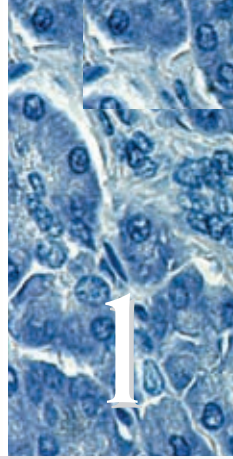


# Técnica histológica y microscopia



## ■ GENERALIDADES DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA | 1

### ■ PREPARACIÓN DEL TEJIDO | 2

Tinción con hematoxilina y eosina de muestras fijadas en formalina | 2

Otros fijadores | 3

Otras técnicas de tinción | 5

### ■ HISTOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA | 5

Composición química de las muestras histológicas | 5

Fundamentos químicos de la coloración | 6

*Colorantes ácidos y básicos* | 6

*Metacromasia* | 7

*Grupos aldehído y el reactivo de Schiff* | 7

Digestión enzimática | 8

Histoquímica enzimática | 9

Inmunocitoquímica | 9

Técnicas de hibridación | 12

Radioautografía | 13

### ■ MICROSCOPIA | 13

Microscopia óptica | 13

Examen de un preparado histológico con el microscopio óptico | 15

Otros sistemas ópticos | 19

Microscopia electrónica | 21

Microscopia de fuerza atómica | 24

**Recuadro 1.1** Correlación clínica: biopsias por congelación | 4

**Recuadro 1.2** Consideraciones funcionales: microespectrofotometría de Feulgen | 8

**Recuadro 1.3** Correlación clínica: anticuerpos monoclonales en medicina | 10

**Recuadro 1.4** Uso correcto del microscopio óptico | 16

**Recuadro 1.5** Consideraciones funcionales: desarrollo de la microscopia electrónica | 23

## ■ GENERALIDADES DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA

**El objetivo de un curso de histología es conducir al estudiante a comprender la microanatomía de las células, los tejidos y los órganos y a correlacionar la estructura con la función**

Las técnicas utilizadas por los histólogos son diversas en extremo. La mayor parte de los contenidos de un

curso de histología se puede formular en los términos de la microscopia óptica, que los estudiantes manejan en las prácticas de laboratorio, pero la interpretación más detallada de la microanatomía se fundamenta en la microscopia electrónica (ME), tanto con el microscopio electrónico de transmisión (MET) como con el microscopio electrónico de barrido (MEB). La ME, dado su aumento más útil y su resolución mayor, suele ser el último paso en la adquisición de datos al que se recurre entre las muchas técnicas auxiliares de la biología celular y molecular. Estas técnicas auxiliares incluyen:

- Histoquímica y citoquímica.
- Inmunocitoquímica y técnicas de hibridación.
- Radioautografía.
- Cultivo de tejidos y órganos.
- Separación de células y orgánulos por centrifugación diferencial.
- Microscopios y técnicas microscópicas especializadas.

Es posible que los estudiantes se sientan distantes de estas técnicas y procedimientos experimentales porque los programas actuales de la asignatura no suelen contemplar una experiencia directa con ellos. Sin embargo, es importante saber algo acerca de los procedimientos especializados y los datos que proporcionan. *En este capítulo se presenta un panorama general de estas técnicas y una explicación de la forma en que los datos aportados por ellas pueden ayudar al estudiante a comprender mejor la estructura y la función de las células, los tejidos y los órganos.*

Uno de los problemas que enfrentan los estudiantes en histología es comprender la naturaleza de la imagen bidimensional de un preparado histológico o una microfotografía electrónica y la forma en que esta se relaciona con la estructura tridimensional de la cual proviene. Para salvar esta brecha conceptual primero tenemos que presentar una breve descripción de las técnicas utilizadas para preparar los cortes histológicos tanto de la microscopía óptica como de la microscopía electrónica.

## ■ PREPARACIÓN DEL TEJIDO

### Tinción con hematoxilina y eosina de muestras fijadas en formalina

**El corte de rutina teñido con hematoxilina y eosina es la muestra que más frecuentemente se estudia**

La caja de preparados que se entrega a cada estudiante para que examine bajo el microscopio óptico contiene principalmente especímenes fijados en formalina, incluidos en parafina y coloreados con hematoxilina y eosina (H-E). Casi todas las microfotografías ópticas que se presentan en las secciones del atlas de este libro son de preparados de estas mismas cajas. Además, la mayoría de las microfotografías utilizadas para ilustrar tejidos y órganos en las clases teóricas de histología y en conferencias se obtienen de estos preparados. A veces se usan otras técnicas para demostrar componentes específicos de las células y los tejidos; varias de estas técnicas se describen más adelante.

**El primer paso en la preparación de una muestra de tejido u órgano es la fijación para conservar la estructura**

La *fijación*, en general obtenida mediante el empleo de sustancias químicas individuales o mezclas de estas

sustancias, conserva la estructura del tejido en forma permanente para permitir el tratamiento ulterior. Las muestras tienen que sumergirse en el fijador inmediatamente después de extraerse del organismo. La fijación se utiliza para:

- Abolir el metabolismo celular.
- Impedir la degradación enzimática de las células y los tejidos por autólisis (autodigestión).
- Destruir los microorganismos patógenos como las bacterias, los hongos o los virus.
- Endurecer el tejido como consecuencia de la formación de enlaces cruzados o la desnaturalización de las moléculas proteicas.

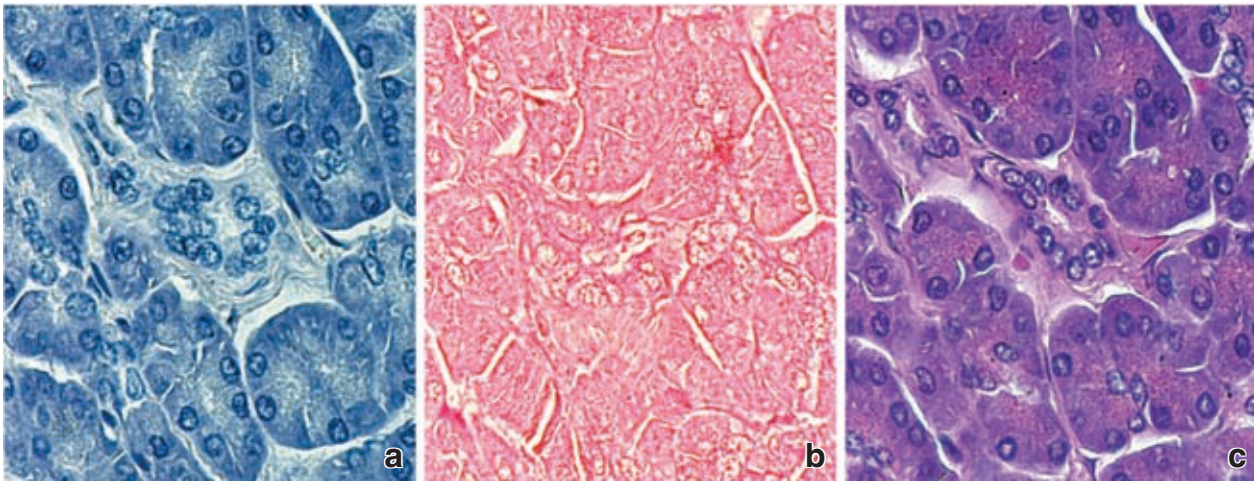
El fijador de uso más común es la *formalina*, una solución acuosa de formaldehído al 37%, en diluciones variadas y en combinación con otras sustancias químicas y amortiguadores (buffers). El formaldehído preserva la estructura general de la célula y de los componentes extracelulares al reaccionar con los grupos amino de las proteínas (con mucha frecuencia forma enlaces cruzados entre residuos de lisina). Dado que el formaldehído no altera en forma significativa su estructura tridimensional, las proteínas mantienen su capacidad de reaccionar con anticuerpos específicos. Esta propiedad es importante en los métodos de tinción inmunocitoquímica (véase p. 9). La solución comercial estándar de formaldehído amortiguado con fosfatos (pH 7) actúa con bastante lentitud pero penetra bien en el tejido. Sin embargo, el formaldehído no reacciona con los lípidos y, por lo tanto, es un mal fijador de las membranas.

**En el segundo paso la muestra se dispone para su inclusión en parafina con el fin de permitir su corte**

Para poder examinar la muestra hay que infiltrarla con un medio de *inclusión* que permita realizar cortes muy delgados, típicamente de 5 a 15  $\mu\text{m}$  (1 micrómetro [ $\mu\text{m}$ ] equivale a la milésima parte de un milímetro; véase *cuadro 1.1*). Luego de la fijación la muestra se *lava* y se *deshidrata* en una serie de soluciones alcohólicas de concentración creciente hasta alcanzar alcohol al 100%. En el paso siguiente, el *aclarado*, se utilizan solventes orgánicos como xileno o tolueno, que son miscibles tanto en alcohol como en *parafina*, para extraer

**CUADRO 1.1** Equivalencias en las medidas de longitud

1 picómetro	=	0,01 angstroms (Å)
1 angstrom	=	0,1 nanómetro (nm)
10 angstroms	=	1,0 nanómetro
1 nanómetro	=	1 000 picómetros
1 000 nanómetros	=	1,0 micrómetro ( $\mu\text{m}$ )
1 000 micrómetros	=	1,0 milímetro (mm)



**FIGURA 1.1. Coloración con hematoxilina y eosina (H-E).** Las tres imágenes que se presentan aquí corresponden a cortes de páncreas seriados (adyacentes) para demostrar el efecto de la hematoxilina y la eosina utilizadas solas o combinadas. **a.** En esta microfotografía se ve una coloración con hematoxilina sola. Si bien hay una tinción general de la muestra, los componentes y estructuras con gran afinidad por el colorante se tiñen con una intensidad mucho mayor, por ejemplo, DNA nuclear y RNA citoplasmático. **b.** De manera similar la eosina (colorante de contraste), cuando se usa sola, consigue una tinción general de los tejidos, como puede verse en esta microfotografía. Sin embargo, obsérvese que los núcleos son menos conspicuos que en la muestra teñida sólo con hematoxilina. Después de colorear la muestra con hematoxilina y de prepararla para su tinción con eosina en solución alcohólica, la hematoxilina que no estaba unida con firmeza se lava y entonces la eosina tiñe los componentes con los que tiene gran afinidad. **c.** En esta microfotografía pueden verse los efectos tintoriales combinados de ambos colorantes (H-E). 480 x.

el alcohol al 100% antes de la infiltración de la muestra con parafina fundida.

Cuando la parafina fundida se ha enfriado y endurecido se empareja para formar un bloque de tamaño adecuado. Este bloque, llamado taco, se coloca entonces en una máquina cortadora especial, el *micrótopo*, que lo corta en rebanadas finas con una cuchilla de acero. Luego los cortes obtenidos se montan sobre portaobjetos de vidrio a los que antes se les habrá añadido una pequeña cantidad de albúmina para que sirva de adhesivo.

### En el tercer paso, la muestra se tiñe para permitir su examen

Dado que los cortes en parafina son incoloros, la muestra todavía no está lista para su examen bajo el microscopio óptico. Para colorear o teñir los cortes histológicos la parafina debe disolverse y extraerse, de nuevo con xileno o tolueno, y los tejidos deben rehidratarse mediante el uso de una serie de alcoholes de concentración decreciente. Luego el tejido colocado sobre los portaobjetos se tiñe con *hematoxilina* en agua. Como el colorante de contraste, *eosina*, es más soluble en alcohol que en agua, se vuelve a deshidratar la muestra en soluciones alcohólicas de concentración creciente y después se tiñe con eosina en alcohol. Los resultados de la tinción con hematoxilina sola, con eosina sola y con ambos colorantes se muestran en la *figura 1.1*. Luego de la coloración la muestra se hace pasar por xileno o tolueno y se le coloca un medio de mon-

taje no acuoso antes de cubrirla con un cubreobjetos para lograr un preparado permanente.

## Otros fijadores

### La formalina no preserva todos los componentes de las células y los tejidos

Aunque los cortes de muestras fijadas en formalina teñidos con H-E son convenientes porque permiten ver bien las características estructurales generales, no son específicos para dilucidar la composición química de los elementos constitutivos de las células. Además, muchos componentes se pierden durante la preparación de la muestra. Para conservar estos componentes y estructuras hay que utilizar otros métodos de fijación. Estos métodos se fundamentan en un conocimiento sólido de la química. Por ejemplo, los alcoholes y los solventes orgánicos que se usan en los preparados de rutina diluyen los lípidos neutros.

Para conservar los lípidos neutros, como los de las células adiposas, deben utilizarse cortes por congelación de tejido fijado en formalina y colorantes que se disuelvan en las grasas; para conservar estructuras de la membrana hay que usar fijadores especiales con metales pesados, como permanganato y osmio, que se unan a los fosfolípidos. El empleo de rutina de tetróxido de osmio como fijador en la microscopía electrónica es la razón principal del excelente estado de conservación de las membranas en las microfotografías electrónicas.

**Recuadro 1.1 Correlación clínica: biopsias por congelación**

A veces el patólogo necesita evaluar de inmediato el tejido obtenido durante el acto quirúrgico, en especial cuando el diagnóstico anatomopatológico instantáneo puede determinar el paso siguiente en la cirugía. Hay varias indicaciones para realizar este tipo de evaluación, que se conoce como **biopsia por congelación**. Es muy frecuente que un cirujano solicite una biopsia por congelación en el quirófano cuando no cuenta con un diagnóstico preoperatorio o debe identificar hallazgos intraoperatorios inesperados. Además, es posible que el cirujano quiera saber si se ha extirpado toda la masa patológica dentro del límite del tejido sano y si el borde de la resección quirúrgica está libre de tejido enfermo. Las biopsias por congelación también se realizan en combinación con otros procedimientos, como la endoscopia o la biopsia con aguja fina, para confirmar si el material biopsico obtenido será útil en estudios anatomopatológicos adicionales.

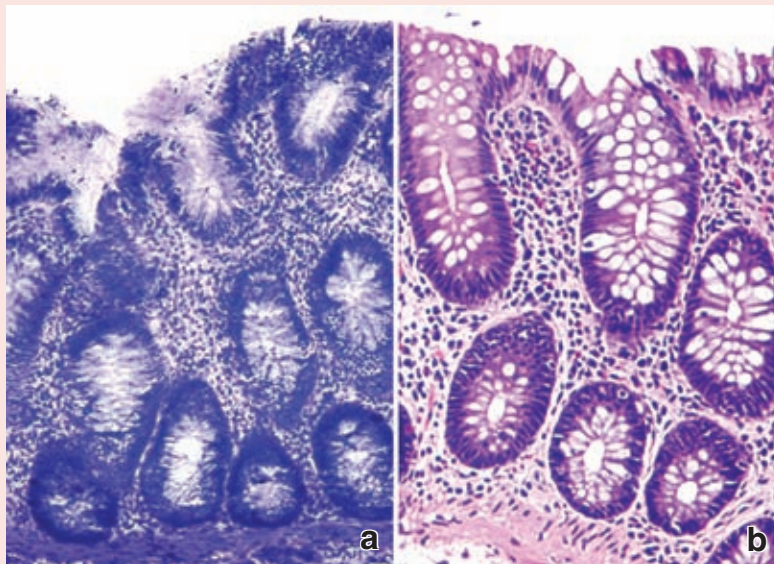
Para realizar una biopsia por congelación se siguen tres pasos principales:

- **Congelación de la muestra de tejido.** Se congelan muestras de tejido de tamaño pequeño mediante el uso de anhídrido carbónico comprimido o la inmersión en un líquido frío (isopentano) a una temperatura de

$-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El congelamiento, que puede lograrse en una cámara refrigeradora muy eficiente, endurece el tejido y permite el corte con un micrótopo.

- **Corte del tejido congelado.** El corte suele realizarse dentro de un crióstato, una cámara refrigerada que contiene un micrótopo. Dado que el tejido está congelado y duro, puede cortarse en rebanadas muy finas (5 a  $10\text{ }\mu\text{m}$ ). Luego los cortes se montan sobre un portaobjetos de vidrio.
- **Tinción de los cortes.** La tinción se realiza para diferenciar los núcleos celulares del resto de las estructuras del tejido. Los tinciones de uso más frecuente para las biopsias por congelación son H-E, azul de metileno (fig. 1.2) y PAS.

Todo el proceso de preparación y evaluación de las biopsias por congelación puede tardar unos 10 minutos en completarse. El tiempo total que transcurre hasta la obtención de resultados depende sobre todo del tiempo de transporte del tejido desde el quirófano hasta el laboratorio de anatomopatología, de la técnica histopatológica utilizada y de la experiencia del patólogo. Los hallazgos se comunican directamente al cirujano que está esperando en el quirófano.



**FIGURA 1.2. Evaluación de una muestra obtenida durante el acto quirúrgico y preparada mediante la técnica de congelación.** **a.** En esta microfotografía se ve una muestra obtenida del intestino grueso que se preparó mediante la técnica de congelación y se tiñó con azul de metileno (biopsia por congelación).  $160\times$ . **b.** Parte de la muestra se fijó en formalina y se procesó con una técnica de rutina que comprende la coloración con H-E (biopsia diferida). El examen de la biopsia por congelación permitió comprobar que el tejido era normal. El diagnóstico se confirmó después mediante el examen del preparado de rutina teñido con H-E.  $180\times$ . (Gentileza del Dr. Daniel W. Visscher.)



## Otras técnicas de tinción

### La hematoxilina y la eosina se utilizan en histología principalmente para poner en evidencia las características estructurales

A pesar de los méritos de la tinción con H-E, este procedimiento no permite ver en forma adecuada ciertos componentes estructurales de los cortes histológicos, a saber, elastina, fibras reticulares, membranas basales y lípidos. Cuando se desea estudiar estos componentes pueden utilizarse otros métodos de tinción, en su mayoría selectivos, que incluyen la coloración con orceína y fucsina-resorcina para el material elástico y la impregnación argéntica para las fibras reticulares y las membranas basales. Pese a que el fundamento químico de muchos no siempre se comprende, estos procedimientos sirven. En cualquier caso, es más importante saber lo que el método permite observar que conocer su mecanismo íntimo de acción.

## ■ HISTOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA

### Los procedimientos químicos específicos pueden proveer información detallada acerca de la función de las células y los componentes extracelulares de los tejidos

Los métodos histoquímicos y citoquímicos pueden tener su fundamento en la *unión específica* de un colorante, el uso de *anticuerpos marcados con un colorante fluorescente* dirigidos contra un componente celular en particular o la *actividad enzimática inherente* de un elemento constitutivo de las células. Además, muchas macromoléculas presentes en las células pueden detectarse por medio de la radioautografía, en la cual precursores moleculares marcados radiactivamente se incorporan a las células y los tejidos antes de la fijación. Muchos de estos procedimientos pueden usarse en preparados tanto para la microscopía óptica como para la microscopía electrónica.

Antes de comentar la química de las tinciones de rutina y de las técnicas histoquímicas y citoquímicas conviene describir brevemente la índole de un corte histológico común.

### Composición química de las muestras histológicas

#### La composición química de un tejido listo para una coloración de rutina es muy diferente de la del tejido vivo

Los componentes que perduran luego de la fijación son principalmente moléculas grandes que no se disuel-

ven con facilidad, en especial después de aplicar el fijador. Estas moléculas grandes, en particular las que reaccionan con otras moléculas semejantes para formar complejos macromoleculares, son las que suelen conservarse en un corte histológico. Los siguientes son ejemplos de estos complejos macromoleculares grandes:

- **Nucleoproteínas**, formadas por ácidos nucleicos unidos a proteínas.
- **Proteínas intracelulares del citoesqueleto** en complejo con otras proteínas.
- **Proteínas extracelulares** en grandes aglomeraciones insolubles, en las que moléculas vecinas semejantes se unen a través de enlaces cruzados, como ocurre en la formación de las fibras colágenas.
- **Complejos de fosfolípidos y proteínas (o carbohidratos) en las membranas.**

En su mayor parte estas moléculas constituyen la estructura de las células y los tejidos, dado que son los elementos morfogénicos hísticos. Constituyen la base de la organización de los tejidos visible con el microscopio.

En muchos casos un elemento estructural es al mismo tiempo una unidad funcional. Por ejemplo, en el caso de las proteínas que forman los filamentos contráctiles de las células musculares, estos filamentos son los componentes estructurales visibles y además participan en el proceso de contracción. El RNA del citoplasma aparece como parte de un componente estructural (ergastoplasma de las células glandulares, sustancia de Nissl de las neuronas) y al mismo tiempo es un participante activo en la síntesis de proteínas.

#### Muchos componentes de los tejidos desaparecen durante la preparación de los cortes teñidos con H-E

A pesar de que la mayor parte de los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos se conservan en los cortes histológicos, muchos también se pierden. Las proteínas pequeñas y los ácidos nucleicos pequeños, como los RNA de transferencia, en general se pierden durante la preparación del tejido. Como se mencionó antes, los solventes orgánicos utilizados durante la técnica histológica suelen disolver los lípidos neutros. También pueden perderse otras moléculas grandes, por ejemplo al ser hidrolizadas como consecuencia del pH desfavorable de las soluciones fijadoras. Los que siguen son ejemplos de macromoléculas que se pierden durante la fijación de rutina en fijadores acuosos:

- **Glucógeno** (carbohidrato de almacenamiento intracelular común en el hígado y las células musculares).
- **Proteoglicanos y glucosaminoglicanos** (carbohidratos complejos extracelulares hallados en el tejido conjuntivo).

Sin embargo, estas moléculas pueden conservarse si se utilizan fijadores no acuosos para el glucógeno o si

a la solución fijadora se le añaden agentes ligadores especiales que preservan las moléculas extracelulares con carbohidratos abundantes. Además, como ya se comentó, durante la preparación de rutina también suelen perderse los lípidos neutros porque los solventes orgánicos los disuelven.

### Los componentes solubles, los iones y las moléculas pequeñas también desaparecen durante la preparación de las muestras incluidas en parafina

Durante la preparación de las muestras de rutina que se incluyen en parafina y luego se tiñen con H-E se pierden metabolitos intermedios, glucosa, sodio, cloro y sustancias similares. Muchas de estas sustancias pueden estudiarse en preparados especiales, en ocasiones con una pérdida considerable de la integridad estructural. Estos iones y pequeñas moléculas solubles no constituyen elementos morfogénicos históricos sino que participan en los procesos de síntesis o en las reacciones celulares. Cuando se conservan y pueden detectarse por métodos específicos aportan información valiosísima sobre el metabolismo, el transporte activo y otros procesos vitales de las células. El agua, una molécula muy versátil, participa en estas reacciones y procesos y contribuye a la estabilización de la estructura macromolecular a través de enlaces de hidrógeno.

## Fundamentos químicos de la coloración

### Colorantes ácidos y básicos

#### La hematoxilina y la eosina son los colorantes de uso más frecuente en la histología

Un **colorante ácido**, como la eosina, tiene una *carga neta negativa* en su parte coloreada y se describe con la fórmula general ( $\text{Na}^+ \text{anilina}^-$ ).

Un **colorante básico** tiene una *carga neta positiva* en su parte coloreada y se describe con la fórmula general ( $\text{anilina}^+ \text{Cl}^-$ ).

Desde el punto de vista estructural la hematoxilina no es un colorante básico, pero tiene propiedades tintoriales muy semejantes a las de las anilinas básicas. El color de una anilina no se relaciona con el hecho de que sea ácida o básica, como lo demuestran los ejemplos que se presentan en el *cuadro 1.2*.

#### Los colorantes básicos reaccionan con los componentes aniónicos de las células y los tejidos (componentes que tienen una carga neta negativa)

Entre los componentes aniónicos se encuentran los grupos fosfato de los ácidos nucleicos, los grupos sulfato de los glucosaminoglucanos y los grupos carboxilo de las proteínas. La capacidad de estos grupos aniónicos de reaccionar con una anilina o colorante básico se

denomina **basofilia** (gr. *basis* + *philein*, amar, es decir que tiene afinidad por lo básico). Los componentes del tejido que se tiñen con la hematoxilina también exhiben basofilia.

La reacción de los grupos aniónicos varía según el pH. Así:

- Con un *pH alto* (de cerca de 10) los tres grupos se ionizan y quedan disponibles para la reacción con el colorante básico por medio de uniones electrostáticas.
- Con un *pH ligeramente ácido a neutro* (de 5 a 7) se ionizan los grupos fosfato y sulfato y quedan disponibles para reaccionar con la anilina básica a través de uniones electrostáticas.
- Con un *pH bajo* (inferior a 4) sólo se mantienen ionizados los grupos sulfato para reaccionar con los colorantes básicos.

En consecuencia, la tinción con colorantes básicos en un pH determinado puede utilizarse para centrar el estudio en grupos aniónicos específicos y como estos aniones específicos predominan en ciertas macromoléculas, la tinción sirve como indicador de estas macromoléculas.

Como ya se mencionó, la hematoxilina no es un colorante básico en sentido estricto. Se usa con un mordiente (es decir un intermediario entre el componente del tejido y la anilina) y es por la acción del mordiente que la coloración con hematoxilina se parece a la tinción que produce un colorante básico. La unión en el complejo tejido-mordiente-hematoxilina no consiste en un simple enlace electrostático y cuando la hematoxilina se coloca en agua no se disocia del tejido. Por eso la hematoxilina se presta para aquellos procedimientos tintoriales en los que es seguida por soluciones acuosas de colorantes ácidos. Los colorantes básicos verdaderos, a diferencia de la hematoxilina, no suelen usarse en secuencias en las que la anilina básica es seguida por una anilina ácida. Entonces la anilina básica tiende a disociarse del tejido durante los lavados en soluciones acuosas que se realizan entre la aplicación de ambas soluciones colorantes.

**CUADRO 1.2** Algunos colorantes básicos y ácidos

Colorante	Color
<b>Colorantes básicos</b>	
Verde de metilo	Verde
Azul de metileno	Azul
Pironina G	Rojo
Azul de toluidina	Azul
<b>Colorantes ácidos</b>	
Fucsina ácida	Rojo
Azul de anilina	Azul
Eosina	Rojo
Naranja G	Naranja



### **Los colorantes ácidos reaccionan con los grupos catiónicos de las células y los tejidos, en particular con los grupos amino ionizados de las proteínas**

La reacción de los grupos catiónicos con un colorante ácido recibe el nombre de **acidofilia** (lat. *acidus* + gr. *philein*, amar, o sea que tiene afinidad por lo ácido). Las reacciones de los componentes celulares e hísticos con los colorantes ácidos no son tan específicas ni tan precisas como las reacciones con los colorantes básicos.

Aunque el enlace electrostático es el factor principal en la unión primaria de un colorante ácido con el tejido, no es el único; debido a ello, los colorantes ácidos a veces se utilizan combinados para teñir en forma selectiva distintos componentes de los tejidos. Por ejemplo, en la **técnica tricrómica de Mallory** se usan tres colorantes ácidos: azul de anilina, fucsina ácida y naranja G. Estos colorantes tiñen con selectividad el colágeno, el citoplasma en general y los eritrocitos, respectivamente. La fucsina ácida también tiñe los núcleos.

En otras técnicas con anilinas ácidas múltiples se emplea la hematoxilina para teñir primero los núcleos y luego se aplican los colorantes ácidos con el fin de teñir selectivamente el citoplasma y las fibras extracelulares. La tinción selectiva de los componentes de los tejidos por los colorantes ácidos se debe a factores relativos, como el tamaño y el grado de acumulación de las moléculas del colorante y la permeabilidad y densidad del tejido.

Los colorantes básicos también pueden utilizarse combinados o secuencialmente (p. ej., verde de metilo y pironina para estudiar la síntesis y la secreción de proteínas), pero estas combinaciones no son de uso tan difundido como las de los colorantes ácidos.

### **Una cantidad limitada de sustancias dentro de las células y en la matriz extracelular presenta basofilia**

Entre estas sustancias figuran:

- **Heterocromatina** y **nucléolos** del núcleo (principalmente por los grupos fosfato ionizados en los ácidos nucleicos de ambos).
- **Componentes citoplasmáticos** como el ergastoplasma (también por los grupos fosfato ionizados en el RNA ribosómico).
- **Material extracelular** como los carbohidratos complejos de la matriz cartilaginosa (por los grupos sulfato ionizados).

### **La tinción con colorantes ácidos es menos específica pero más sustancias dentro de las células y en la matriz extracelular presentan acidofilia**

Estas sustancias incluyen:

- La mayoría de los **filamentos citoplasmáticos**, en especial los de las células musculares.

- La mayoría de los **componentes membranosos intracelulares** y gran parte del citoplasma no especializa de otro modo.
- La mayoría de las **fibras extracelulares** (principalmente por los grupos amino ionizados).

### **Metacromasia**

#### **Ciertos colorantes básicos reaccionan con componentes hísticos que hacen cambiar su color normal del azul al rojo o al púrpura; esta modificación de la absorbancia se denomina metacromasia**

El mecanismo básico de la **metacromasia** es la presencia de polianiones en el tejido. Cuando estos tejidos se tiñen con una solución colorante básica concentrada, como la de azul de toluidina, las moléculas de la anilina están lo suficientemente cerca como para formar aglomeraciones diméricas y poliméricas. Las propiedades de absorción de estas aglomeraciones son diferentes de las de las moléculas de colorante individuales no aglomeradas.

Las estructuras de las células y los tejidos con una alta concentración de grupos sulfato y fosfato ionizados, como la sustancia fundamental del cartílago, los gránulos de heparina de los mastocitos y el retículo endoplasmático rugoso de los plasmocitos, muestran metacromasia. En consecuencia, el azul de toluidina se verá púrpura o rojo cuando tiña estos componentes.

### **Grupos aldehído y el reactivo de Schiff**

#### **La capacidad de la fucsina básica decolorada (reactivo de Schiff) de reaccionar con los grupos aldehído da como resultado la aparición de un color rojo distintivo y es la base de las reacciones del PAS (ácido peryódico-reactivo de Schiff) y de Feulgen**

La **reacción del PAS (ácido peryódico-reactivo de Schiff)** tiñe carbohidratos y macromoléculas con abundancia de carbohidratos. Se usa para detectar glucógeno en las células, moco en varios tipos de células y tejidos, la membrana basal que se encuentra debajo de los epitelios y las fibras reticulares del tejido conjuntivo. La **reacción de Feulgen**, que incluye una hidrólisis ácida débil con HCl, se utiliza para teñir DNA.

Los fundamentos de la reacción del PAS son los siguientes:

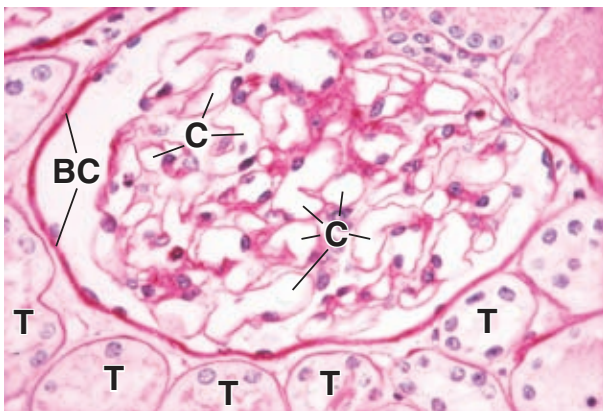
- Los anillos de las hexosas (carbohidratos) poseen carbonos adyacentes, cada uno de ellos con un grupo hidroxilo (–OH).
- Las hexosaminas de los glucosaminoglucanos tam-

bién poseen carbonos adyacentes, pero con alternancia de grupos hidroxilo ( $-\text{OH}$ ) y grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ).

- El ácido peryódico rompe la unión entre estos átomos de carbono adyacentes y forma grupos aldehído.
- Estos grupos aldehído reaccionan con el reactivo de Schiff para dar un color púrpura intenso distintivo.

La tinción con PAS de la membrana basal (fig. 1.3) y las fibras reticulares tiene su fundamento en el contenido o la asociación de proteoglicanos (carbohidratos complejos asociados con un centro de proteína). Esta tinción es una alternativa de las técnicas de impregnación argéntica, que también tienen como base la reacción con las moléculas de sacáridos de los proteoglicanos.

La reacción de Feulgen separa las purinas de las desoxirribosas del DNA por medio de una hidrólisis ácida débil; entonces se abren los anillos de monosacárido y se forman grupos aldehído. De nuevo, son los grupos aldehído de formación reciente los que reaccionan con el reactivo de Schiff para dar el color rojo púrpura característico. La reacción del reactivo de Schiff con el DNA es *estequiométrica* y por lo tanto, puede usarse en métodos espectrofotométricos para cuantificar el DNA en el núcleo de una célula. El RNA no se tiñe con el reactivo de Schiff porque no tiene desoxirribosa.



**FIGURA 1.3. Microfotografía de tejido renal teñido con la técnica del PAS.** Esta técnica histoquímica sirve para demostrar y localizar carbohidratos y macromoléculas con carbohidratos abundantes. Las membranas basales son PAS positivas, como es obvio por su coloración rojo púrpura intensa. Los túbulos renales (T) se encuentran bien delineados por la membrana basal teñida que los rodea. Los capilares glomerulares (C) y el epitelio de la cápsula de Bowman (BC) también poseen membranas basales PAS positivas. 360 x.

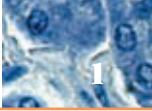
## Digestión enzimática

**La digestión enzimática de un corte adyacente a otro teñido para identificar un componente específico, como glucógeno, DNA o RNA, puede ser útil para confirmar la identidad del material que se tiñe**

El material intracelular que se tiñe con la reacción del PAS puede identificarse como glucógeno mediante

### Recuadro 1.2 Consideraciones funcionales: microespectrofotometría de Feulgen

La microespectrofotometría de Feulgen es una técnica que fue ideada para el estudio de los aumentos del DNA en las células en desarrollo y para analizar la **ploidía**, es decir la cantidad de veces que está multiplicado el contenido normal de DNA en una célula (se dice que una célula somática normal que no se está dividiendo es **diploide**; en cambio, los espermatozoides y los óvulos son **haploides**). Para cuantificar el DNA nuclear se utilizan dos técnicas, la **citometría estática** para cortes de tejido y la **citometría de flujo** para células aisladas. La técnica de la citometría estática de cortes de tumores teñidos con el método de Feulgen se vale de la microespectrofotometría acoplada con un sistema de visualización digital para cuantificar la absorción de luz con una longitud de onda de 560 nm por parte de las células y las aglomeraciones celulares. En cambio, la técnica de la citometría de flujo se basa en el empleo de instrumentos capaces de rastrear sólo células individuales que fluyen ante un detector en un medio líquido. Esta técnica permite el análisis cuantitativo rápido de una célula individual sobre la base de la medición de la luz fluorescente emitida. En la actualidad la microespectrofotometría de Feulgen se utiliza para estudiar los cambios del contenido de DNA de las células en división que se están diferenciando. Además, se la emplea en la práctica clínica para analizar la cantidad anormal de cromosomas (es decir los patrones de ploidía) en las células malignas. Se dice que las células malignas con un patrón mayoritariamente diploide están bien diferenciadas y que los tumores con estos tipos de células tienen un pronóstico más favorable que los mismos tumores con células aneuploides (con múltiplos no enteros de la cantidad haploide de DNA) o tetraploides. La microespectrofotometría de Feulgen ha sido de particular utilidad en estudios de adenocarcinomas específicos (tumores del epitelio glandular), cáncer de mama, cáncer de riñón, cánceres de colon y de otras partes del tubo digestivo, cáncer del endometrio (mucosa del útero) y cáncer ovárico. Es una de las herramientas más valiosas que los patólogos utilizan para evaluar la potencialidad metastásica de estos tumores y para tomar decisiones pronósticas o terapéuticas.



el tratamiento previo de los cortes con diastasa o amilasa. La falta de tinción después de este tratamiento identifica con positividad que el material teñido es glucógeno.

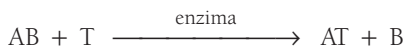
De modo similar, el pretratamiento de los cortes histológicos con desoxirribonucleasa (DNAsa) evitará la tinción con la reacción de Feulgen en esos cortes y el tratamiento de muestras de epitelios secretores de proteínas con ribonucleasa (RNAsa) impedirá la tinción del ergastoplasma con los colorantes básicos.

## Histoquímica enzimática

**Las técnicas histoquímicas también se utilizan para identificar y localizar enzimas en células y tejidos**

Para localizar enzimas en los cortes histológicos debe tenerse especial cuidado durante la fijación para que se preserve la actividad enzimática. La fijación aldehídica débil suele ser el método preferido.

En estos procedimientos se detecta el producto de la reacción de la actividad enzimática y no la enzima propiamente dicha. En general se usa un **reactivo de captura**, que puede ser un colorante o un metal pesado, para atrapar o fijar el producto de la reacción de la enzima mediante precipitación en el sitio de la reacción. En una reacción típica para detectar una enzima hidrolítica, el corte histológico se coloca en una solución que contiene un sustrato (AB) y un agente de atrapamiento (T) que precipitará uno de los productos como sigue:



en donde AT es el producto final atrapado y B es el sustrato hidrolizado.

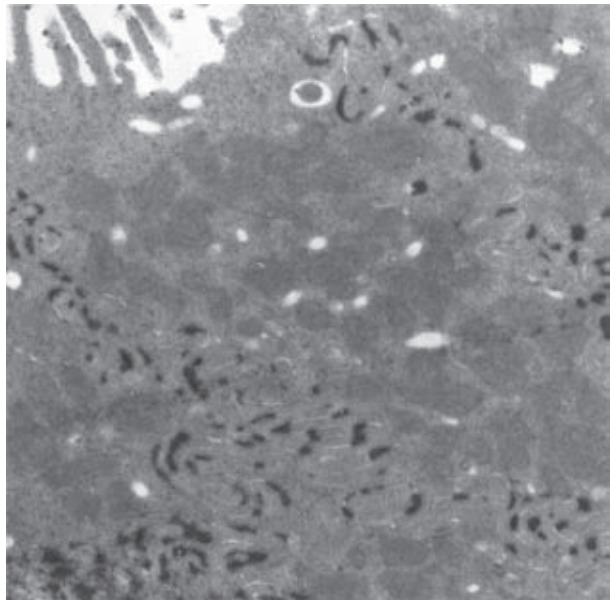
Mediante el uso de este tipo de técnicas se pudo equiparar el lisosoma, identificado por primera vez en estudios celulares de centrifugación diferencial, con un componente vacuolar visible en las microfotografías electrónicas. En los tejidos sometidos a una fijación débil las hidrolasas ácidas y las esterasas contenidas en los lisosomas reaccionan con un sustrato adecuado. La mezcla reactiva también contiene iones de plomo para precipitar, por ejemplo, fosfato de plomo derivado de la acción de la fosfatasa ácida. Luego el producto de reacción precipitado puede verse tanto con microscopía óptica como con microscopía electrónica.

Se han desarrollado procedimientos histoquímicos similares para microscopía óptica y electrónica con el fin de demostrar fosfatasa alcalina, adenosina trifosfatasas (ATPasas) de varios tipos (incluida la  $Na^+/K^+$ -ATPasa que es el fundamento enzimático de la bomba de sodio en células y tejidos), diversas esterasas y muchas enzimas respiratorias (fig. 1.4).

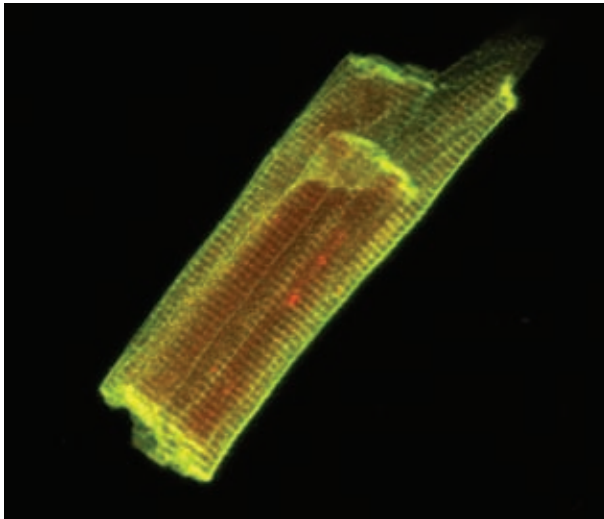
## Inmunocitoquímica

**El fundamento de la inmunocitoquímica es la especificidad de la reacción entre un antígeno y un anticuerpo**

Los **anticuerpos**, también llamados **inmunoglobulinas**, son glucoproteínas producidas por células específicas del sistema inmunitario en respuesta a una proteína extraña o **antígeno**. En el laboratorio los anticuerpos pueden purificarse de la sangre y conjugarse (asociarse) con un colorante fluorescente. En general los colorantes fluorescentes (fluorocromos) son sustancias químicas que absorben luz de longitudes de onda diferentes (p. ej., luz ultravioleta) y luego emiten luz visible de una longitud de onda específica (p. ej., verde, amarillo, rojo). La fluoresceína, el colorante de uso más frecuente, absorbe la luz ultravioleta y emite luz verde. Los anticuerpos conjugados con fluoresceína pueden aplicarse a cortes de tejido (tanto obtenidos por congelación como provenientes de muestras sometidas a una fijación leve) sobre portaobjetos de vidrio para localizar



**FIGURA 1.4. Procedimiento histoquímico para la localización de ATPasa en la membrana de células epiteliales de vesícula biliar de conejo en la microscopía electrónica.** Las regiones oscuras que se ven en la microfotografía electrónica señalan la localización de la enzima ATPasa. Esta enzima se detecta en la membrana plasmática de las regiones laterales de las células epiteliales, lo cual concuerda con la ubicación de las bombas de sodio. Estas células epiteliales realizan un transporte activo de moléculas a través de la membrana plasmática. 26 000 x.



**FIGURA 1.5. Imagen de microscopía confocal de una célula muscular cardíaca de rata.** Esta imagen se obtuvo con el microscopio confocal mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se utilizaron dos anticuerpos primarios. El primer anticuerpo primario reconoce un transportador de lactato específico (MCT1) y se detecta con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (rojo). El segundo anticuerpo primario está dirigido contra la proteína transmembrana CD147, que tiene una asociación estrecha con el MCT1. Este anticuerpo se detectó mediante un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (verde). El color amarillo aparece en los sitios en los que los dos anticuerpos secundarios marcados tienen exactamente la misma localización (es decir, se colocan) dentro de la célula muscular cardíaca. Esta imagen tridimensional muestra que ambas proteínas están distribuidas en la superficie de la célula muscular, mientras que el transportador de lactato solo (color rojo) aparece en una ubicación profunda con respecto a la membrana plasmática. (Gentileza de los doctores Andrew P. Halestrap y Catherine Heddle.)

un antígeno en las células y los tejidos. Luego la reacción del anticuerpo con el antígeno puede examinarse y fotografiarse con un microscopio de fluorescencia o un microscopio confocal que produce una reconstrucción tridimensional del tejido examinado (fig. 1.5).

**En la inmunocitoquímica se utilizan dos tipos de anticuerpos: anticuerpos policlonales producidos por animales inmunizados y anticuerpos monoclonales producidos por líneas celulares productoras de anticuerpos inmortalizadas (de duplicación continua)**

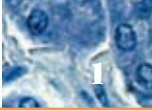
En un procedimiento típico una proteína específica, como por ejemplo la actina, se aísla de las células musculares de una especie (p. ej., rata) y se inyecta en la circulación de otra especie (p. ej., conejo). En el conejo inmunizado el sistema inmunitario reconoce como

### Recuadro 1.3 Correlación clínica: anticuerpos monoclonales en medicina

En la actualidad los **anticuerpos monoclonales** se utilizan mucho en las técnicas de inmunocitoquímica y también tienen muchas aplicaciones clínicas. Los anticuerpos monoclonales conjugados con compuestos radiactivos se utilizan para detectar y diagnosticar metástasis tumorales en patología, para diferenciar subtipos de tumores y sus etapas de diferenciación y, en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas, para identificar los microorganismos en la sangre y en los líquidos histicos. En estudios clínicos recientes, se han usado anticuerpos monoclonales conjugados con inmunotoxinas, agentes quimioterápicos y radioisótopos para hacer llegar agentes terapéuticos a células tumorales específicas del organismo.

antígenos extraños las moléculas de actina de la rata. Este reconocimiento desencadena una cascada de reacciones inmunológicas que comprende muchos grupos (clones) de células inmunitarias llamadas linfocitos B. La clonación de los linfocitos B conduce finalmente a la producción de anticuerpos antiactina. En conjunto, estos **anticuerpos policlonales** son mezclas de anticuerpos diferentes producidos por muchos clones de linfocitos B en las que cada clon reconoce una región diferente de la molécula de actina. Luego estos anticuerpos se extraen de la sangre, se purifican y se conjugan con un colorante fluorescente, después de lo cual pueden usarse para la detección de moléculas de actina en los tejidos o las células de rata. Si hay actina en una célula o en un tejido, por ejemplo en un fibroblasto del tejido conjuntivo, el anticuerpo marcado con fluoresceína se le une y la reacción puede verse con el microscopio de fluorescencia.

Los **anticuerpos monoclonales** son los sintetizados por una línea celular productora de anticuerpos compuesta por un solo grupo (clon) de linfocitos B idénticos. El clon individual que se convierte en una línea celular se obtiene de un sujeto con **mieloma múltiple**, un tumor derivado de un solo plasmocito productor de anticuerpos. Los sujetos con mieloma múltiple producen una población grande de anticuerpos homogéneos idénticos con una especificidad idéntica contra un antígeno. Para producir anticuerpos monoclonales contra un antígeno específico se inmuniza con ese antígeno a un ratón o a una rata. Luego se aíslan del tejido linfático (bazo o ganglios linfáticos) del animal los linfocitos B activados y se fusionan con la línea celular de mieloma. Esta fusión produce un **hibridoma**, una línea celular secretora de un anticuerpo individual inmortalizada.



Para obtener anticuerpos monoclonales contra moléculas de actina de rata, por ejemplo los linfocitos B de los órganos linfáticos de conejos inmunizados tienen que fusionarse con células de mieloma.

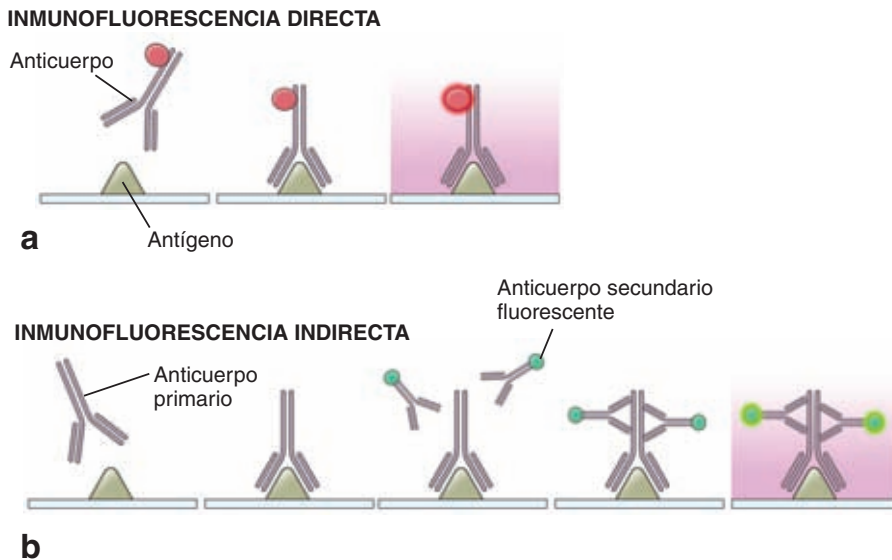
**Para localizar un antígeno diana en células y tejidos se utilizan métodos inmunocitoquímicos tanto directos como indirectos**

La técnica de inmunocitoquímica más antigua que se utiliza para identificar la distribución de un antígeno dentro de las células y los tejidos se conoce como **inmunofluorescencia directa**. Esta técnica se vale de un **anticuerpo primario** (policlonal o monoclonal) marcado con fluorocromo que reacciona con el antígeno dentro de la muestra (fig. 1.6a). Es un procedimiento de un solo paso y comprende un solo anticuerpo marcado. La visualización de las estructuras no es ideal a causa de la poca intensidad de la emisión de la señal. Dada la sensibilidad subóptima, los métodos de inmunofluorescencia directa están siendo reemplazados cada vez más por los métodos indirectos.

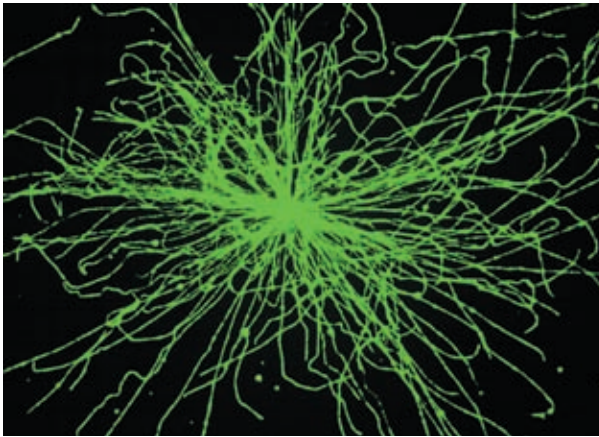
La **inmunofluorescencia indirecta** tiene una sensibilidad mucho mayor que los métodos directos y con frecuencia recibe el nombre de “técnica del emparedado” o “de la capa doble”. En vez de conjugar un fluorocromo con un anticuerpo (primario) específico dirigido contra el antígeno de interés (p. ej., una molécula de actina de rata), el fluorocromo se conjuga con un **anti-**

**cuerpo secundario** dirigido contra el anticuerpo primario (p. ej., anticuerpo de cabra antirrata; fig. 1.6b). Por lo tanto, cuando la fluoresceína se conjuga directamente con el anticuerpo primario específico el método es directo y cuando la fluoresceína se conjuga con un anticuerpo secundario el método es indirecto. El método indirecto aumenta en forma considerable la señal fluorescente emitida por el tejido. Una ventaja adicional del método de marcación indirecta es que un solo anticuerpo secundario puede usarse para localizar la unión histo-específica de varios anticuerpos primarios diferentes (fig. 1.7). Para los estudios microscópicos el anticuerpo secundario puede conjugarse con colorantes fluorescentes distintos de modo que en el mismo corte de tejido aparezcan marcas múltiples (véase fig. 1.5). Las desventajas de la inmunofluorescencia indirecta son que es cara, que requiere mucho trabajo y que no se adapta con facilidad a los procedimientos automatizados.

También es posible conjugar anticuerpos policlonales o monoclonales con otras sustancias, como enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano), que convierten sustratos incoloros en un producto insoluble de un color específico que se precipita en el sitio de la reacción enzimática. La tinción resultante de este **método de inmunoperoxidasa** puede verse en el microscopio óptico con técnicas inmunocitoquímicas directas o indirectas. En otra variante, con la molécula de anticuerpo puede conjugar oro coloidal o ferritina (una molécula que con-



**FIGURA 1.6. Inmunofluorescencia directa e indirecta.** **a.** En la inmunofluorescencia directa un anticuerpo primario marcado con un fluorocromo reacciona con un antígeno específico dentro de la muestra de tejido. Luego las estructuras marcadas se examinan con el microscopio de fluorescencia, en el cual una longitud de onda excitadora (por lo general, luz ultravioleta) desencadena la emisión de otra longitud de onda. Esta longitud de onda depende de la índole del fluorocromo utilizado para marcar el anticuerpo. **b.** El método indirecto comprende dos procesos. Primero, los anticuerpos primarios específicos reaccionan con el antígeno de interés. Segundo, los anticuerpos secundarios, que están marcados con fluorocromo, reaccionan con los anticuerpos primarios. La apariencia de las estructuras marcadas dentro del tejido es la misma en ambos métodos y para verlas se necesita un microscopio de fluorescencia.



**FIGURA 1.7. Microtúbulos vistos con técnicas inmunocitoquímicas.** El comportamiento de los microtúbulos (elementos del citoesqueleto) obtenidos de células de tumores mamarios humanos puede estudiarse in vitro mediante la cuantificación de su actividad de nucleación, que es iniciada por el centrosoma. Esta imagen se obtuvo con el microscopio de fluorescencia. Mediante el uso de técnicas de inmunofluorescencia indirecta se marcaron los microtúbulos con una mezcla de anticuerpos monoclonales anti- $\alpha$ -tubulina y anti- $\beta$ -tubulina (anticuerpos primarios) y se hicieron visibles por la acción de anticuerpos secundarios conjugados con el colorante fluoresceína (inmunoglobulina G de cabra antirratón unida a isotiocianato de fluoresceína). La reacción antígeno-anticuerpo realizada directamente sobre el cubreobjetos de vidrio permitió ver las moléculas de tubulina responsables de la formación de los más de 120 microtúbulos que aparecen en esta imagen. Estos microtúbulos se originan en el centrólo y se extienden hacia fuera de él unos 20 a 25  $\mu\text{m}$  para adquirir una distribución radial uniforme. 1 400  $\times$ . (La microfotografía es gentileza de la Dra. Wilma L. Lingle y la Sra. Vivian A. Negron.)

tiene hierro). Estos marcadores pueden verse directamente con el microscopio electrónico.

## Técnicas de hibridación

**La hibridación es un método para localizar mRNA o DNA mediante la hibridación de la secuencia de interés con una sonda de nucleótidos de secuencia complementaria**

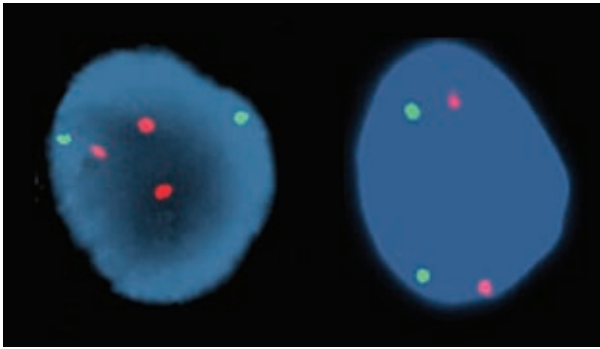
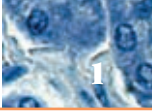
En general el término *hibridación* describe la capacidad de las moléculas monocatenarias de DNA o RNA de interactuar (hibridarse) con secuencias complementarias. En el laboratorio la hibridación requiere el aislamiento del DNA o del RNA, que luego se mezcla con una secuencia de nucleótidos complementaria (llamada *sonda de nucleótidos*). Con mucha frecuencia los híbridos se detectan mediante el uso de una marca radiactiva adherida a uno de los componentes del híbrido.

La unión de la sonda y la secuencia puede ocurrir en una solución o en una membrana de nitrocelulosa. En la *hibridación in situ* la unión de la sonda de nucleótidos con la secuencia de DNA o RNA de interés se produce dentro de las células o los tejidos, como células de cultivo o embriones enteros. Esta técnica permite la localización de secuencias de nucleótidos específicas tan pequeñas como 10 o 20 copias de mRNA o DNA por célula.

En la hibridación in situ se utilizan varias sondas de nucleótidos. Las *sondas de oligonucleótidos* pueden tener entre 20 y 40 nucleótidos como mínimo. Las *sondas de DNA monocatenario o bicatenario* son mucho más largas y pueden contener hasta 1 000 nucleótidos. Para la localización específica de mRNA se utilizan *sondas de RNA* complementarias. Estas sondas se marcan con isótopos radiactivos (p. ej.,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ ), un nucleótido modificado en forma específica (digoxigenina) o biotina (un marcador multipropósito covalente usado con mucha frecuencia). Las sondas radiactivas pueden detectarse y visualizarse mediante la radioautografía. La digoxigenina y la biotina se detectan con métodos inmunocitoquímicos y citoquímicos, respectivamente.

La fuerza de los enlaces entre la sonda y la secuencia complementaria depende del tipo de ácido nucleico en las dos cadenas. El enlace más fuerte se forma entre una sonda de DNA y una cadena de DNA complementaria y el más débil entre una sonda de RNA y una cadena de RNA complementaria. Si se espera que una muestra de tejido contenga una cantidad muy pequeña de mRNA o un transcrito viral, puede usarse la amplificación de la *reacción en cadena de la polimerasa (PCR)* para el DNA o la *PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR)* para el RNA. Los transcritos amplificados que se obtienen durante estos procedimientos suelen detectarse mediante el uso de sondas de nucleótidos complementarias marcadas en técnicas de hibridación in situ estándares.

Recientemente se han combinado colorantes fluorescentes con sondas de nucleótidos, lo que posibilitó la visualización de muchas sondas al mismo tiempo (fig. 1.8). Esta técnica, llamada *técnica FISH* (hibridación in situ con fluorescencia), tiene un uso muy difundido en clínica para las pruebas genéticas. Por ejemplo, la hibridación de una sonda con cromosomas en metafase puede usarse para identificar la posición cromosómica de un gen. La técnica FISH se utiliza para examinar simultáneamente los cromosomas, la expresión génica y la distribución de los productos génicos, como proteínas anormales o patológicas. En la actualidad están disponibles en el mercado muchas sondas fluorescentes específicas que se utilizan en la práctica clínica para los procedimientos de detección del cáncer de cuello uterino y para la detección de células infectadas por HIV. La técnica FISH también puede usarse para examinar los cromosomas de los linfocitos de los astronautas con



**FIGURA 1.8. Ejemplo de la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) utilizada en una prueba de detección prenatal.** Se hibridaron núcleos en interfase de células obtenidas de muestras de líquido amniótico con dos sondas de DNA específicas. La sonda de color naranja (LSI 21) es específica de locus para el cromosoma 21 y la sonda de color verde (LSI 13) es específica de locus para el cromosoma 13. El núcleo de la derecha proviene de una muestra de líquido amniótico normal y exhibe dos señales verdes y dos naranjas, lo que indica que hay dos copias de los cromosomas 13 y 21, respectivamente. El núcleo de la izquierda posee tres señales de color naranja, lo que indica una trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down). El DNA se ha teñido de azul con un colorante de contraste inespecífico (DAPI) para tornar visible el núcleo. 1 250 ×. (Gentileza del Dr. Robert B. Jenkins.)

el fin de calcular la dosis de radiación absorbida por ellos durante su estadía en el espacio. La frecuencia de las translocaciones cromosómicas en los linfocitos es proporcional a la dosis de radiación absorbida.

## Radioautografía

**En la radioautografía se utiliza una emulsión fotográfica colocada sobre un corte histológico para localizar material radiactivo en los tejidos**

Muchos precursores moleculares pequeños de moléculas más grandes, como los aminoácidos que integran las proteínas y los nucleótidos que forman los ácidos nucleicos, pueden marcarse mediante la incorporación de uno o varios átomos radiactivos a su estructura molecular. Luego se investiga la radiactividad para detectar las moléculas más grandes en las células y los tejidos. Las moléculas precursoras marcadas pueden inyectarse en animales vivos o introducirse en células u órganos de cultivo. De este modo se han estudiado la síntesis del DNA y la ulterior división celular, la síntesis y secreción de las proteínas por las células y la ubicación de los productos de síntesis dentro de las células y en la matriz extracelular.

Los cortes de las muestras que han incorporado el material radiactivo se montan en portaobjetos. En la

oscuridad el portaobjetos suele sumergirse brevemente en una emulsión fotográfica fundida de manera que se forme una delgada película fotográfica sobre su superficie. Luego de la exposición adecuada en una cámara oscura, en general durante un período de días a semanas, la emulsión expuesta se revela con las técnicas fotográficas comunes y el portaobjetos con la muestra se preserva siempre sellándolo con un cubreobjetos. Los preparados se pueden teñir antes de la exposición y el revelado o después. Mediante este procedimiento se exponen y revelan los gránulos de plata en la emulsión sobre las moléculas marcadas con material radiactivo; los gránulos aparecen como puntos oscuros en el sitio de emisión radiactiva cuando la muestra se examina con el microscopio óptico (fig. 1.9a).

Estos gránulos pueden usarse sencillamente como indicadores de la localización de una sustancia pero también pueden contarse para obtener información semicuantitativa acerca de la cantidad de una sustancia dada en un sitio específico. Por ejemplo, después de inyectarle timidina tritiada a un animal las células que hayan incorporado este nucleótido en su DNA antes de dividirse pero que todavía no hayan sufrido la mitosis tendrán alrededor del doble de gránulos de plata sobre sus núcleos que las células que se hayan dividido después de incorporar el nucleótido marcado.

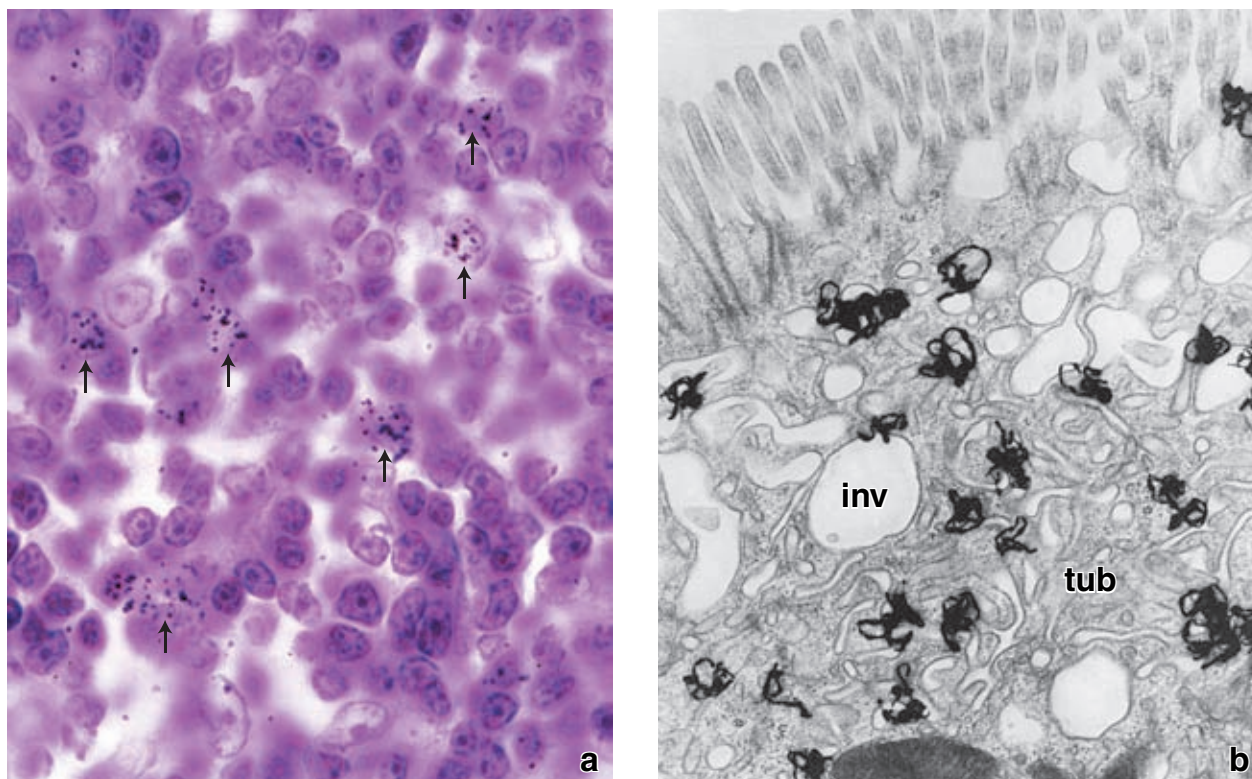
La radioautografía también puede practicarse sobre cortes finos de material incluido en plástico para su observación con el microscopio electrónico. En esencia se usan las mismas técnicas pero, como ocurre con todos los métodos de preparación para el MET, los procedimientos son mucho más delicados y difíciles; no obstante, también permiten lograr una resolución mucho mayor y una detección más precisa (fig. 1.9b).

## ■ MICROSCOPIA

### Microscopia óptica

Un microscopio, sea simple (una sola lente) o compuesto (lentes múltiples), es un instrumento que aumenta el tamaño de una imagen y permite ver más detalles que los que sería posible visualizar a simple vista. El microscopio más sencillo es una lupa o un par de gafas o anteojos para leer.

El poder de resolución del ojo humano, o sea la distancia que debe haber entre dos objetos para que se vean separados y no parezcan uno solo (0,2 mm), está determinado por el espacio que hay entre las células fotorreceptoras contiguas de la retina. La función de un microscopio es ampliar una imagen hasta un grado en el cual la retina pueda resolver la información que de otro modo estaría por debajo de su límite de resolución. En el cuadro 1.3 se compara la resolución del ojo humano con la de microscopios diversos.



**FIGURA 1.9. Ejemplos de radioautografía en microscopía óptica y electrónica.** **a.** Microfotografía de un corte de ganglio linfático de un animal al que se le administró timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ). En algunas de las células se ven aglomeraciones de gránulos de plata metálica con el aspecto de pequeñas partículas negras (*flechas*). Estas células han sintetizado DNA en preparación para la división celular y han incorporado la [ $^3\text{H}$ ]timidina en el DNA recién formado. Con el tiempo las partículas radiactivas de baja energía emitidas por la [ $^3\text{H}$ ]timidina chocan contra los cristales de haluro de plata de una emulsión fotográfica que cubre la muestra (exposición) y crean una imagen latente (como hace la luz al incidir sobre la película de una cámara fotográfica). Durante el revelado del portaobjetos cubierto con la emulsión la imagen latente, que no es otra cosa que el haluro de plata activado, se torna visible porque la sal se reduce a plata metálica, la que aparece como gránulos negros en el examen microscópico. 1 200  $\times$ . (El preparado original es gentileza del Dr. Ernst Kallenbach.) **b.** Radioautografía microscópica electrónica de la región apical de una célula absorbente intestinal. Para realizar este estudio se le inyectó a un animal  $^{125}\text{I}$  unido a factor de crecimiento nervioso (NGF) y 1 hora después se extrajo la muestra de tejido, que luego se preparó de manera semejante a la que se utiliza para la microscopía óptica. El tamaño relativamente pequeño de los gránulos de plata contribuye a la localización precisa de los complejos  $^{125}\text{I}$ -NGF. Obsérvese que los gránulos de plata se concentran en las invaginaciones apicales (*inv*) y en las siluetas tubulares endosómicas tempranas (*tub*). 32 000  $\times$ . (La microfotografía electrónica es gentileza de la Dra. Marian R. Neutra.)

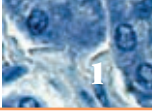
### El poder de resolución es la capacidad de una lente o sistema óptico del microscopio de producir imágenes separadas de objetos que están muy cerca uno de otro

La resolución no depende sólo del sistema óptico sino también de la longitud de onda de la luz y de otros factores, como por ejemplo el espesor de la muestra, la calidad de su fijación y la intensidad con la que está teñida. Con una luz cuya longitud de onda fuera de 540 nm (véase cuadro 1.1), una luz proveniente de un filtro verde a la cual el ojo es muy sensible, y con lentes objetivo y condensadora adecuadas, la máxima resolución alcanzable sería de 0,2  $\mu\text{m}$  (en la página 17 se describe el método para calcularla). Esta es la resolución teórica y, como

ya se mencionó, depende de que todas las condiciones sean óptimas. *La lente ocular aumenta la imagen producida por la lente objetivo, pero no puede aumentar la resolución.*

#### CUADRO 1.3 Resolución del ojo en comparación con la de los microscopios

Distancia entre los puntos que se resuelven	
Ojo humano	0,2 mm
Microscopio óptico de campo claro	0,2 $\mu\text{m}$
MEB	2,5 nm
MET	
En la teoría	0,05 nm
En la práctica	1,0 nm
Microscopio de fuerza atómica	50 pm



En la investigación biológica moderna se dispone de diversos microscopios ópticos para el uso general o especializado. Sus diferencias radican principalmente en factores como la longitud de onda con que se ilumina la muestra, la alteración física de la luz que llega a la muestra o que emana de ella y los procesos analíticos específicos que puedan aplicarse a la imagen final. A continuación se presenta una breve descripción de estos instrumentos y sus aplicaciones.

**El microscopio utilizado por la mayoría de los estudiantes e investigadores es el microscopio de campo claro**

El microscopio de campo claro es el descendiente directo de los microscopios que se usaban en el siglo XIX y que inauguraron la primera gran era de investigación histológica. En esencia, los componentes del microscopio de campo claro (fig. 1.10) son los siguientes:

- **Fuente luminosa** para la iluminación de la muestra, por ejemplo, una lámpara en la subplatina.
- **Lente condensadora** para enfocar el haz de luz a la altura de la muestra.
- **Platina** sobre la que se coloca el portaobjetos.
- **Lente objetivo** para recoger la luz que ha atravesado la muestra.

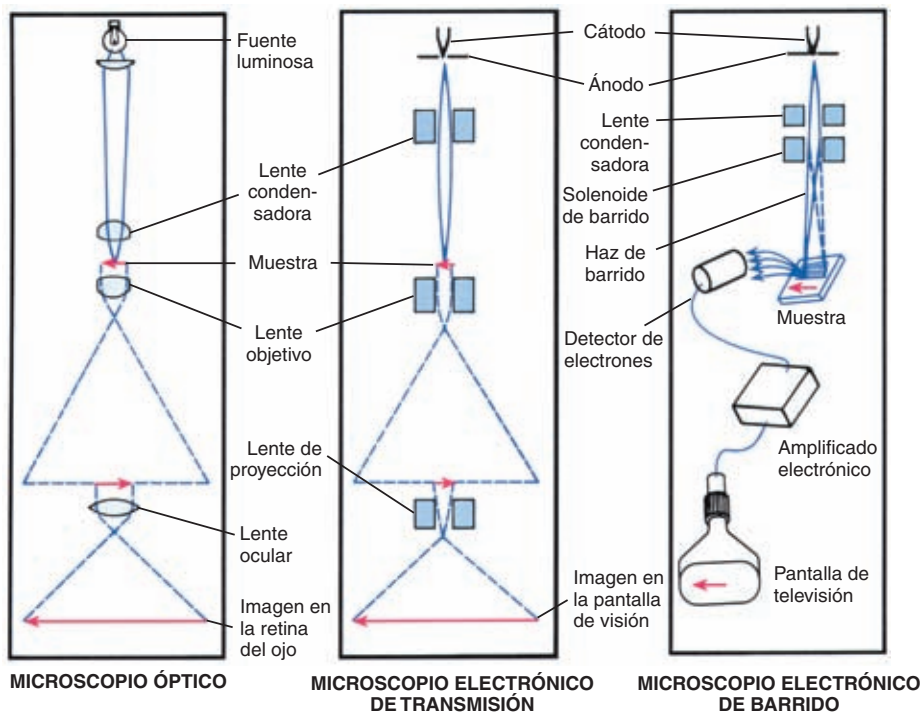
- **Lente ocular** (o un par de lentes oculares en los microscopios binoculares, que son de uso más común) a través de la cual se puede examinar directamente la imagen formada por la lente objetivo.

Para que la muestra pueda verse con el microscopio óptico de campo claro tiene que ser lo suficientemente fina para que la luz pase a través de ella. Aunque cierta cantidad de luz es absorbida al atravesar la muestra, el sistema óptico del microscopio de campo claro no produce un grado de contraste útil en los cortes no teñidos. Por este motivo se utilizan las diversas técnicas de coloración ya comentadas.

**Examen de un preparado histológico con el microscopio óptico**

**Los órganos son tridimensionales, mientras que los cortes histológicos tienen sólo dos dimensiones**

Como se comentó en la sección sobre “Preparación del tejido”, toda muestra tisular preparada para su examen con el microscopio óptico tiene que ser cortada en láminas muy finas. En consecuencia, de una muestra de tejido originalmente tridimensional se obtienen cortes bidimensionales. Uno de los mayores desafíos que



**FIGURA 1.10. Diagramas comparativos de la formación de la imagen en diferentes tipos de microscopios.** El microscopio óptico (a la izquierda) se presenta como si estuviera invertido; el microscopio electrónico de transmisión (MET) aparece en el medio y el microscopio electrónico de barrido (MEB) se ilustra a la derecha. Las flechas rojas representan la muestra y sus imágenes aumentadas.

**Recuadro 1.4 Uso correcto del microscopio óptico**

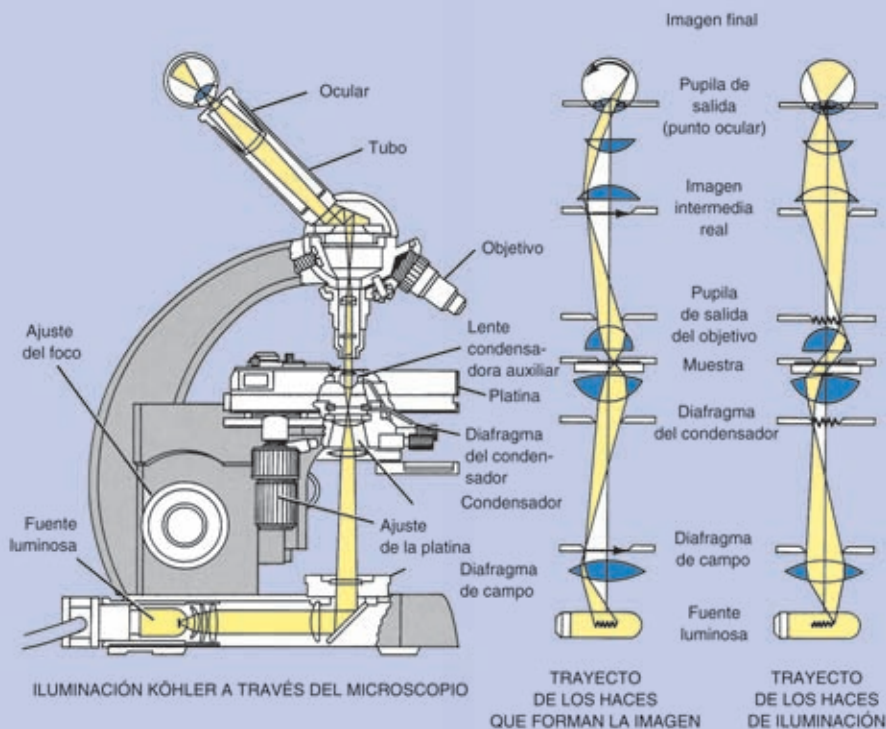
Esta breve introducción al uso correcto del microscopio óptico está dirigida a los estudiantes que usarán el microscopio para el examen de rutina de preparados histológicos. Si el comentario siguiente parece elemental sólo se debe a que con mucha frecuencia las personas que usan el microscopio no aprovechan todas sus ventajas. A pesar del equipo sofisticado disponible en la actualidad y de su uso muy difundido, en muchos casos se carece de la instrucción formal necesaria sobre cómo debe emplearse el microscopio óptico.

Los sistemas ópticos costosos y muy corregidos sólo pueden funcionar en forma óptima cuando los trayectos de los haces de iluminación y de observación están centrados y tienen un ajuste correcto. El uso de ajustes y alineamientos adecuados contribuirá sustancialmente al reconocimiento de detalles muy diminutos de la muestra y a la manifestación fidedigna de los colores para la visión directa o la microfotografía.

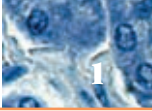
La **iluminación Köhler** es una de las claves de la buena microscopia y está incorporada al diseño de casi todos los microscopios modernos que se usan en laboratorios o para la investigación. En la figura adjunta se ilustran los dos trayectos de los rayos luminosos y todos los controles de ajuste de un microscopio moderno y esta deberá emplearse como guía al seguir las instrucciones que se dan a continuación para obtener una iluminación adecuada en el microscopio.

Los ajustes necesarios para conseguir una buena iluminación Köhler son pocos y sencillos:

- Se enfoca la muestra.
- Se cierra el diafragma de campo.
- Se enfoca el condensador moviéndolo hacia arriba o hacia abajo hasta que el contorno de su diafragma de campo aparezca bien nítido (en foco).
- Se centra el diafragma de campo con los controles de centrado de la subplatina (donde está el condensador). Luego se abre el diafragma de campo hasta que el haz luminoso cubra todo el campo observado.
- Se retira el ocular (o se usa un telescopio de centrado o un accesorio telescópico de fase, si se dispone de ellos) y se observa la pupila de salida del objetivo. Así se verá un campo circular iluminado cuyo radio será directamente proporcional a la apertura numérica del objetivo. A medida que se cierre el diafragma del condensador su contorno aparecerá dentro de este campo circular. Para la mayor parte de los preparados teñidos el diafragma del condensador deberá cerrarse hasta cubrir aproximadamente dos tercios de la apertura del objetivo. El resultado de este ajuste es la avenencia máxima entre resolución y contraste (que no es más que la diferencia de intensidades entre las regiones claras y oscuras de la muestra).



**Diagrama de un microscopio óptico típico.** Este dibujo muestra un corte transversal del microscopio, sus componentes funcionales y el trayecto de la luz. (Gentileza de Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY, EE.UU.)



## Uso correcto del microscopio óptico

Si se ponen en práctica estos cinco consejos simples la imagen obtenida será la mejor que permita la óptica del microscopio. Ahora veamos por qué.

Primero, ¿por qué ajustamos el diafragma de campo para cubrir sólo el campo observado? Iluminar un campo más grande que el que el sistema óptico puede “ver” sólo conduce a reflexiones internas o a una pérdida de luz, lo cual da como resultado más “ruido” o una disminución del contraste de la imagen.

Segundo, ¿por qué se pone énfasis en el ajuste del diafragma del condensador o, en otras palabras, la apertura de iluminación? Este diafragma ejerce gran influencia sobre la resolución y el contraste con los que se pueden observar ciertos detalles de la muestra.

Para la mayoría de las aplicaciones prácticas la resolución está determinada por la ecuación

$$d = \frac{\lambda}{AN_{\text{objetivo}} + AN_{\text{condensador}}}$$

en donde

d = distancia entre los puntos del detalle resuelto (en nm),

$\lambda$  = longitud de onda de la luz utilizada (verde = 540 nm),

AN = apertura numérica o seno de la mitad del ángulo limitado por los rayos más periféricos que, partiendo de un punto cualquiera del objeto, penetran en el objetivo (o condensador) y contribuyen a la formación de la imagen, multiplicado por el índice de refracción del medio interpuesto entre el objetivo (o condensador) y la muestra.

¿De qué manera la longitud de onda y la apertura numérica ejercen influencia directa sobre la resolución? Las estructuras de la muestra refractan la luz. El ángulo de refracción es directamente proporcional a la longitud de onda e inversamente proporcional al espaciado entre las estructuras. Según Ernst Abbé, un espaciado estructural dado sólo puede resolverse cuando el sistema óptico de observación (objetivo) puede ver cierta cantidad de la luz refractada producida por el espaciado. Cuanto mayor es la apertura del objetivo mayor es la cantidad de luz refractada que participa en la formación de la ima-

gen, con lo que se resuelven detalles menores y las imágenes son más nítidas.

Sin embargo, nuestra fórmula sencilla, demuestra que la apertura del condensador es tan importante como la apertura del objetivo. Y esto es lógico si se considera el ángulo de refracción de un haz oblicuo o uno de apertura mayor. Este ángulo se mantiene esencialmente constante pero se le presenta al objetivo de manera tal que puede ser captado con facilidad.

¿Cómo afecta el contraste el ajuste de la apertura? En teoría lo más cercano a la transferencia real de contraste entre la muestra y la imagen se obtendría por la interacción (interferencia) entre los rayos no refractados y todos los refractados.

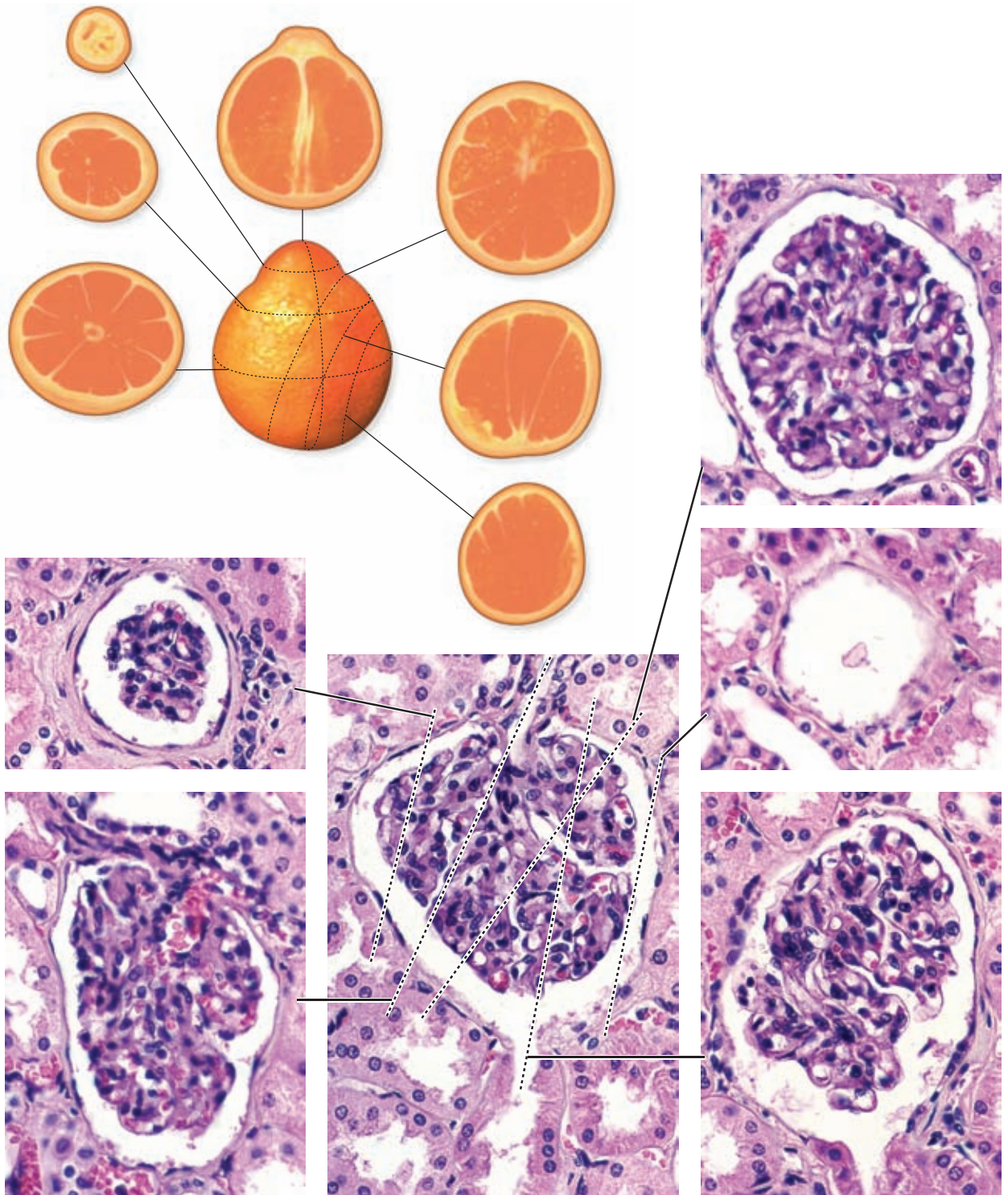
Para la transferencia de contraste entre transmisión total y absorción completa en una muestra la relación de intensidad entre la luz refractada y la no refractada tendría que ser de 1:1 para obtener una interferencia destructiva total (negro) o una interferencia constructiva total (blanco). Cuando la apertura del condensador es igual a la apertura del objetivo, la luz no refractada penetra en el objetivo con intensidad completa, pero la luz refractada sólo puede hacerlo parcialmente, lo que produce una disminución del contraste. En otras palabras, si se cierra la apertura del condensador hasta los dos tercios de la apertura del objetivo se consigue una relación de intensidad entre la luz refractada y la no refractada que se acerca a 1:1 y, en consecuencia, optimiza el contraste. Si se cierra la apertura del condensador (o se baja el condensador) y se pierde este equilibrio se producirán fenómenos de interferencia o artefactos de la imagen, como anillos de refracción o líneas alrededor de las distintas estructuras de la muestra. La mayor parte de las técnicas microscópicas empleadas para aumentar el contraste (p. ej., campo oscuro, iluminación oblicua, contraste de fase, modulación del contraste) tienen su fundamento en el mismo principio, es decir que suprimen o reducen la intensidad de la luz no refractada para mejorar un contraste intrínsecamente bajo de la muestra.

Si se siguen los pasos descritos y se mantienen limpias las lentes, la calidad y la fidelidad de las imágenes observadas sólo variarán de acuerdo con la capacidad de funcionamiento del sistema óptico.

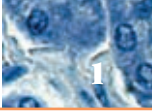
enfrentan los estudiantes que utilizan el microscopio para estudiar la histología es la posibilidad de reconstruir mentalmente la tercera dimensión “faltante”.

Por ejemplo, en la *figura 1.11a* se ilustran cortes en planos diferentes a través de una naranja. Obsérvese que cada superficie de corte (indicada por una línea de puntos) de la naranja entera exhibe tamaños y mode-

los estructurales diferentes según la orientación del corte. Por lo tanto, al examinar un corte dado a través de la naranja es importante ser capaz de reconstruir mentalmente la organización de la estructura y de sus partes constitutivas. En la *figura 1.11b* se muestra un ejemplo de una estructura histológica, en este caso un corpúsculo renal, según aparece en planos de cortes



**FIGURA 1.11. Ejemplo de cortes de una naranja y de un corpúsculo renal.** Las líneas de puntos dibujadas sobre la naranja entera indican el plano del corte que está en relación con cada una de las superficies seccionadas. De modo similar, los cortes diferentes a través de un corpúsculo renal, que también es una estructura esférica, muestran diferencias en cuanto a su aspecto. El tamaño y el aspecto de la estructura interna son un reflejo del plano del corte.



diferentes. Obsérvense las grandes diferencias en cada corte del corpúsculo renal. Mediante el examen de varios de estos cortes bidimensionales es posible imaginar la configuración tridimensional de la estructura examinada.

### **En todas las etapas de la preparación de los tejidos pueden generarse artefactos en los preparados histológicos**

Para la realización de un preparado histológico es necesario seguir una serie de pasos que comienza con la recolección de la muestra y termina con la colocación del cubreobjetos. En cada paso puede introducirse un **artefacto** (un error en el proceso de preparación). Por lo general los artefactos que aparecen en el preparado terminado están vinculados con la metodología, el equipo o los reactivos usados durante la preparación. La poca pureza de las sustancias químicas y los reactivos utilizados en el proceso (fijadores, reactivos y colorantes), las imperfecciones en la ejecución de la metodología (intervalos de fijación, deshidratación, inclusión y coloración demasiado cortos o demasiado largos o descuidos en el montaje o la colocación del cubreobjetos) o el equipo inadecuado (un micrótopo con una cuchilla desafilada) pueden producir artefactos en el preparado final. Es importante que los estudiantes adviertan que no todos los preparados de su colección son perfectos y que estén familiarizados con los artefactos más frecuentes.

### **Otros sistemas ópticos**

Además del microscopio de campo claro, que se usa habitualmente para el examen de rutina de los preparados histológicos, en los laboratorios clínicos y de investigación se aplican otros sistemas ópticos que se describirán a continuación. Algunos se utilizan para aumentar el contraste sin necesidad de teñir (como el microscopio de contraste de fase); otros están diseñados para ver las estructuras mediante el uso de técnicas especiales como la inmunofluorescencia (microscopios de fluorescencia y confocal).

### **El microscopio de contraste de fase permite el examen de células y tejidos no teñidos y es de especial utilidad para estudiar células vivas**

El microscopio de contraste de fase aprovecha las pequeñas diferencias en el índice de refracción que hay en diferentes partes de una muestra de células o tejidos. La luz que atraviesa regiones de índice de refracción mayor (regiones más densas) se refracta y queda fuera de fase con respecto al haz luminoso principal. El microscopio de contraste de fase añade otras longitudes de onda cuya salida de fase se ha inducido mediante una serie de anillos ópticos en las lentes condensadora y objetivo, con lo que en esencia se cancela la amplitud

de la porción del haz refractada inicialmente y se produce contraste en la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las regiones densas de la muestra mientras que las partes claras corresponden a regiones menos densas. Por lo tanto, el microscopio de contraste de fase sirve para examinar células y tejidos vivos, como los de cultivo, y también se usa mucho para estudiar cortes semifinos no teñidos (de alrededor de 0,5  $\mu\text{m}$ ) de material incluido en plástico.

Dos modificaciones del microscopio de contraste de fase son el **microscopio de interferencia**, que también permite cuantificar masa hística, y el **microscopio de interferencia diferencial** (con óptica de Nomarski), que es de especial utilidad para evaluar las propiedades de la superficie de las células y otras muestras biológicas.

### **En la microscopia de campo oscuro la lente objetivo no capta luz directa proveniente de la fuente luminosa**

En el *microscopio de campo oscuro* sólo los rayos de luz refractados por las estructuras de la muestra penetran en el objetivo. Para lograr esto el microscopio está provisto de un condensador especial que ilumina el preparado con mucha intensidad y en forma muy oblicua. Así, el campo se ve oscuro y sobre él se destacan pequeñas partículas de la muestra que reflejan parte de la luz y aparecen brillantes.

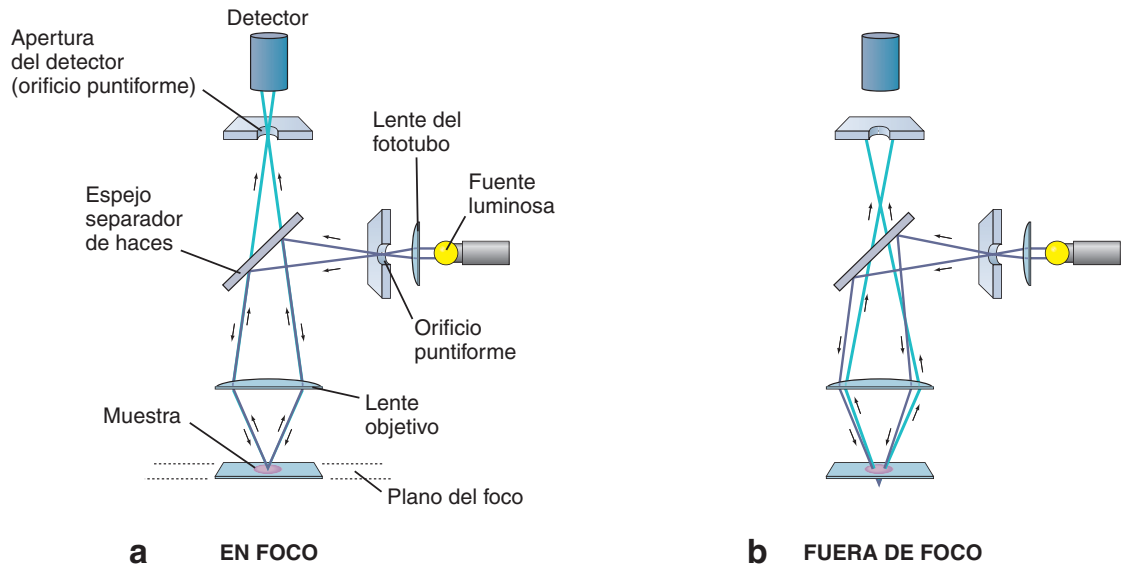
El efecto es similar al que producen las partículas de polvo en el haz luminoso de un proyector de diapositivas cuando la habitación está oscura. La luz reflejada por las partículas de polvo alcanza la retina del ojo y eso permite verlas como puntos brillantes.

La resolución del microscopio de campo oscuro no puede ser mejor que la del microscopio de campo claro, dado que ambos usan luz de la misma longitud de onda. No obstante, como consecuencia del mayor contraste obtenido, en las imágenes de campo oscuro pueden detectarse partículas más pequeñas.

En la investigación este microscopio se utiliza para examinar preparados radioautográficos, en los cuales los gránulos de plata revelados aparecen blancos sobre un fondo oscuro. En cambio, en la práctica clínica es útil para la detección de cristales (p. ej., de oxalato o ácido úrico) en la orina, y para la identificación de espiroquetas, en particular *Treponema pallidum*, el microorganismo causante de la sífilis, una enfermedad de transmisión sexual.

### **El microscopio de fluorescencia aprovecha la capacidad de ciertas moléculas de fluorescer bajo la luz ultravioleta**

Una molécula que fluoresce emite luz de longitudes de onda dentro del espectro visible cuando es expuesta a una fuente de luz ultravioleta (UV). El **microscopio de fluorescencia** se utiliza para la detección de moléculas con fluorescencia natural (autofluorescencia), como



**FIGURA 1.12. Diagrama de la luz emitida “en foco” y “fuera de foco” en el microscopio confocal. a.** Este diagrama muestra el trayecto del haz láser y de la luz emitida cuando la estructura formadora de imágenes está directamente en el foco de la lente. La pantalla con un orificio puntiforme al otro lado del sistema óptico del microscopio confocal permite que la luz de la estructura en foco atraviese el orificio. Luego programas informáticos traducen la luz en una imagen. Dado que el punto focal de la lente objetivo del microscopio forma una imagen nítida a la altura en la que está el orificio puntiforme, estos dos puntos reciben el nombre de puntos confocales. **b.** Este diagrama muestra el trayecto del haz láser y de la luz emitida, que está fuera de foco en relación con el orificio puntiforme. En consecuencia, la luz de la muestra bloqueada por el orificio nunca se detecta.

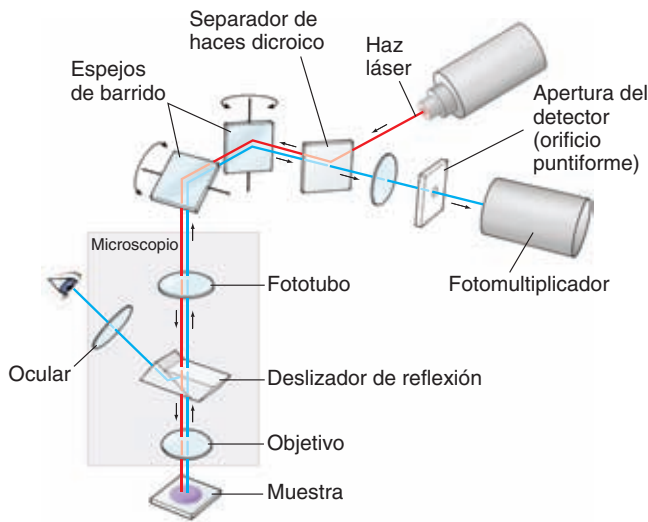
la vitamina A y algunos neurotransmisores. Sin embargo, dado que las moléculas autofluorescentes no son muchas, la aplicación principal de este microscopio consiste en estudiar la fluorescencia secundaria, como cuando se quieren detectar antígenos o anticuerpos en las técnicas de inmunocitoquímica (véase fig. 1.7). Las moléculas fluorescentes específicas también pueden inyectarse en un animal o directamente en las células y luego usarse como marcadores. Estos métodos han resultado útiles en el estudio de las uniones intercelulares (del tipo de los nexos), en la investigación del trayecto de las fibras nerviosas en neurobiología y en la detección de marcadores fluorescentes del crecimiento de los tejidos mineralizados.

Entre la fuente luminosa UV y la muestra se colocan varios filtros para producir luz monocromática (de una sola longitud de onda) o casi monocromática (longitud de onda de banda estrecha). Un segundo conjunto de filtros colocados entre la muestra y el objetivo permite que sólo la estrecha banda de longitud de onda de la fluorescencia llegue al ojo, a una emulsión fotográfica o a otro procesador analítico.

**El microscopio confocal de barrido combina componentes de un microscopio óptico de campo claro con un sistema de barrido para diseccionar ópticamente una muestra**

visualización de una muestra biológica en tres dimensiones. Las dos lentes del microscopio confocal (objetivo y fototubo) están alineadas en forma perfecta para enfocar la luz proveniente del punto focal de una lente en el punto focal de la otra lente. La diferencia principal entre un microscopio convencional y uno confocal es la adición de una apertura de detector (orificio puntiforme) que está en **conjunción** con el punto **focal** de la lente; por lo tanto es **confocal**. Este orificio de posición precisa sólo permite que pase la luz “en foco” hacia el interior del dispositivo fotomultiplicador (detector), mientras que la luz “fuera de foco” tiene bloqueado el paso hacia el detector (fig. 1.12). Este sistema tiene la capacidad de obtener una resolución (0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ ) y una claridad excepcionales de un corte fino de una muestra biológica simplemente por el rechazo de la luz fuera de foco. El sistema de iluminación láser que utiliza es fuertemente convergente y en consecuencia produce una luz excitadora de gran intensidad en la forma de un punto de barrido muy superficial. Un sistema de espejos mueve el haz láser sobre la muestra de manera que se ilumine un solo punto a la vez (fig. 1.13). Se exploran muchos puntos individuales en el mismo plano focal y un programa informático reconstruye la imagen a partir de los datos registrados durante la exploración. En este aspecto, la microscopia confocal se parece a la tomografía computarizada (TC).

Por otra parte, al usar sólo la profundidad escasa de



**FIGURA 1.13. Estructura del microscopio confocal y diagrama del trayecto de los rayos.**

La fuente luminosa del microscopio confocal es un generador láser. El haz láser (línea roja) que se dirige hacia la muestra de tejido atraviesa un separador de haces dicroico y luego pasa por dos espejos de barrido móviles; estos espejos barren el haz láser por la muestra en las coordenadas  $x$  e  $y$ . Por último, el haz láser entra en el microscopio y atraviesa su sistema óptico para iluminar la muestra de tejido que se desea examinar. La luz emitida por la muestra de tejido iluminada (línea azul) retorna por el sistema óptico del microscopio, pasa por ambos espejos de barrido, atraviesa el separador de haces y se enfoca en el orificio puntiforme. La luz que atraviesa este orificio es captada y registrada por el dispositivo detector conectado a un ordenador que forma la imagen, un pixel a la vez.

la imagen en foco es posible crear imágenes múltiples de distintas profundidades de la muestra. Por ejemplo, literalmente se puede así diseccionar capa por capa todo el espesor de la muestra. También es posible utilizar el ordenador para realizar reconstrucciones tridimensionales de una serie de estas imágenes. Dado que cada imagen individual de profundidades específicas dentro de la muestra es muy nítida, la imagen tridimensional resultante tiene iguales características de nitidez. Además, una vez que el ordenador ha armado cada una de las imágenes de los cortes, la reconstrucción tridimensional puede rotarse y verse desde cualquier ángulo que se desee (véase fig. 1.5).

**El microscopio de luz ultravioleta utiliza lentes de cuarzo con una fuente de luz ultravioleta**

En el *microscopio de luz ultravioleta (UV)* la imagen depende de la absorción de la luz UV por las moléculas de la muestra. La fuente UV tiene una lon-

gitud de onda aproximada de 200 nm, por lo que este microscopio puede alcanzar una resolución de 0,1  $\mu\text{m}$ . En principio la microscopia UV tiene un funcionamiento semejante al de un espectrofotómetro, pero los resultados se registran en una placa fotográfica. La muestra no puede inspeccionarse en forma directa a través del ocular porque la luz UV no es visible y lesiona el ojo.

La microscopia de luz UV es útil para detectar ácidos nucleicos, en especial las purinas y las pirimidinas que son las bases nitrogenadas de los nucleótidos. También es útil para detectar las proteínas que contienen ciertos aminoácidos. Con una iluminación con longitudes de onda específicas habitualmente se realizan procedimientos espectrofotométricos a través del microscopio UV para determinar la cantidad de DNA y RNA en células individuales. Como se describió en la página 8, este método se utiliza en la práctica clínica para evaluar el grado de ploidía (múltiplos de la cantidad normal de DNA) en cortes de tumores.

**El microscopio de polarización tiene su fundamento en el hecho de que las moléculas o los conjuntos de moléculas muy bien ordenadas pueden rotar el ángulo del plano en que vibra la luz polarizada**

El *microscopio de polarización* o *de luz polarizada* es una simple modificación del microscopio óptico de campo claro en la que se coloca un filtro de polarización llamado *polarizador*, entre la fuente luminosa y la muestra y se instala un segundo filtro, llamado el *analizador*, entre la lente objetivo y el observador.

Tanto el polarizador como el analizador pueden rotarse; la diferencia entre sus ángulos de rotación se utiliza para determinar el grado en el que una estructura afecta el haz de luz polarizada. La capacidad de los cristales o las sustancias paracristalinas de rotar el plano de la luz polarizada recibe el nombre de *birrefringencia* (refracción doble). El músculo estriado y las inclusiones cristaloides en las células intersticiales (de Leydig) del testículo, entre otras estructuras comunes, exhiben birrefringencia.

**Microscopia electrónica**

Hay dos tipos de microscopios electrónicos que proporcionan datos morfológicos y analíticos de células y tejidos: el *microscopio electrónico de transmisión (MET)* y el *microscopio electrónico de barrido (MEB)*. El adelanto principal de la microscopia electrónica respecto de la microscopia óptica es que la longitud de onda del haz de electrones es unas 2 000 veces menor que la del haz de luz, con lo que aumenta la resolución por un factor de  $10^3$ .

## El MET utiliza la interacción de un haz de electrones con la muestra para producir una imagen

En principio la “óptica” del MET es similar a la del microscopio óptico (véase fig. 1.10), excepto que el MET utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz. El principio del microscopio es el siguiente:

- Una *fente*, como es un filamento de tungsteno calentado, emite electrones (*cátodo*).
- Los electrones son atraídos hacia un *ánodo*.
- Una diferencia eléctrica entre el cátodo y el ánodo imparte un voltaje de aceleración de entre 20 000 y 200 000 voltios a los electrones, con lo que se genera un haz.
- Este haz de electrones atraviesa luego una serie de *lentes electromagnéticas* que cumplen la misma función que las lentes de cristal de un microscopio óptico.

La *lente condensadora* da forma al haz de electrones que alcanza el plano de la muestra y cambia su diámetro. Entonces el haz que ha atravesado la muestra es enfocado y aumentado por una *lente objetivo* para después volver a ser aumentado por una *lente proyectora* o más de ellas. La imagen final se mira en una *pantalla* fosforescente. Las partes de la muestra que han sido atravesadas por los electrones aparecen claras; las partes que han absorbido y dispersado los electrones a causa de su densidad inherente o de la adición de metales pesados durante la preparación aparecen oscuras. Por arriba o por debajo de la pantalla visora se puede colocar una placa fotográfica o un detector de vídeo para registrar la imagen de la pantalla de modo permanente.

**La preparación de las muestras para la microscopía electrónica de transmisión es similar a la de la microscopía óptica excepto por la necesidad de métodos más refinados**

Los principios utilizados en la preparación de los cortes para su examen con el MET son esencialmente los mismos que los que se emplean para la microscopía óptica con la restricción de que en cada paso se debe trabajar con muestras 3 a 4 veces más pequeñas o más delgadas que las habituales para la microscopía óptica. El MET, cuyo haz de electrones tiene una longitud de onda de alrededor de 0,1 nm, posee una resolución teórica de 0,05 nm.

Dada la excepcional resolución del MET, la calidad de la fijación, es decir el grado de conservación de la estructura subcelular, tiene que ser la mejor que se pueda conseguir.

**La preparación de rutina de las muestras para la microscopía electrónica de transmisión comienza con la fijación en glutaraldehído seguida por un enjuague en una solución amortiguadora (buffer) y la fijación con tetróxido de osmio**

El glutaraldehído, un dialdehído, preserva las proteínas al establecer enlaces cruzados entre ellas; el tetróxido de osmio reacciona con los lípidos, en particular los fosfolípidos. El osmio también imparte densidad electrónica a las estructuras celulares e hísticas porque es un metal pesado, lo cual mejora la formación ulterior de la imagen en el MET.

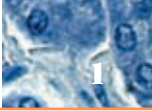
Lo ideal sería que los tejidos se perfundieran con glutaraldehído amortiguado antes de extirparse del animal. Pero lo más común es que para el MET se fijen piezas de no más de 1 mm<sup>3</sup> (muy pequeñas si se las compara con las piezas para el microscopio óptico, que pueden medirse en centímetros). El proceso de deshidratación es el mismo que para la microscopía óptica y el tejido se infiltra con una resina monomérica, en general una resina epoxi, que luego se polimeriza.

**El tejido incluido en plástico se corta en micrótomos de diseño especial que poseen cuchillas de diamante**

Dado el poder de penetración limitado de los electrones, el espesor de los cortes para la MET de rutina oscila entre 50 nm y no más de 150 nm. Además, como los abrasivos utilizados para afilar las cuchillas de acero dejan rayas inaceptables en los cortes para el MET, en lugar de estas se usan cuchillas de diamante con un afilado casi perfecto. Los cortes obtenidos con la cuchilla de diamante son demasiado finos como para manipularlos; se los hace flotar desde el borde de la cuchilla hacia la superficie de una cubeta llena de líquido y se los recoge sobre rejillas de cobre revestido en plástico. Las rejillas o grillas poseen 50 a 400 orificios por pulgada o ranuras especiales para ver cortes seriados. El haz de electrones atraviesa primero los orificios de la rejilla de cobre y después la muestra y luego la imagen se enfoca en la pantalla visora o en película fotográfica.

**La tinción de rutina de los cortes para la microscopía electrónica de transmisión es necesaria para aumentar el contraste inherente de manera que los detalles de la estructura celular sean fáciles de ver y fotografiar**

En general los cortes para la MET se tiñen mediante la adición a la muestra de materiales de gran densidad, como los iones de metales pesados. Los iones de metales pesados pueden unirse a los tejidos durante la fijación o la deshidratación o por la inmersión de los cortes, una vez realizados, en soluciones de estos iones. El tetróxido de osmio, usado de rutina como



fijador, se une a los componentes fosfolipídicos de las membranas, con lo que estas adquieren una densidad adicional.

Con frecuencia se añade nitrato de uranilo a las soluciones alcohólicas usadas en la deshidratación para aumentar la densidad de los componentes de las uniones intercelulares y de otros sitios. La inmersión secuencial en soluciones de acetato de uranilo y citrato de plomo se usa de rutina para teñir los cortes antes de verlos con el MET y para obtener microfotografías electrónicas de mayor contraste y mejor resolución.

A veces se necesitan tinciones especiales para visualizar los resultados de las reacciones histoquímicas o inmunocitoquímicas con el MET. Los procedimientos para fosfatasas y estererasas se usan con este propósito (véase fig. 1.4). La sustitución del colorante fluorescente que ha sido conjugado con un anticuerpo por un compuesto con un metal pesado ha permitido la adaptación de las técnicas inmunocitoquímicas a la MET. De un modo similar, las técnicas de radioautografía de rutina se han ajustado para su uso con el MET (véase fig. 1.9b). Estos métodos han sido particularmente útiles para determinar las fuentes celulares y las vías intracelulares de ciertos productos de secreción, la distribución sobre la superficie celular de receptores específicos y la ubicación intracelular de sustratos y fármacos ingeridos.

**La criofractura es una técnica especial de preparación de las muestras para microscopia electrónica de transmisión, de importancia especial en el estudio de las membranas**

El tejido que se va a examinar puede ser fijado o no; si lo ha fijado se elimina el fijador de la muestra antes de proseguir. Se deja que un crioprotector (p. ej., glicerol) infiltre el tejido y luego se lo congela rápidamente

**Recuadro 1.5 Consideraciones funcionales: desarrollo de la microscopia electrónica**

Los principios electrónicos tanto del MET como del MEB son semejantes a los de un tubo de rayos catódicos (TRC), como por ejemplo el que se usa en los televisores y en los monitores las computadoras. En efecto, los primeros microscopios electrónicos, construidos a principios de la década de 1930, fueron creados en forma independiente en varios países por científicos e ingenieros que trabajaban en el desarrollo de la televisión. Aunque en la década de 1930 el microscopio electrónico permitió estudiar algunos virus y otros materiales paracrystalinos desecados, recién en la década de 1950, se desarrollaron métodos de fijación, inclusión y corte adecuados que permitieron aplicar el MET como elemento de rutina en la investigación biológica.

a unos  $-160^{\circ}$  C. La formación de cristales de hielo se evita mediante el uso de los crioprotectores, la congelación rápida y el empleo de muestras diminutas. El tejido congelado se coloca en el aparato de criofractura, que posee una cámara de vacío, y se percute con el borde de una cuchilla o navaja.

**El plano de fractura pasa preferencialmente a través de la parte hidrófoba de la membrana plasmática, de manera que queda expuesto su interior**

La fractura resultante de la membrana plasmática produce dos superficies nuevas. La superficie de la membrana que atrás tiene el espacio extracelular se llama *cara E*; la cara que tiene atrás el protoplasma (citoplasma) se llama *cara P*. Luego la muestra se cubre típicamente con una capa de platino evaporado para crear una réplica de la superficie de fractura. El tejido se elimina y la réplica de la superficie, no el tejido mismo, se coloca sobre la rejilla para su estudio con el MET. En estas réplicas pueden verse detalles de la organización molecular (véase fig. 2.5, p. 34).

**En la microscopia electrónica de barrido el haz de electrones no atraviesa la muestra sino que explora (“barre”) su superficie**

En muchos aspectos el MEB se parece más a un tubo de televisor que al MET. Para el examen de la mayoría de los tejidos la muestra se fija, se deshidrata por desecación de punto crítico, se cubre con una película de oro-carbono evaporados, se monta en un soporte de aluminio y se coloca en la cámara para muestras del MEB. En el caso de los tejidos mineralizados es posible eliminar todas las partes blandas con un removedor y estudiar los detalles estructurales del mineral.

El barrido se consigue con el mismo tipo de exploración que hace recorrer el haz electrónico sobre la superficie de un tubo de televisión. Los electrones reflejados por la superficie (*electrones retrodispersados*) y los electrones que son expulsados desde la superficie (*electrones secundarios*) son recogidos por un detector o más y reprocesados para formar una imagen de tipo tridimensional en un TRC (tubo de rayos catódicos) de alta resolución.

Luego se pueden tomar fotografías del TRC para registrar los datos o la imagen puede grabarse en cinta de vídeo. Se pueden usar otros detectores para medir los rayos X emitidos desde la superficie, la catodoluminiscencia de moléculas en el tejido debajo de la superficie y los electrones Auger emitidos en la superficie.

**El microscopio electrónico de transmisión-barrido combina características del MET y del MEB para permitir el microanálisis de rayos X por sonda electrónica**

La configuración del MEB puede usarse para producir una imagen de transmisión si se inserta un por-

tarrejillas a la altura de la muestra, se recogen los electrones transmitidos con un detector y se reconstruye la imagen en un TRC. Esta última configuración de un MEB o un microscopio electrónico de transmisión-barrido (METB) facilita el uso del instrumento para el *microanálisis de rayos X por sonda electrónica*.

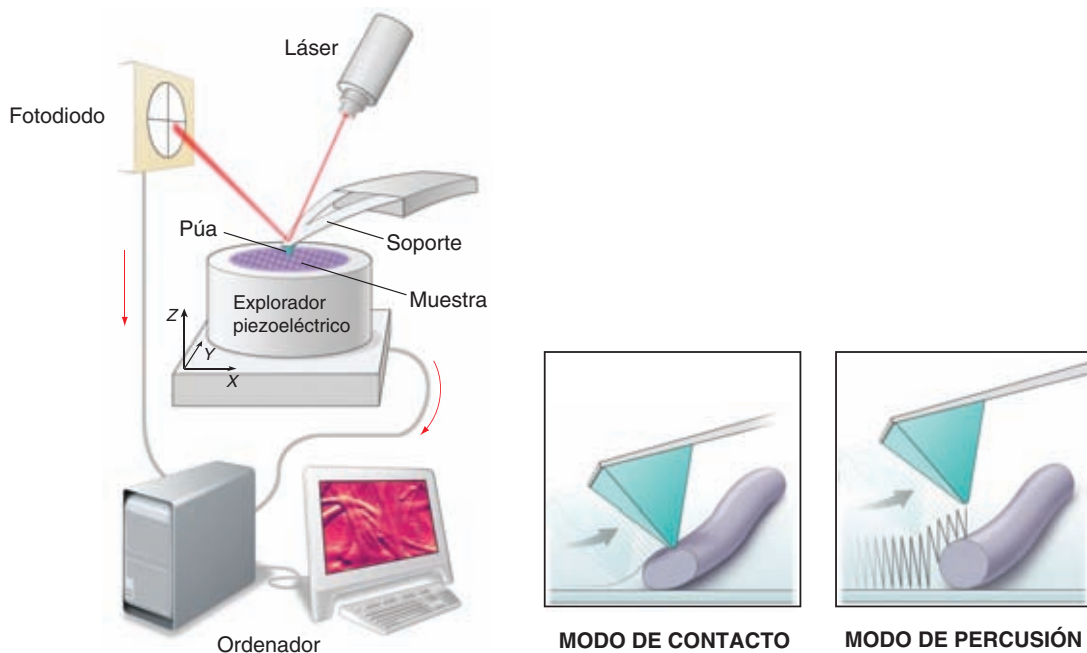
El microscopio se puede equipar con detectores para recoger los rayos X emitidos cuando el haz de electrones bombardea el corte y, mediante el uso de analizadores adecuados, se puede confeccionar un mapa que muestre la distribución en los cortes de los elementos con un número atómico superior a 12 y una concentración suficiente para producir bastante cantidad de rayos X para analizar. También pueden deducirse datos semicuantitativos para los elementos que haya en concentración suficiente. Por ende, además de ser usados como instrumentos "ópticos" tanto el MET como el MEB pueden convertirse en herramientas analíticas sofisticadas.

## Microscopia de fuerza atómica

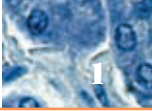
**El microscopio de fuerza atómica se ha convertido en uno de los instrumentos más poderosos para el estudio de la topografía superficial con resolución molecular y atómica**

Uno de los microscopios más nuevos que ha demostrado ser muy útil para los estudios biológicos es el *microscopio de fuerza atómica (MFA)*. Se trata de un microscopio no óptico que funciona en la misma forma que los pulpejos de los dedos, que tocan y sienten la piel de nuestra cara que no podemos ver. La sensación captada por los pulpejos de los dedos es procesada por nuestro cerebro, que tiene la capacidad de deducir la topografía superficial de la cara mientras los dedos la tocan.

En el MFA una sonda puntiaguda muy fina (púa), que en su extremo se aproxima al tamaño de un solo átomo, explora la muestra mientras sigue líneas parale-



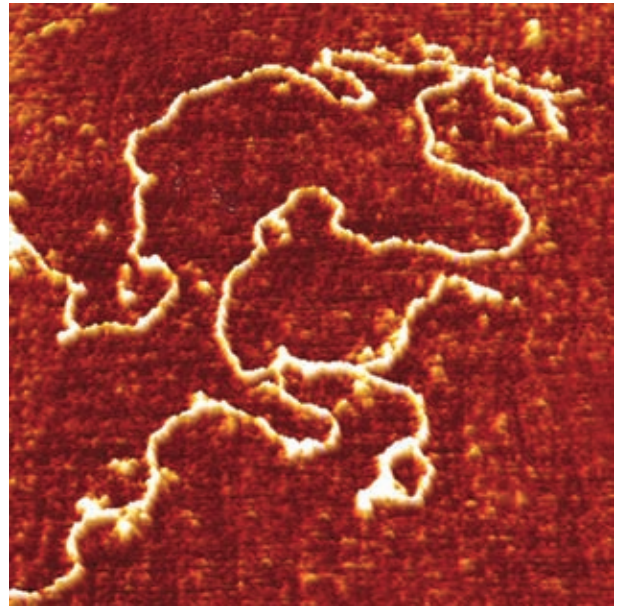
**FIGURA 1.14. Diagrama del microscopio de fuerza atómica (MFA).** Una púa muy fina en un soporte móvil se desplaza sobre la superficie de una muestra biológica. El mecanismo de retrocontrol provisto por los exploradores piezoeléctricos permite que la púa se mantenga con una fuerza constante sobre la superficie de la muestra. La púa se extiende hacia abajo desde el extremo de un soporte reflector de láser. Sobre el soporte hay un haz láser enfocado. A medida que la púa explora la superficie de la muestra, subiendo y bajando por su contorno, el haz láser se desvía desde el soporte hacia un fotodiodo. El fotodiodo mide los cambios de las intensidades del haz láser y luego convierte esta información en una corriente eléctrica. Un ordenador o computadora procesa la información recuperada desde el fotodiodo para formar una imagen de la superficie y también para regular el explorador piezoeléctrico. En el modo de contacto (detalle de la izquierda), las fuerzas electrostáticas o de tensión superficial arrastran la púa exploradora sobre la superficie de la muestra. En el modo de percusión (detalle de la derecha), la púa del soporte oscila. Este último modo permite el estudio de muestras blandas y frágiles al mismo tiempo que consigue una resolución alta.



las a lo largo del eje *x* y repite la exploración con intervalos breves a lo largo del eje *y*. La púa fina está montada en el extremo de un soporte muy flexible para que desvíe el soporte conforme encuentra la “fuerza atómica” en la superficie de la muestra (fig. 1.14). La superficie superior del soporte es reflectora y un haz láser se dirige desde allí hacia un diodo. Esta distribución actúa como una “palanca óptica” porque las desviaciones muy pequeñas del soporte se magnifican mucho en el diodo. El MFA puede funcionar con la púa del soporte tocando la muestra (modo de contacto) o la púa puede dar golpecitos a través de la superficie (modo de percusión) como el bastón de un ciego (fig. 1.14, detalles).

Conforme la púa sube o baja en el eje *z* mientras atraviesa la muestra, los movimientos se registran en el diodo como movimientos del haz láser reflejado. Un dispositivo piezoeléctrico situado debajo de la muestra se activa en un circuito de retrocontrol sensible con el diodo para subir o bajar la muestra de modo que el haz láser se centre en el diodo. Conforme la púa se hunde en una depresión el dispositivo piezoeléctrico eleva la muestra para compensar y cuando la púa se eleva sobre una eminencia el dispositivo compensa bajando la muestra. La corriente hacia el dispositivo piezoeléctrico se interpreta como el eje *z*, que junto con los ejes *x* e *y* presenta la topografía de la muestra con una resolución molecular y, a veces, atómica (fig. 1.15).

Una ventaja importante del MFA para el examen de las muestras biológicas es que a diferencia de lo que sucede con los instrumentos ópticos de alta resolución (p. ej., MET o MEB), la muestra no tiene que estar en el vacío, incluso puede estar en el agua. Por lo tanto, es posible obtener imágenes de células vivas y de su medio circundante.



**FIGURA 1.15. Imagen de microscopio de fuerza atómica de una molécula de DNA individual.**

Esta imagen se obtuvo en el modo de contacto, en el cual la púa exploradora sube y baja desplazada por las anfractuosidades del “terreno” conforme se mueve hacia adelante y hacia atrás sobre la superficie de la muestra. La muestra está colocada sobre una superficie de mica ultralisa. Una molécula individual de DNA produce una eminencia suficiente para ser detectada con facilidad. Los engrosamientos a lo largo de la molécula de DNA son causados por las proteínas unidas a ella y estos engrosamientos producen un movimiento aun mayor de la púa exploradora. El campo de exploración mide 540 nm por 540 nm. La longitud de la molécula de DNA oscila entre 0 y 40 nm. 185 000 ×. (Gentileza de la Dra. Gabriela Bagordo, JPK Instruments AG Berlín, Alemania.)