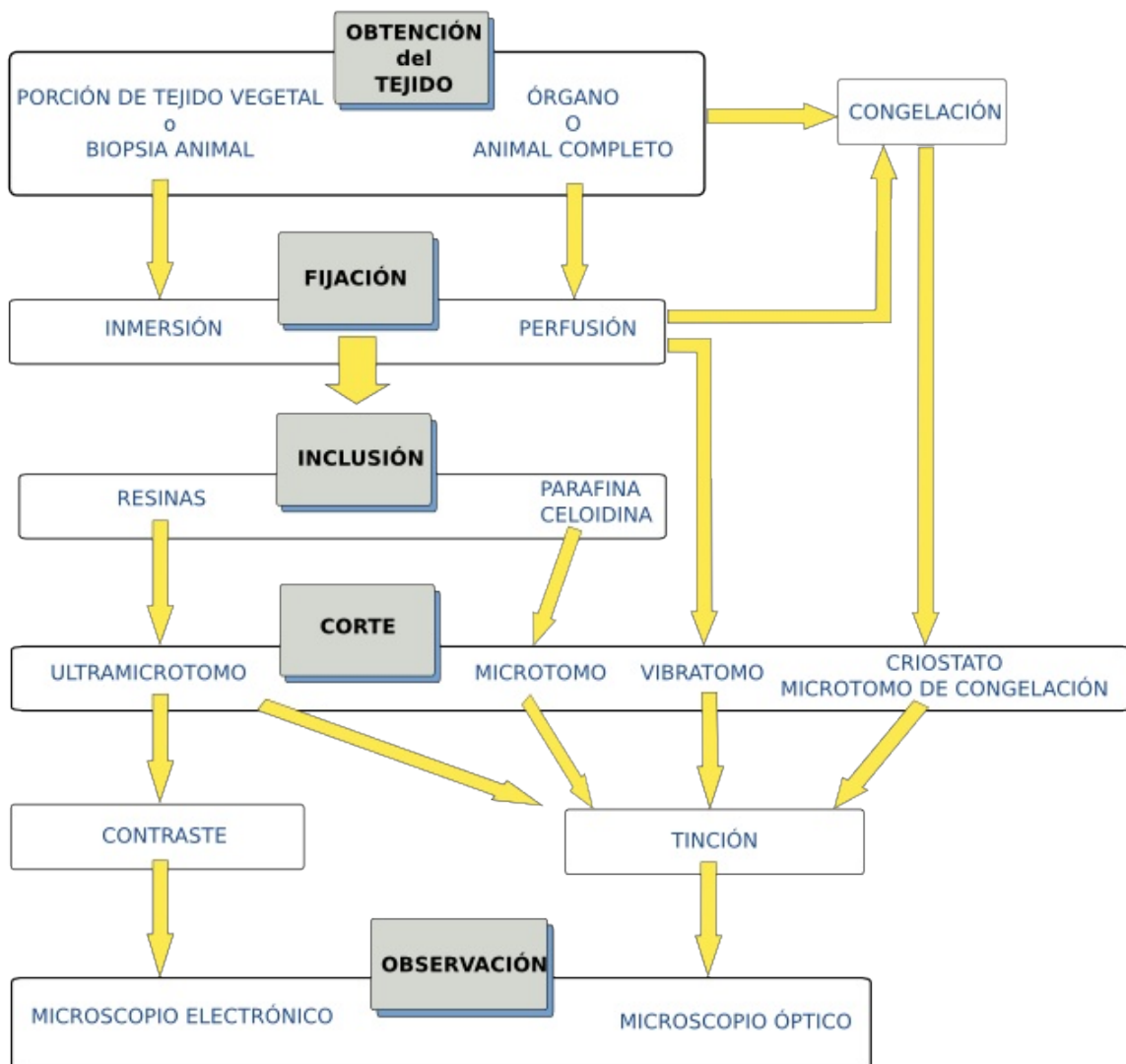
Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, 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 mejor o peor dependiendo 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.

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 para 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 unos 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



Esquema del proceso histológico.

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 nanómetros), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesos (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 puedan 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.

Fijación

Todos los tejidos, bien cuando se extraen de un organismo o bien cuando el organismo en el que están muere, sufren dos tipos de procesos degradativos: autólisis por acción de enzimas intracelulares, es decir, autodigestión, y putrefacción por acción bacteriana. Además, el procesamiento histológico posterior del tejido para poner de manifiesto y observar determinadas estructuras supone una metodología que puede degradar las estructuras tisulares. Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posibles a las que poseía en su estado vivo. Es como hacer una fotografía del tejido vivo y poder observarla, tras cierto tratamiento, con el microscopio. Así, los fijadores deben evitar la autólisis, proteger frente a ataques bacterianos, insolubilizar elementos solubles que se quieren estudiar, evitar distorsiones y retracciones tisulares, penetrar y preparar el tejido para poder llevar a cabo tinciones específicas posteriores, si es necesario, etcétera.

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. Incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. La elección depende de las características fijadoras que necesitemos. Por ejemplo, si queremos estudiar actividades enzimáticas debemos usar un fijador que no nos altere el centro activo de las enzimas en las que estamos interesados, y quizá para ello tengamos que sacrificar en cierta medida la morfología tisular. Si queremos estudiar la ultraestructura celular debemos usar fijadores que la preserven y que protejan a las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, y quizá esto altere su apetencia por los colorantes generales. Si queremos teñir un determinado componente celular difícilmente teñible quizá debamos usar un fijador que lo modifique para que sea reconocido más fácilmente por los colorantes. En cualquier caso hay características de los fijadores que tenemos que tener en cuenta antes de su uso:

Velocidad de penetración. El proceso de fijación ha de ser rápido y la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es

un factor determinante. Este parámetro condiciona el tamaño de la pieza que queramos fijar, más pequeña cuanto menor sea la velocidad de difusión del fijador empleado, y también determina el tiempo de fijación, mayor cuanto menor tiempo de difusión.

Velocidad de fijación. Esta característica no dependen de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador.

Endurecimiento. Los fijadores generalmente endurecen los tejidos, lo cual depende del tipo de fijador y del tiempo que el tejido haya estado expuesto a él.

Ósmosis y pH. Es indispensable evitar cambios de volumen en la células producidos por una osmolaridad del fijador diferente a la del tejido. Por tanto, hay que equilibrar la osmolaridad de las soluciones fijadoras y la de los tejidos a fijar. No es necesario añadir sustancias complejas. Por ejemplo, para los tejidos de animales terrestres basta con añadir 0.9 % de cloruro sódico. Son sales que no afectan a la capacidad del fijador. Normalmente se suelen usar soluciones tamponadoras a un pH semejante al del tejido e isoosmóticas con dicho tejido.

Efecto mordiente. Algunas estructuras tisulares son difíciles de teñir puesto que tienen poca apetencia por los colorantes. Esta apetencia puede ser incrementada con un tratamiento previo. Algunos fijadores, además de fijar, modifican químicamente a ciertas estructuras celulares para que posteriormente puedan unirse a ellas los colorantes. Este tipo de modificación química se le denomina efecto mordiente.

Artefactos. Los procesos de fijación pueden acarrear alteraciones tisulares como variaciones morfológicas, cristalización de compuestos, desplazamiento de sustancias, etcétera. Estos cambios pueden producirse por las características del fijador o por un mal uso de éste. En cualquier caso deben tenerse en cuenta para no describir como características tisulares lo que es un artefacto introducido durante la fijación.

Métodos de fijación

Existen diferentes formas de fijar los tejidos dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y de lo que queramos observar. Los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos: físicos y químicos.

Los fijadores físicos se basan o bien en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de calor elevado. Se utilizan cuando cuando los fijadores químicos alteran la estructuras que queremos observar, cuando necesitamos una fijación muy rápida, o cuando el tipo de tejido y la técnica que usaremos lo requiera. La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares y es conveniente que sea rápida puesto que así se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destruirían la estructura del tejido. Existen variantes de esta técnica como son la criodesecación o liofilización y la criosustitución. La criodesecación parte de tejido previamente congelado al que posteriormente se le sublima el hielo, es decir, el agua pasa de estado sólido a gaseoso sin pasar por estado líquido. Al eliminar el agua se impide que se den reacciones químicas, por lo que, además de la fijación, este método preserva el tejido en el tiempo. La criosustitución también parte de tejido congelado pero en este caso se produce una sustitución lenta del hielo por una solución fijadora. Con ello se posibilita una fijación química sobre un material que no ha sufrido deterioro puesto que está congelado. Los métodos de fijación por calor no son frecuentemente usados, excepto para el estudio microorganismos.

Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas del tejido, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación. Hay dos métodos básicos de fijación con fijadores líquidos: inmersión y perfusión. En cualquier caso el fijador debe llegar a todas las partes del tejido lo más rápidamente posible.

Inmersión. En el método de inmersión las piezas de tejido se sumergen en la solución

fijadora. Hay que tener en cuenta algunas precauciones.

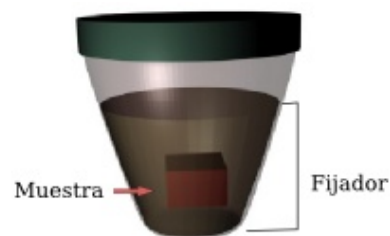
1) Las piezas de tejido no deberían superar los 0.5 cm de espesor para que el fijador alcance el interior de la pieza antes de que ésta comience a deteriorarse. Esto depende de la velocidad de penetración del fijador y de las características del tejido. Por ejemplo, si tiene cavidades por donde penetre la solución fijadora el volumen podría ser mayor.

2) El volumen recomendado de fijador es 20 veces superior al volumen de la pieza.

3) La osmolaridad del tejido y de la solución fijadora deben estar equilibradas.

4) El pH del fijador debe ser próximo al fisiológico.

5) El tiempo de fijación depende de cada tipo de fijador. Una agitación suave durante la fijación ayuda a la penetración del fijador y disminuye el tiempo.



Fijación por inmersión

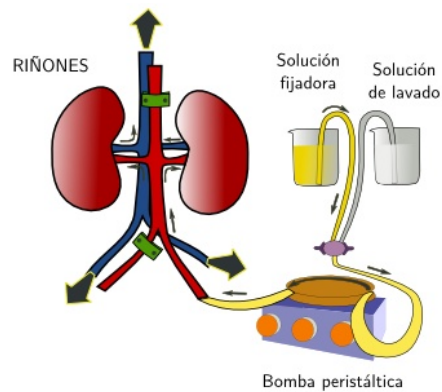
Perfusión. Por este procedimiento la solución fijadora se introduce a través del sistema circulatorio por el cual accede a todas las células del tejido gracias a la red de capilares. Mediante este método se puede fijar un animal completo introduciendo la solución fijadora a través del ventrículo izquierdo del corazón. El fijador llegará a todas las células irrigadas por la sangre bombeada por dicho ventrículo (circuito corporal). Si se quieren fijar los pulmones habría que introducir el fijador por el ventrículo

derecho. También podemos fijar un único órgano en el caso de que podamos introducir la solución fijadora en la arteria principal que irriga dicho órgano. La perfusión no siempre es posible en algunos casos como en muchas biopsias o en los tejidos vegetales.

El método de fijación por perfusión es mucho más efectivo que el de inmersión ya que la solución fijadora llega rápidamente a escasa distancia de todas las células de la estructura perfundida. Por tanto, la velocidad de penetración del fijador no es una condición limitante.

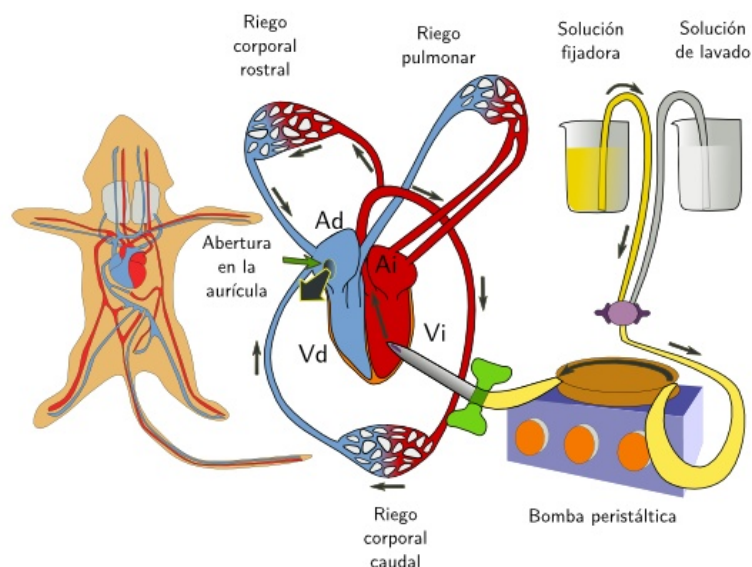
Antes de introducir el fijador en el sistema de vasos sanguíneos hay que eliminar previamente la sangre con una solución de lavado oxigenada, de otra manera su interacción con el fijador produce trombos que impedirían la fijación de determinadas zonas del animal o del órgano. Respecto a las precauciones mencionadas anteriormente en el método de inmersión debemos cuidar aquí también la osmolaridad, el pH y el tiempo de fijación.

Este método de fijación por perfusión requiere conocer la presión a la que se va a introducir la solución fijadora en el animal o estructura, la cual



Fijación por perfusión de un órgano. Mediante perfusión se consigue que la solución fijadora llegue a todas las células del órgano a través del sistema sanguíneo. Mediante una bomba peristáltica se introduce la solución fijadora a través de la arteria que irriga el órgano. Se obturan todos aquellos vasos arteriales que no conducen al órgano.

debe ser similar a la que posee la presión sanguínea normal en estado vivo. La presión que ejercerá la solución fijadora se puede regular mediante bombas peristálticas (ver figura) o por gravedad, es decir, variando la altura a la cual se coloca la solución fijadora respecto a la del animal. Esto es importante porque una presión muy baja podría impedir que la solución fijadora alcanzara todas las partes de la estructura y una presión muy alta podría provocar roturas de los vasos sanguíneos y de la propia estructura tisular.



Fijación por perfusión de un organismo completo. Mediante este tipo de perfusión se introduce la solución fijadora en el sistema sanguíneo. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente para permitir al fijador entrar a través del ventrículo izquierdo (Vi) y pasar a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo (excepto por el circuito pulmonar). Tras pasar por la red capilar la solución fijadora pasa a los vasos venosos que terminan por verter su contenido en la aurícula derecha (Ad). A esta cavidad hay que hacerle una abertura para que la solución fijadora, una vez realizada su función, salga del circuito. Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho.

Tipos de fijadores

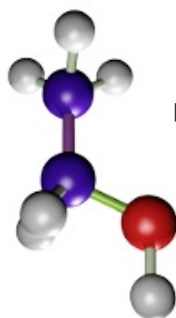
Existen multitud de fijadores en los manuales de técnicas histológicas. Aquí sólo trataremos aquellos que consideramos de uso más común para la observación de tejidos al microscopio, es decir, aquellos que mejor preservan la estructura celular. Los fijadores químicos son los más frecuentemente empleados, bien compuestos por un solo tipo de sustancia fijadora o con mezclas de varias de ellas.

Los fijadores se pueden clasificar en dos grandes grupos según su acción sobre el tejido: los desnaturalizantes y los que establecen enlaces cruzados. Los primeros, al extraer agua de los tejidos producen desnaturalización de las proteínas produciendo coagulación proteica, mientras que los segundos establecen enlaces químicos entre moléculas del tejido. Los fijadores que tienen como base al alcohol son desnaturalizantes, tales como el Bouin o el Carnoy, mientras que el formaldehído o el glutaraldehído establecen enlaces.

¡Atención! La mayoría de las sustancias fijadoras son tóxicas por inhalación o por contacto, algunas de ellas cancerígenas. Hay que seguir las indicaciones de seguridad para su manejo y utilización.

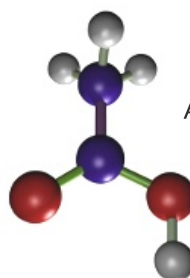
Fijadores simples

Alcohol etílico. Fija por deshidratación y se usa entre el 70 y 90 %. Es un buen fijador para preservar proteínas, como enzimas, glucógeno, pigmentos y es útil para fijar las extensiones citológicas. Debido a que deshidrata, a la vez que fija, se puede usar también como un conservante de las muestras. Tiene algunos inconvenientes como producir endurecimiento y la retracción de los tejidos. Carece de efecto mordiente.



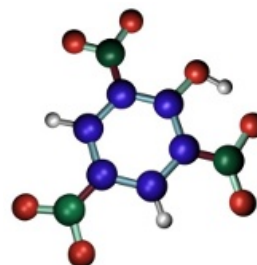
Etanol: CH₃-CH₂-OH

Ácido acético. Su proceso de fijación consiste en cambiar el estado coloidal de las proteínas. Se utiliza a una concentración que varía entre el 1 y el 5 %. Es el fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Como inconvenientes cabe destacar la destrucción de las mitocondrias y mala fijación de membranas y citoplasma. Se suele usar en combinación con otros fijadores. Ejemplos: BOUIN, FFA



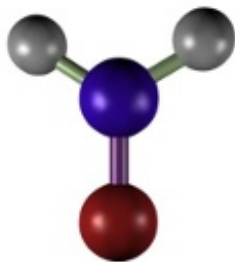
Ácido acético: CH₃COOH

Ácido pícrico. La fijación la produce porque las sales del tipo picrato coagulan las proteínas de los tejidos. Se suele usar del 2 al 15 % de una solución saturada de ácido pícrico. Preserva bien la estructura celular, no produce retracciones cuando el tiempo de fijación es óptimo, preserva bien glucógeno y lípidos. Es un buen fijador para tinciones generales puesto que tiene efecto mordiente y favorece la unión de los colorantes. Hay que eliminarlo completamente antes de proceder a la inclusión en ceras como la parafina puesto que dificulta la penetración de la parafina. Se suele usar combinado con otros fijadores. Ejemplos: BOUIN

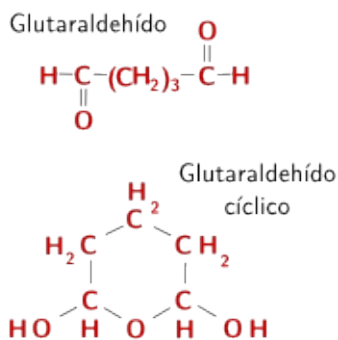


Ácido pícrico: C₆H₂OH(NO₂)₃

Formaldehído. Actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Se utiliza a concentraciones próximas al 4 %. Es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es un buen fijador para lípidos, es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, incluidas las de inmunocitoquímica e hibridación de ácidos ribonucleicos. Normalmente se usa en solución tamponada e isotónica. Actualmente se prepara a partir de paraformaldehído, sustancia sólida. Ejemplos: BOUIN, FFA, PLP.

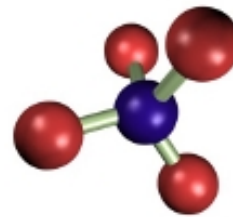
Formaldehído: CH₂=O.

Glutaraldehído. Forma puentes entre las moléculas de los tejidos. Se usa a una proporción de entre el 0,5 y el 3 %. Tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular, por lo que es el fijador de referencia para observación de ultraestructuras celulares con el microscopio electrónico. Pero hay que tener cuidado con su baja penetración tisular y puede producir retracciones. Se usa en soluciones tamponadas isotónicas.



Glutaraldehído.

Tetróxido de osmio. Forma puentes entre moléculas. Se emplea al 1 % en soluciones tamponadas. Es buen fijador de la ultraestructura de la célula por lo que se emplea habitualmente para las observaciones con el microscopio electrónico. Es un buen fijador para grasas y membranas celulares. Por su fuerte carácter oxidante no se usa para tinciones convencionales, excepto para las impregnaciones argentícas como el método de Golgi.

Tetróxido de osmio. OsO₄.

Mezclas fijadoras

La mayor parte de los procesos de fijación usan varias sustancias fijadoras, bien mezcladas en la solución acuosa inicial o utilizadas sucesivamente en el tiempo. Con ello se aprovechan las ventajas de cada una de ellas y se pueden contrarrestar sus desventajas. Hay multitud de formas de usar los diferentes fijadores, tanto en sus componentes como en las proporciones de éstos, dependiendo de las necesidades posteriores, es decir, qué tipo de tejido queremos fijar y qué queremos ver de dicho tejido. A continuación vamos a mencionar algunas combinaciones usadas frecuentemente porque tienen unas propiedades de fijación que las hace apropiadas para la observación de una gran variedad de tejidos y para el uso diversas de técnicas de tinción.

Líquido de Bouin. Está formado por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial. Es una solución muy utilizada para el procesamiento de tejidos que se incluirán en parafina (ver capítulo de inclusión) y a cuyas secciones se le pueden aplicar un amplio espectro de tinciones.

Es muy útil para tejidos blandos y embriones, y preserva bien el núcleo y el glucógeno. Hay que tener cuidado con el tiempo de fijación, que no debe exceder de 48 h en el caso de fijaciones por inmersión. Tras la fijación las muestras de tejido se pueden conservar en alcohol de 70°. No está recomendado para el riñón ni para el estudio de mitocondrias. Antes de la inclusión en parafina es conveniente eliminar el ácido pícrico mediante lavados en alcohol de 70° porque impedir una buena inclusión o que las tinciones no sean adecuadas.

Carnoy. Es un buen fijador para el glucógeno, para los hidratos de carbono simples y para las proteínas fibrosas. Es bueno para visualizar los ácidos nucleicos, aunque no la morfología nuclear, y para los grumos de Nissl del sistema nervioso. Puede producir retracciones tisulares. Está formado por etanol absoluto 60 %, cloroformo 30 % y ácido acético glacial 10 %.

Mezclas con formaldehído. El formaldehído es quizá el fijador más usado hoy en día, tanto para técnicas histológicas rutinarias como para otras como la inmunocitoquímica o la hibridación de ácidos nucleicos. Lo más frecuente es utilizarlo en solución al 4 % junto con otros fijadores. Se suele disolver en soluciones tamponadas que tienen una osmolaridad similar a la del tejido que

se pretende fijar. Para fijaciones de tejidos destinados a microscopía electrónica se suelen utilizar soluciones fijadoras que contienen formaldehído y glutaraldehído. La función del formaldehído es iniciar una fijación rápida, por su mayor capacidad de penetración, mientras que el glutaraldehído realizará una fijación más poderosa, pero más lenta que no afectará a la estructura tisular puesto que el formaldehído ya ha realizado una fijación previa.

Glutaraldehído-tetróxido de osmio. Los fijadores en combinación no tienen necesariamente que usarse al mismo tiempo. Es habitual que los tejidos destinados a microscopía electrónica sean inicialmente fijados en glutaraldehído (1 al 3 %) y paraformaldehído (2 al 4 %), para posteriormente ser postfijados en tetróxido de osmio al 1 % en solución tamponada. Este último es un buen preservador de la ultraestructura celular, sobre todo membranas, en cooperación con los aldehídos. Esto es importante porque el proceso para microscopía electrónica supone incubar el tejido en solventes orgánicos y polimerización de resinas a 60 °C, durante las cuales el tejido debe ser preservado.