

# **TEMA 1**

# **INTRODUCCIÓN A LA HISTOLOGÍA**

## **DEFINICIÓN DE HISTOLOGÍA**

## **CONCEPTOS BÁSICOS**

## **TIPOS DE TEJIDOS BÁSICOS**

## **TÉCNICAS HISTOLÓGICAS BÁSICAS**

- 1.- Para microscopía óptica
- 2.- Para microscopía electrónica de transmisión
- 3.- Para microscopía electrónica de barrido

## DEFINICIÓN DE HISTOLOGÍA

---

La ANATOMÍA es la rama de la ciencia que se ocupa del estudio de la forma externa y la organización interna de las plantas y los animales. La Anatomía suele ser dividida, según el método seguido para poner de manifiesto las estructuras que configuran un ser vivo, en:

1. ANATOMÍA MACROSCÓPICA: abarca lo accesible a la disección y a la observación ocular directa
2. ANATOMÍA MICROSCÓPICA: abarca a los elementos que se escapan a la observación ocular directa.  
Anatomía microscópica es sinónima de **HISTOLOGÍA**

La **HISTOLOGÍA** es la disciplina que estudia la organización microscópica de los seres vivos y la manera de interrelacionarse estructural y funcionalmente sus componentes individuales. Etimológicamente se define a la Histología como la disciplina que se ocupa del estudio de los tejidos.

En el siglo XVII aparecieron los primeros microscopios y se fueron acumulando datos a lo largo de los dos siguientes siglos, pero la HISTOLOGÍA alcanzó el rango de rama autónoma de la ciencia en el s. XIX al formularse la TEORÍA CELULAR (Schleiden, Schwann) que considera a las células como organismos potencialmente independientes y a los seres vivos como agregados de estas unidades vivas, distribuidas y ordenadas de acuerdo a leyes fijas. Esta generalización básica en las ciencias morfológicas se vio enriquecida con dos hechos: 1) el descubrimiento de que las células se forman por división de otras células (Virchow, Remack: "omnis cellula e cellula"), y 2) la generalización de la teoría celular a la patología pues los procesos patológicos también se corresponden con alteraciones celulares (Virchow).

La aparición en la década de los años 30 del presente siglo del microscopio electrónico y la aparición de diversas técnicas histológicas que pueden poner de manifiesto la presencia de compuestos químicos en relación con las estructuras en las que se localizan ha hecho que el campo de la Histología se amplíe considerablemente.

## CONCEPTOS BÁSICOS

---

Un **TEJIDO** es un conjunto de células que tienen características estructurales y funcionales similares y que se organizan de una forma específica. Hay dos tipos de tejidos:

- **tejidos simples** formados por un solo tipo de células (tejido adiposo = adipocitos; tejido muscular = miocitos)
- **tejidos compuestos** formados por varios tipos diferentes de células (tejido nervioso = neuronas, células gliales, células inmunitarias, células epiteliales; tejido conectivo = fibroblastos, macrófagos, leucocitos...)

Estos tejidos (simples y compuestos) son el objeto de estudio de la **HISTOLOGÍA GENERAL**.

Un **ÓRGANO** es una estructura, distinguible anatómicamente, formada por un grupo de tejidos diversos que cumplen con una función similar (corazón, riñón...).

Un **SISTEMA** está formado por:

- Un grupo de células con función similar pero distribuidas por diversas estructuras anatómicas (sistema inmunitario)
- Un grupo de órganos que tienen funciones similares o relacionadas (sistema digestivo, sistema circulatorio...)

La estructura microscópica de órganos y sistemas es el objeto de estudio de la **HISTOLOGÍA ESPECIAL** o **ANATOMÍA MICROSCÓPICA**

## TIPOS DE TEJIDOS BÁSICOS

En los tratados clásicos de Histología se consideran cinco tipos básicos de tejidos:

- 1.- TEJIDO EPITELIAL
- 2.- TEJIDO CONECTIVO
- 3.- TEJIDO MUSCULAR
- 4.- SANGRE
- 5.- TEJIDO NERVIOSO

En algunos tratados nuevos de Histología (ver Stevens-Lowe, 1997) se atiende a otros criterios de clasificación surgidos del auge en los últimos años de la Biología celular. En este caso se toma en consideración las características de las células y se agrupan aquellas que tienen características estructurales y funcionales similares: células contráctiles, células secretoras, células defensivas o del sistema inmunitario, células nerviosas...

## TÉCNICAS HISTOLÓGICAS BÁSICAS

### 1.- PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

#### 1.1. Seleccionar la muestra a estudiar

#### 1.2. Fijación de la muestra

La fijación de la muestra tiene un doble objeto:

- Que los tejidos se preserven lo más parecido posible a su estado "in vivo"
- Que aumente la dureza de la muestra, lo que facilitará su posterior corte en cortes delgados

El fijador más usado es una solución acuosa de **formaldehído al 5%**. También se pueden usar otros fijadores (alcohol, ácido pícrico...). Los fijadores hacen que precipiten las proteínas tisulares.

#### 1.3. Inclusión en parafina

- La inclusión en parafina tiene como objeto el conseguir que la **muestra tenga una dureza suficiente y homogénea** para poder obtener cortes delgados de la misma.
- Como la parafina es un producto inmiscible con el agua hay que deshidratar la muestra antes de incluirla en la parafina. La **deshidratación de la muestra** se consigue haciéndola pasar por alcoholes de gradación progresivamente creciente (alcohol 50%-70%-96%-alcohol absoluto).
- Después de hacer pasar a la muestra por algún solvente intermedio (benzol...) se introduce la muestra en un recipiente con parafina líquida durante varias horas-días (la parafina se mantiene líquida en un estufa a temperatura superior a la del punto de fusión de la parafina) hasta que la parafina ha embebido perfectamente la muestra. Finalmente, en un molde, **se hace un bloque** de parafina que contenga la muestra y se deja solidificar la parafina a temperatura ambiente.
- En algunas ocasiones no es posible hacer la inclusión en parafina porque el proceso previo de deshidratación disuelve algunos productos celulares que se quieren estudiar (por ejemplo los lípidos, que se disuelven con los alcoholes durante el proceso de deshidratación, algunas proteínas concretas que se quieren poner de manifiesto con alguna técnica inmunocitoquímica). En ese caso se pueden hacer cortes delgados endureciendo la muestra (fijada o incluso antes de la fijación) por congelación.

#### 1.4. Corte de la muestra

El bloque de parafina con la muestra dentro se puede cortar en secciones delgadas (habitualmente de **5-10 µm de grosor**) con un microtomo convencional (o con un microtomo de congelación o con un criotomo en el caso de que se haya congelado la pieza). Los cortes obtenidos se colocan sobre un portaobjetos de cristal para seguir el proceso de tinción.

#### 1.5. Tinción de los cortes

- Los diversos componentes tisulares tienen unos índices de refracción tan similares entre sí que no se podrían distinguir unos de otros si no se usaran colorantes que tiñen unos u otros componentes según su composición química.
- Como los colorantes suelen usarse disueltos en agua (y la parafina que embebe los cortes es inmisible con el agua) hay que **desparafinizar** (poniendo los portas en xilol) y **rehidratar** los cortes (haciendo pasar los portas por alcoholes de gradación progresivamente inferior: alcohol absoluto-alcohol 90%-alcohol 70%-alcohol 50%-agua).
- Después de la rehidratación **se tiñen los cortes con el colorante o la mezcla de colorantes** adecuados:
  - **Hematoxilina-eosina**: la hematoxilina (un colorante básico) tiñe de *color azul-violeta* las estructuras ácidas (núcleo, ribosomas, RER) y la eosina (un colorante ácido) tiñe de *color rosa-rojo* las estructuras básicas (la mayoría de las proteínas citoplasmáticas, mitocondrias). En general, con esta tinción se ven los núcleos de las células en azul y el citoplasma en rosa. Las fibras de colágena de la matriz extracelular se tiñen de rosa.
  - **Azan (AZocarmín + ANiline blue)** con esta técnica se tiñe de *color rojo* los núcleos celulares, de *color rosa* el citoplasma celular y de *color azul* las fibras de colágena. El músculo y los hematíes se tiñen de color rojo-naranja.
  - **Tricómico de Mallory**: esta técnica utiliza la fucsina ácida que tiñe de rosa el citoplasma y de rojo el núcleo celular, el azul de anilina que tiñe de azul las fibras de colágena y el naranja G que tiñe de color naranja los eritrocitos.
  - **Van Gieson**: esta técnica tiñe de *color azul oscuro-negro* los núcleos celulares, de *color amarillo* el citoplasma celular (y los hematíes) y de *color rojo* las fibras de colágena.
  - **PAS (ácido peryódico - reactivo de Schiff [fucsina básica])**: esta técnica tiñe específicamente los carbohidratos complejos de las células de *color rojo oscuro* (glucógeno, mucoproteínas, proteoglicanos...). Estas técnicas que tiñen de forma específica algún compuesto químico de las células se les denomina técnicas de **tinción histoquímica**.
  - **Tinciones de lípidos**: para visualizar los depósitos de lípidos en las células (adipocitos u otras) o las estructuras celulares muy ricas en lípidos (como la mielina) se utilizan colorantes como el Sudan o el tetróxido de osmio.
  - **Tinciones argénticas**: las tinciones argénticas son utilizadas para ver fibras de colágena finas (fibras de reticulina) o células con prolongaciones celulares finas ricas en elementos del citoesqueleto (dendritas y axones neuronales...). Suelen dar un *color negro o marrón oscuro* y el fondo de la preparación puede verse dorado.
  - **Inmunocitoquímica**: con las técnicas inmunocitoquímicas (una variedad de técnicas de tinción histoquímica) se puede poner de manifiesto un compuesto químico determinado en una muestra histológica usando **anticuerpos específicos** contra ese compuesto que han sido marcados con una sustancia fluorescente o con un producto que se puede convertir en un colorante (cromógeno) con la técnica histoquímica adecuada. Si se usan AC marcados con sustancias fluorescentes hay que utilizar un **microscopio de fluorescencia** para observar los preparados.
- Después de teñir los cortes **se aclara el exceso de colorantes** que quede sin fijar en los tejidos y **se vuelven a deshidratar los cortes**.

### 1.6. Montaje de los cortes

Antes de observar los cortes al microscopio hay que **cubrirlos con un cubreobjetos** de cristal. Para conseguir que todos los elementos (portaobjetos-preparación-cubreobjetos) sean ópticamente homogéneos hay que cubrir el corte con una resina (DPX, Permount...) antes de poner el cubreobjetos y procurar que no queden burbujas de aire al colocar éste.

Una vez que la resina se ha polimerizado ya se puede **examinar la preparación** con el microscopio.

La capacidad de resolución de un microscopio está limitada fundamentalmente por la longitud de onda de la radiación utilizada. En el microscopio óptico se utiliza luz visible (el espectro de la luz visible va de 400 nm a 700 nm). Aunque según la longitud de onda de la luz visible la capacidad de resolución sería de 0.4  $\mu\text{m}$ , la apertura numérica de los objetivos de gran calidad (n.a. = 1.4) hace que pueda aproximarse a los 0.2  $\mu\text{m}$ . En la práctica, los microscopios ópticos pueden distinguir elementos de aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  (mitocondrias, bacterias...) [**capacidad de resolución de un microscopio**: la distancia mínima que debe separar a dos objetos para que sean vistos con el microscopio como dos objetos diferentes]

Cuando se necesita una capacidad de resolución superior, hay que iluminar el objeto a estudiar con una radiación que tenga una longitud de onda inferior a los 0.4  $\mu\text{m}$  de la luz visible. Esto se consigue con los microscopios electrónicos "iluminando" las preparaciones con un rayo de electrones que tiene una longitud de onda variable: cuanto mayor es la velocidad a la que circulan los electrones, menor es su longitud de onda. El rayo de electrones se genera en un cátodo y su velocidad es proporcional al voltaje de la corriente eléctrica aplicada. Así se puede conseguir una resolución de 0.002 nm, pero en la práctica los microscopios electrónicos consiguen resoluciones de 0.2 nm

## 2.- PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Los pasos a seguir para obtener los cortes de una muestra histológica que han de estudiarse con el microscopio electrónico son similares a los seguidos anteriormente, aunque hay diferencias que se señalan a continuación.

### 1.1. Seleccionar la muestra a estudiar

Los bloques de tejido se hacen mucho más pequeños para permitir que la fijación sea rápida y que se puedan hacer cortes muy finos

### 1.2. Fijación de la muestra

- Los pequeños bloques de tejido se sumergen en una **solución tamponada de glutaraldehído** al 2.5-5% (o en una solución tamponada de glutaraldehído y paraformaldehído) porque el glutaraldehído preserva mejor la estructura de los componentes tisulares. En muchas ocasiones la solución fijadora se perfunde por vía vascular al animal de experimentación vivo y anestesiado porque así se consigue una fijación mejor al llegar el fijador a los tejidos todavía vivos.
- Después de lavar los bloques con tampón, habitualmente se hace una **postfijación en tetróxido de osmio** que, además de fijar los tejidos, contrasta las estructuras tisulares por la apetencia que tienen los lípidos por el osmio.

### 1.3. Inclusión en resinas sintéticas (Epon, Araldit,...)

Para conseguir que las resinas infiltren la muestra se hacen varios pasos previos:

- Se lava el exceso de fijador con una solución tampón
- Se contrasta la muestra "en bloque" (con acetato de uranilo, por ej.)
- Se deshidrata con concentraciones crecientes de alcohol o acetona hasta llegar al alcohol o a la acetona 100%
- Se pasa la muestra por un disolvente intermedio (óxido de propileno, por ej.)

- Infiltración del bloque en la resina artificial (se usa una mezcla 1:1 de resina y disolvente –óxido de propileno-) a temperatura ambiente
- Inclusión de la muestra en resina y polimerización de la resina a 60<sup>0</sup> C en una cápsula de gelatina o plástico. Cuando la resina ha polimerizado se saca de la cápsula el bloque de resina que contiene la muestra

#### 1.4. Corte de la muestra

El bloque de resina con la muestra se pone en un portabloques, se talla el exceso de resina que hay alrededor de la muestra (se hace una “pirámide”) y se hacen cortes con un ultramicrotomo que usa cuchillas de vidrio o de diamante.

- Se hacen cortes semifinos (de 0.5-2  $\mu\text{m}$  de grosor) que se tiñen con azul de toluidina y permiten explorar y controlar la zona que se quiere estudiar con el M.E.
- Se hacen cortes ultrafinos (de  $\cong$  50 nm de grosor y una anchura y longitud de 0.5-1 mm) que se recogen en una rejilla de cobre o níquel ( $\cong$  3 mm de diámetro)

#### 1.5. Contraste de los cortes

Antes de estudiar los cortes con el M.E. se “tiñen” (en realidad no se utiliza ningún colorante) o se contrastan los cortes ultrafinos con una solución tamponada de **citrato de plomo** (en ocasiones se hace en este momento el contraste con acetato de uranilo)

### 3.- PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido permite estudiar la superficie de muestras no cortadas, algo que no puede hacerse con el M. E. de transmisión porque los electrones atraviesan por completo el corte.

- La muestra a examinar se fija y se seca en un evaporador de vacío
- También en vacío, la **muestra se cubre con una fina capa de un metal pesado**: un filamento de platino u oro se calienta eléctricamente hasta que el metal se evapora y parte de él cae sobre la muestra formando una capa muy fina. Para estabilizar la capa de metal ésta se cubre con una capa de carbono evaporada de un electrodo de carbón adyacente
- En el interior del microscopio, un intenso **haz de electrones “barre” rápidamente la superficie de la muestra**: las moléculas de la muestra se excitan y liberan **electrones secundarios** que se concentran en un detector de centelleo.
- La señal resultante se muestra en un tubo de rayos catódicos: como el número de electrones secundarios producidos en cada punto de la muestra depende del ángulo de incidencia del haz de electrones en relación con la superficie, la imagen producida contiene zonas luminosas alternando con zonas sombreadas que dan una **apariencia tridimensional a la imagen**
- El inconveniente de esta técnica es que solo pueden examinarse las características superficiales de la muestra y que tiene una capacidad de resolución limitada por el grosor de la cubierta metálica ( $\cong$ 10 nm)