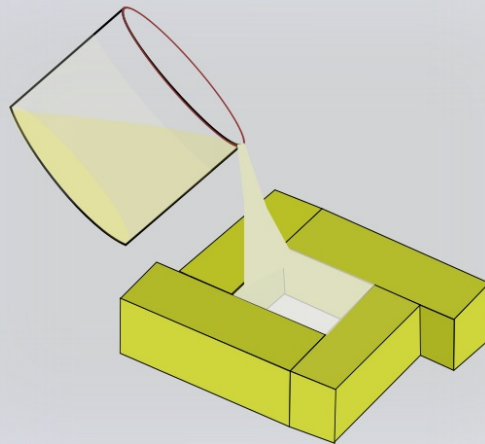


ATLAS de HISTOLOGÍA VEGETAL y ANIMAL

Técnicas histológicas

INCLUSIÓN



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
Inclusión	7
Inclusión en parafina	9
Inclusión en resina	11

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.

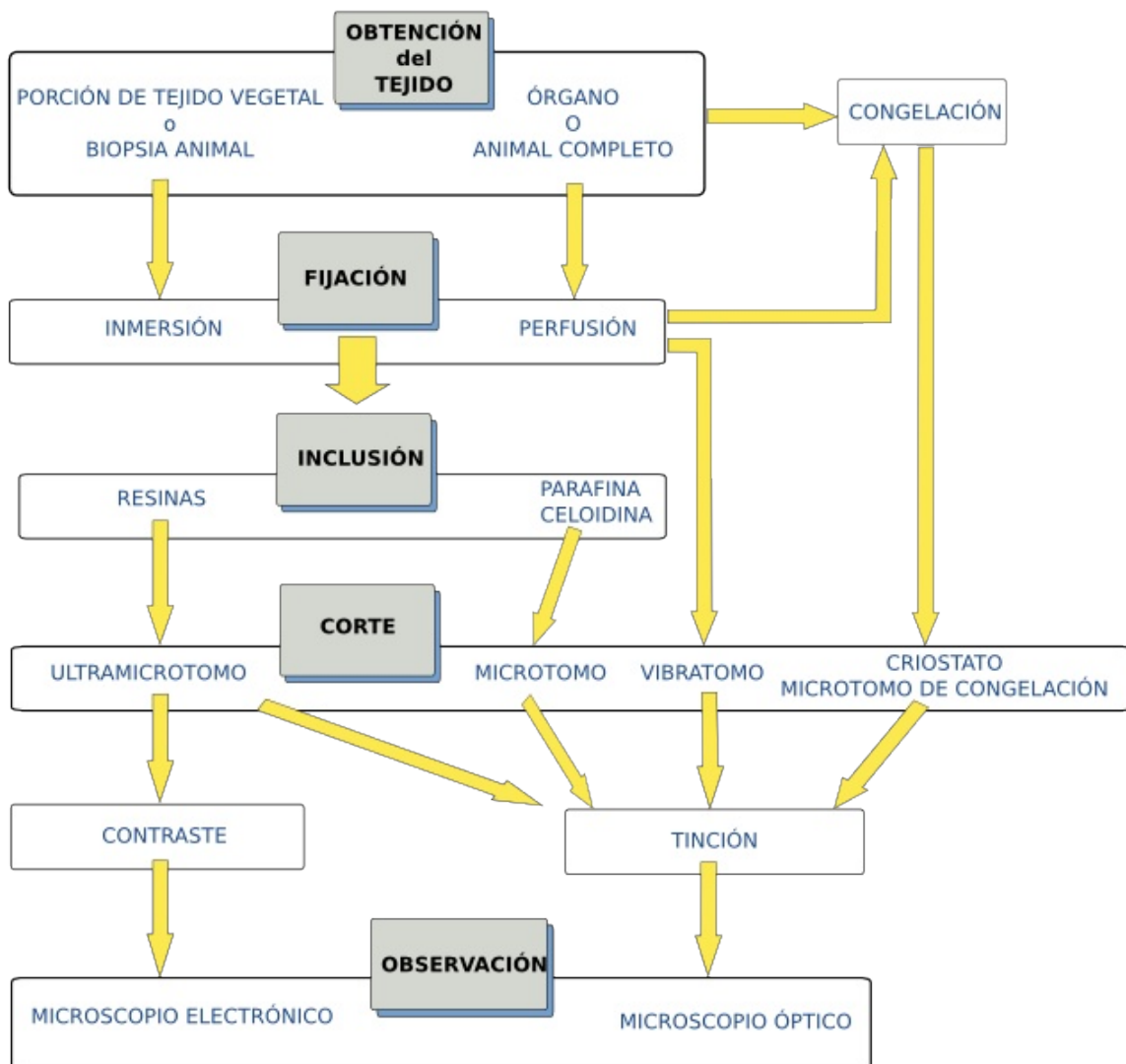
Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales,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

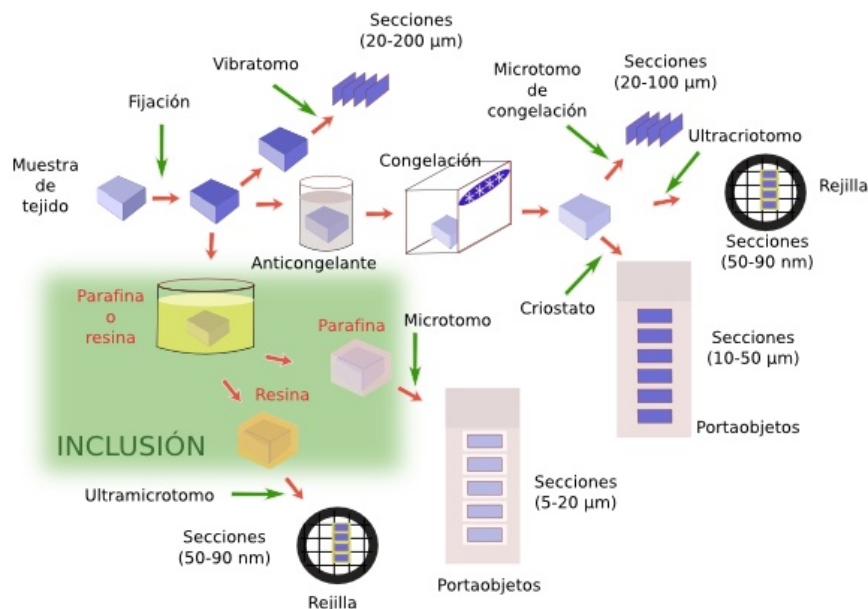
Como dijimos al comienzo existen múltiples variaciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. En las siguientes páginas veremos con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

Inlusión

Una vez fijado el tejido tenemos que procesarlo para su observación con el microscopio. Ello implica hacer secciones para teñirlas primero y posteriormente observarlas. Como regla general se procede al endurecimiento de la muestra para poder obtener dichas secciones ya que lo normal es que cuanto más delgada queramos una sección más consistente debe ser la muestra de la que se obtiene. Los tejidos se endurecen a consecuencia de la fijación, pero esta dureza no es muy alta e impide la obtención de cortes generalmente más delgados que 20 o 30 μm . Sólo en el caso de que queramos trabajar con secciones relativamente gruesas (entre 30 y 200 μm) se puede aprovechar el endurecimiento provocado por el fijador y obtener dichas secciones con el vibratomo \star . Este tipo de aparato se utiliza en ciertas técnicas donde es necesaria una buena preservación molecular. Sin embargo, en muchos casos necesitamos endurecer más el tejido para obtener secciones más finas, lo cual se puede hacer de

dos formas: por congelación o por inclusión.

La congelación de los tejidos previamente fijados permite la obtención de secciones que pueden ir desde unas 50 μm hasta nm de grosor, para lo que se utilizan diferentes aparatos: microtomo de congelación \star para secciones de decenas de μm , criostato para secciones de entre 5 y 20 μm y ultracriostato para secciones ultrafinas del orden de nm. Para evitar los daños que se producen durante los procesos de congelación, como la formación de cristales de hielo que nos agujerean los tejidos, se pueden usar: a) Anticongelantes que impidan la formación de cristales. El crioprotector más usado es la sacarosa al 30 %, aunque también se usa el dimetil sulfóxido, el glicerol, etilén glicol y otros. La elección de uno u otro depende del tipo de muestra y de la técnica que se vaya a usar. b) Una congelación lo más rápida posible, por ejemplo, con nitrógeno líquido. Cuanto más rápida es la congelación menores son las dimensiones de los cristales de agua formados.



Se pueden obtener secciones de grosor variable utilizando diferentes métodos. Secciones más finas se obtienen endureciendo más el tejido. Esto se puede conseguir mediante la congelación o embebiendo el tejido en sustancias que solidifican como la parafina o ciertas resinas. Téngase en cuenta que las dimensiones de los cortes y objetos que se muestran en este dibujo no están a escala. Una rejilla es mucho más pequeña que un portaobjetos. Las dimensiones en μm y nm se refieren al espesor de las secciones.

La inclusión es el método más común de endurecer el tejido y consiste en infiltrar la muestra con sustancias líquidas que tras un proceso de polimerización o enfriamiento se solidifican, sin afectar a las características del tejido. Con ello se consigue obtener cortes del orden de μm a nm , según el medio de inclusión, sin que el tejido se rompa o se deteriore. Además, son un buen método para preservar las muestras durante largos periodos de tiempo. Existen diferentes sustancias o medios de inclusión dependiendo del grosor del corte y de la técnica que necesitemos realizar. Cuando se quieren hacer secciones para su observación con el microscopio óptico los medios de inclusión

más frecuentemente usados son la parafina o la celoidina, mientras que si vamos a realizar observaciones con el microscopio electrónico☆ la inclusión se realiza con resinas☆, principalmente de tipo acrílicas o epoxy. La mayoría de estas sustancias no son hidrosolubles, es decir, no son miscibles con el agua, luego si queremos que la sustancia en la que vamos a incluir ocupe todo el tejido tenemos que eliminar el agua y sustituirla por un líquido miscible con dicha sustancia. Si una muestra no está completamente embebida en el medio de inclusión se deteriorará y la obtención de secciones homogéneas será imposible.

Inclusión en parafina

Para la inclusión de muestras que han de observarse con el microscopio óptico se utiliza sobre todo la parafina, y en menor medida la celoidina, como medio de inclusión. Vamos a describir los pasos para la inclusión en parafina de muestras de tejido previamente fijadas.

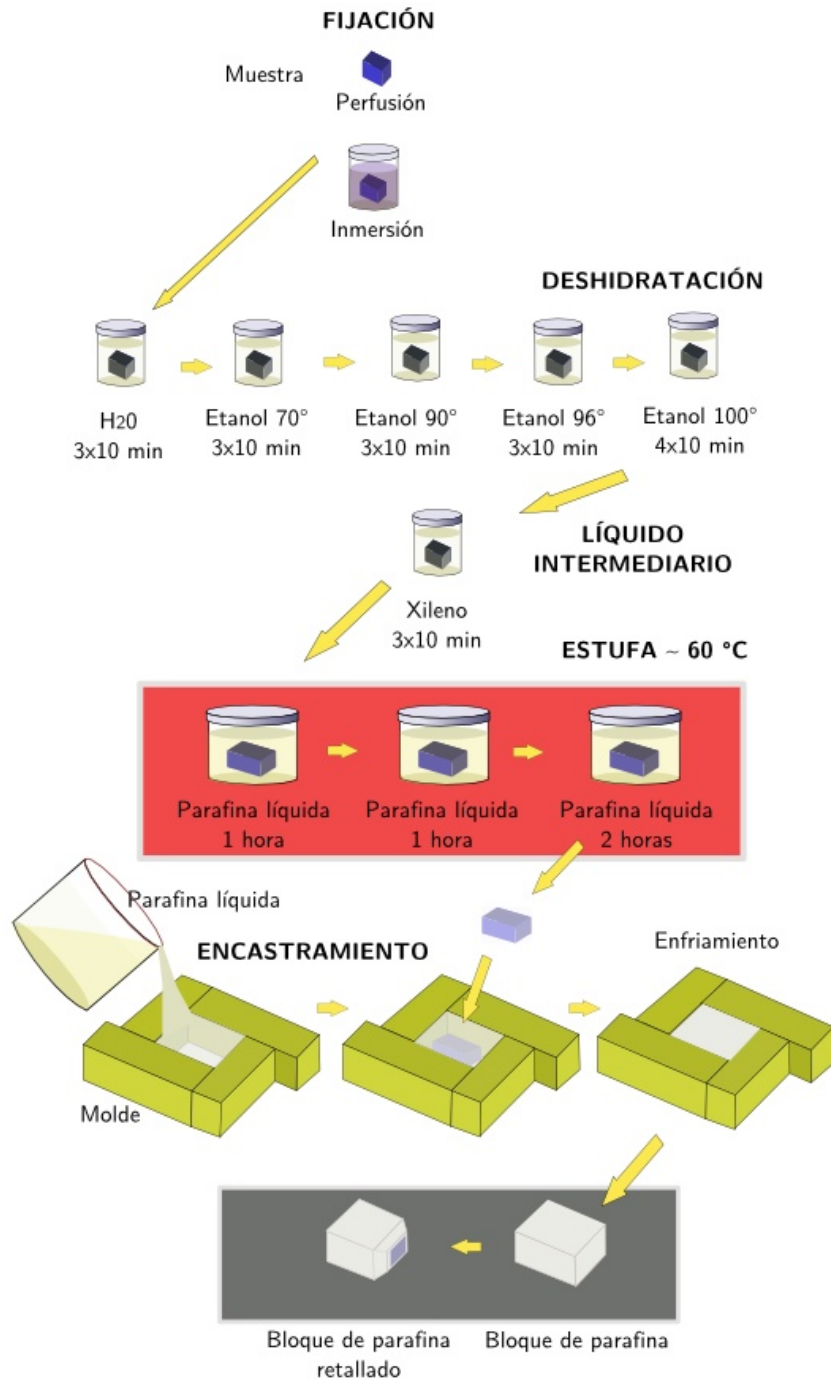
La parafina es una sustancia de aspecto ceroso que está formada por mezclas de hidrocarburos saturados. A temperatura ambiente es sólida y su punto de fusión puede variar entre 40 °C y 70 °C según la composición de la mezcla de hidrocarburos. Así, parafinas más duras a temperatura ambiente tienen un punto de fusión mayor, mientras que las más blandas uno menor. Es recomendable una dureza mayor para incluir muestras más duras. Las parafinas más usadas tienen un punto de fusión en torno a los 60 °C. Podemos también modificar las características de las parafinas añadiendo sustancias para variar su dureza, viscosidad, fragilidad, etcétera.

La parafina no es miscible con agua, mientras que todos los tejidos están formados principalmente por agua. Además, la mayoría de los fijadores son soluciones acuosas. Esto implica que para que la parafina líquida pueda penetrar completamente en el tejido ha de sustituirse el agua por un solvente orgánico. Esto se consigue mediante la deshidratación del tejido en alcoholes, normalmente etanol, de gradación creciente hasta alcohol de 100°. Posteriormente se transfiere el tejido a un líquido que es miscible

tanto con el alcohol de 100° como con la parafina, denominado sustancia intermediaria, como es el benceno, xileno, tolueno o el óxido de propileno, entre otros. Estas sustancias son normalmente aclarantes por lo que comprobando la translucidez de la pieza podemos cerciorarnos de la penetración de la sustancia intermediaria en el tejido. El tiempo de incubación de la pieza en algunos de estos líquidos intermediarios como el tolueno o xileno no debe ser excesivo puesto que estas sustancias endurecen la pieza y crean problemas al hacer las secciones.

Por último se pasa el tejido a parafina previamente licuada en una estufa regulada a la temperatura apropiada para dicho tipo de parafina. Se dan tres pasos por parafina líquida para favorecer una completa sustitución del líquido intermediario por la parafina. El tiempo que dura dichos pasos depende de lo volátil que sea el líquido intermediario y lo grande que sea nuestra pieza. Será mayor cuanto menos volátil es el líquido intermediario o mayor sea la muestra de tejido. Hay que tener en cuenta que un tiempo excesivo en parafina puede endurecer el tejido. Tras el embebimiento completo de la muestra se vierte parafina líquida en un molde, se introduce la muestra y se coloca según la orientación deseada de corte y se deja solidificar a temperatura ambiente.

Un protocolo común de inclusión en parafina es el siguiente:



Esquema de la inclusión en parafina de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra, tipo de tejido o, por ejemplo, el líquido intermediario. Sin embargo, los pasos son comunes a cualquier inclusión en parafina.

Inclusión en resina

Para la observación de la ultraestructura celular es necesario hacer secciones de tejido muy delgadas, del orden de nanómetros, denominadas ultrafinas, y usar un microscopio electrónico de transmisión. La obtención de secciones ultrafinas implica que tenemos que endurecer enormemente el tejido. Esto se puede conseguir mediante congelación, obteniendo entonces las secciones con un ultracriotomo. Sin embargo, lo más frecuente es incluir el tejido en un material de alta dureza como son las resinas de tipo epoxy, y en menor medida las resinas acrílicas como el metacrilato. Ambas se infiltran en el tejido en forma líquida y posteriormente polimerizan sin afectar a la ultraestructura celular.

El procedimiento estándar de inclusión en resinas tipo epoxy es similar al descrito para la parafina con algunas modificaciones. Así, los pasos que se siguen son fijación de las muestras, por inmersión o perfusión, deshidratación, líquido intermediario, infiltración y polimerización en el medio de inclusión. Algunos medios de inclusión de tipo acrílico, por ejemplo la resina LR white, son parcialmente miscibles con el agua por lo que no es necesario deshidratar completamente la muestra o el líquido intermediario, y además polimerizan con luz ultravioleta a bajas temperaturas. Estos medios son buenos para estudios citoquímicos.

En las inclusiones en resinas tipo epoxy, normalmente para muestras que se observarán en el microscopio electrónico, se suelen seguir las siguientes recomendaciones:

a) Las soluciones fijadoras suelen contener glutaraldehído y es necesaria una postfijación posterior en tetróxido de osmio. Con ello nos aseguramos una fuerte fijación para preservar la

ultraestructura celular y que no perderemos los lípidos que forman las membranas celulares durante el proceso de inclusión, gracias al tetróxido de osmio.

b) Partimos de tamaños de muestras mucho más pequeñas, de unos pocos milímetros, puesto que no nos interesa ver la organización general del tejido sino detalles del mismo. Si queremos observar zonas diferentes de un órgano es conveniente hacer bloques de muestra pequeños e independientes de cada una de ellas.

c) Las resinas más comúnmente usadas para la inclusión no son hidrosolubles, por lo que tenemos que sustituir el agua del tejido por un solvente orgánico que sea miscible con la resina. Para ello se deshidrata el tejido mediante incubaciones sucesivas en gradaciones crecientes de etanol o acetona. Como líquido intermediario entre la acetona pura o el etanol de 100° y las resinas se suele utilizar el óxido de propileno.

d) El endurecimiento del medio de inclusión, la resina, no es por enfriamiento sino por polimerización, normalmente a 60 °C.

e) Al medio de inclusión, la resina, se le añaden aceleradores y plastificantes que regulan las características de la polimerización y la dureza de la resina polimerizada. Las resinas tipo epoxy son las más usadas puesto que aportan una mayor homogeneidad en la polimerización y más facilidad a la hora de obtener secciones regulares. Por el contrario las resinas acrílicas presentan algunos inconvenientes y hay que ser muy cuidadosos a la hora de elegir las condiciones de polimerización, obtención y tratamiento de los cortes ultrafinos.

A continuación se muestra un proceso de inclusión habitual en resinas de tipo epoxy.



Esquema de la inclusión en resina de tipo epoxy de una muestra de tejido previamente fijada. Los tiempos de incubación en cada sustancia pueden variar en función del tamaño de la muestra o tipo de tejido.