

ACTIVIDADES PRÁCTICAS
TÉCNICAS INSTRUMENTALES BÁSICAS
Área de Biología Celular

PROFESORES

Alfonsa García Ayala (Coordinadora)

M^a Teresa Elbal Leante

Pilar Sepulcre García

Curso 2010-2011

Las actividades prácticas de la asignatura “**Técnicas Instrumentales Básicas**” (Área de Biología Celular) consisten en instruir a los alumnos de 1º de Biotecnología en las técnicas microscópicas que permiten el estudio de las características celulares y moleculares de los tejidos partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de un vegetal. Estas técnicas preparan las muestras para su observación con el microscopio, bien sea electrónico u óptico. El primero permite un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales, mientras que el segundo, con menor poder de resolución, ofrece una gran variedad en cuanto al modo de observar las células: fluorescencia, contraste de fases, microscopio de luz, etc. La técnica utilizada, en cada momento, dependerá de la característica morfológica que queramos estudiar. En el siguiente esquema se muestra el método comúnmente empleado para el procesamiento de las muestras. Sin embargo no debemos olvidar que existen múltiples variantes ya que por ejemplo se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni de hacer cortes o se pueden incluir células en suspensión que hayan sido previamente cultivadas *in vitro*.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS: TEJIDO/ÓRGANO

Fijación e inclusión

BLOQUE DE PARAFINA O DE RESINA

Microtomía: obtención de secciones

Montaje de las preparaciones

PREPARACIÓN: PORTAOBJETOS O REJILLA

Tinciones convencionales. Contraste

Técnicas histoquímicas

Técnicas inmunocitoquímicas

ESTUDIO MICROSCÓPICO ÓPTICO O ELECTRÓNICO DE TRANSMISIÓN

PRÁCTICA 1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

A. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA.

1. Conocer la normativa oficial sobre la experimentación animal.
2. Conocer los requerimientos de un laboratorio de microscopía.
3. Ser capaz de obtener órganos animales y vegetales para su estudio microscópico. Realizar la observación macroscópica de los órganos.
4. Comprender el concepto de fijación.
5. Realizar un frotis de sangre.

B. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

La LEY 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio (BOE de 8 de noviembre de 2007) incluye el uso de animales vertebrados con fines docentes. En ella se dice que *“se permiten los métodos admitidos en la práctica moderna (métodos humanitarios) para el sacrificio y para la identificación de los animales”*. La DGXI de la Comisión europea ha establecido las bases para el *“killing of an animal with a minimum of physical and mental suffering, depending on the species”*.

El **trabajo en un laboratorio de microscopía** se ajusta a una serie de reglas básicas de funcionamiento de tipo general, como en cualquier otro laboratorio o sala de prácticas, y una serie de normas específicas. Estas normas consisten en:

- Mantener la máxima limpieza y orden.
- Elaborar un plan de trabajo que nos permita el acceso a los equipos y reactivos de trabajo necesarios así como el ajuste del tiempo.
- Utilizar un cuaderno de trabajo.
- Utilizar guantes, mascarilla y cabina extractora de gases como protección frente a productos tóxicos.
- Seguir las normas de uso de los reactivos. No oler, inhalar o probar.
- Tirar el material desechable (pipetas, puntas, papel de filtro, etc.) en los contenedores adecuados y lavar adecuadamente el material reutilizable.
- No dejar recipientes abiertos y sin etiquetar.
- No hacer nada que nos plantee dudas.

La **obtención de muestras** es un proceso que se ha de realizar con sumo cuidado, precisión y rapidez siguiendo unas normas éticas básicas, como ya hemos comentado anteriormente. Las muestras de origen animal se obtienen, normalmente, mediante la disección del animal objeto de estudio. En ocasiones se pueden extraer las muestras por punción o mediante cirugía. En el caso de las muestras de origen vegetal, en general, éstas se

recogen mediante procesos menos traumáticos aunque, en cualquier caso, se debe recoger solo el material necesario, intentando no dañar irreversiblemente la planta. Los estudios microscópicos se realizan, en la mayor parte de los casos, a partir de muestras tomadas de seres vivos las cuales suelen ser química y físicamente inestables. Para preservar la estructura y la composición química de las muestras debemos detener inmediatamente todos los procesos vitales antes de que éstos lleven a procesos de degradación como la autólisis (acción de enzimas intracelulares, es decir, autodigestión) y se produzca la putrefacción bacteriana de los tejidos.

La **fijación** permite que los tejidos, una vez extraídos, se mantengan en un estado lo más próximo posible al estado vivo, intentando mantener su estructura y composición química. Hay que tener en cuenta que el procesamiento posterior de las muestras, para poner de manifiesto y observar determinadas estructuras, supone una metodología que puede degradar las estructuras tisulares. Así, los fijadores deben proteger frente a ataques bacterianos, evitar autólisis, insolubilizar elementos solubles que se quieran estudiar, evitar distorsiones y retracciones tisulares, penetrar en el tejido y modificarlo para poder llevar a cabo tinciones específicas posteriores, si es necesario, etc.

No existe un fijador universal ni un método de fijación único. Todos los métodos de fijación tienen ventajas e inconvenientes, por eso debemos escoger aquel que mejor se adapte al estudio que deseamos realizar (microscópico óptico o ultraestructural), al tipo de muestra a estudiar y a la técnica de tinción que, posteriormente, se vaya a emplear. Por ejemplo si queremos estudiar actividades enzimáticas debemos usar un fijador que no nos altere el centro activo de la enzima y quizás, para ello, tengamos que sacrificar en cierta medida la morfología tisular o si queremos teñir un determinado componente celular difícilmente teñible quizás debamos usar un fijador que lo modifique para que sea más fácilmente reconocido por los colorantes.

En cualquier caso hay dos propiedades de los fijadores que debemos tener en cuenta a la hora de decidir el fijador que vamos a utilizar:

- *la velocidad de penetración*. El proceso de fijación ha de ser rápido y la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es un factor determinante. Se trata del espesor del tejido atravesado en 1 hora y condiciona el tamaño de la muestra que queremos fijar.
- *la velocidad de fijación*. Esta característica no depende de la velocidad de difusión del fijador sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que las muestras han de pasar en el fijador.

Además hay otra serie de características de los fijadores que hay que tener en cuenta:

- *endurecimiento*. Los fijadores, en general, endurecen los tejidos dependiendo del tipo de fijador y del tiempo de exposición en el fijador.
- *Ósmosis y pH*. Se deben evitar los cambios de volumen en las células producidos por una diferencia de osmolaridad entre el tejido y el fijador. Normalmente se usan soluciones tamponadas a un pH semejante al del tejido e isoosmóticas con dicho tejido. Este efecto es especialmente importante en microscopía electrónica de transmisión.
- *Efecto mordiente*. Algunas estructuras celulares tienen poca afinidad por los colorantes por lo que son difíciles de poner de manifiesto. Algunos fijadores, además de fijar, modifican químicamente a ciertas estructuras celulares que permiten que se unan a los colorantes.
- *Artefactos*. La fijación puede provocar alteraciones titulares como variaciones morfológicas, cristalización de compuestos, desplazamiento de sustancias que debemos tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados.

Hay métodos de fijación:

- *físicos* como el calor, el más sencillo, o la congelación que se utiliza para evitar la eliminación de los lípidos o para mantener activas algunas proteínas (enzimas). En general se utilizan cuando los fijadores químicos alteran la estructura que queremos observar o cuando se necesita una fijación muy rápida. Existen algunas variantes como la criodesecación o liofilización y la criosustitución.
- *químicos* que utilizan soluciones acuosas. La fijación por inmersión de la muestra en la solución fijadora es el más utilizado aunque también se puede realizar por perfusión; en este caso la solución fijadora se introduce a través del sistema circulatorio mediante el cual accede a todas las células del tejido gracias a la red de capilares. Siempre hay que tener en cuenta que el fijador debe entrar en contacto con el tejido lo más rápidamente posible.

Existe una amplia variedad de fijadores. Los fijadores más utilizados en los laboratorios de microscopía en la actualidad son:

- el líquido de Bouin y el paraformaldehído al 4% para los estudios de microscopía óptica. El líquido de Bouin es una mezcla fijadora que compensa las desventajas de los fijadores que lo forman, los cuales combinan de tal forma para que no se produzcan modificaciones en sus propiedades fijadoras originales. Está formado por ácido pícrico (glucógeno y lípidos), formol al 40% (lípidos y nucleoproteínas) y ácido acético glacial (ácidos nucleicos y nucleoproteínas). El formaldehído es un buen fijador para nucleoproteínas y lípidos.
- el glutaraldehído y el tetróxido de osmio para los estudios de microscopía electrónica de transmisión. El glutaraldehído fija las proteínas, por lo que preserva bien la

estructura celular, pero produce aldehídos artificiales. El tetróxido de osmio es un buen fijador de membranas celulares.

C. PROCEDIMIENTO.

1. Material necesario.

Cristalizador	Tijeras de punta fina
Algodón	Tijeras de punta roma
Guantes	Bisturíes
Anestésico (éter, cloroformo)	Pinzas
Tabla de disección	Casetes de inclusión
Alfileres de disección	Cera de dentista
Portaobjetos	Pipetas Pasteur
Tubos de ensayo con tampón	Gradillas porta-tubos
Pinceles	Tarros de cristal
Jeringuilla	

2. Líquidos fijadores.

2.1. Formol 10%: solución acuosa de formaldehído

- Formol comercial (40%).	10 ml
- Agua destilada	30 ml

2.2. Líquido de Bouin.

- Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 ml
- Formol comercial	25 ml
- Ácido acético glacial (se añade antes de usar)	5 ml

2.3. Glutaraldehído al 2'5% en tampón cacodilato 0'2 M (pH 7,2).

- Tampón cacodilato 0'2 M (pH 7'2):	
- Cacodilato sódico 3H ₂ O	42'8 g
- Agua destilada	hasta 1 L
- HCl 1 N (para ajustar el pH del tampón):	
- HCl	79'58 ml
- Agua destilada	hasta 1 L
- Glutaraldehído al 2'5% en tampón cacodilato 0'2 M (pH 7,2):	
- Glutaraldehído al 25%	10 ml
- Tampón cacodilato 0'2 M (pH 7'2)	hasta 100 ml

2.4. Líquido lavador.

- Tampón cacodilato 0'2 M (pH 7'2)	50 ml
- Sacarosa	5 g
- Agua destilada	50 ml

2.5. Tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0'2 M (pH 7'2).

- Tetróxido de osmio	0'1 g
- Tampón cacodilato 0'2 M (pH 7'2)	5 ml
- Agua bidestilada	5 ml

2.6. Etanol al 70%.

3. Muestras.

Las muestras que vamos a obtener son:

3.1. Muestras de origen animal: ratón albino.

- Sangre.
- Intestino y cerebro.

3.2. Muestras de origen vegetal: higuera, *Ficus carica*, hiedra, *Hedera helix*

- Peciolo.

4. Disección de un ratón.

Tras haber anestesiado el animal, con éter o cloroformo, se procede a su inmovilización, sujetando las extremidades con alfileres de disección, sobre la tabla de disección con la parte ventral hacia arriba. Se humedece la piel de la región abdominal con alcohol de 96% para facilitar su corte. A continuación se pinza y se levanta la piel abdominal, para realizar una incisión en la línea medio-ventral desde los orificios genitales hasta la altura de la boca, y se retira hacia los lados sujetándola con alfileres (Figura 1).

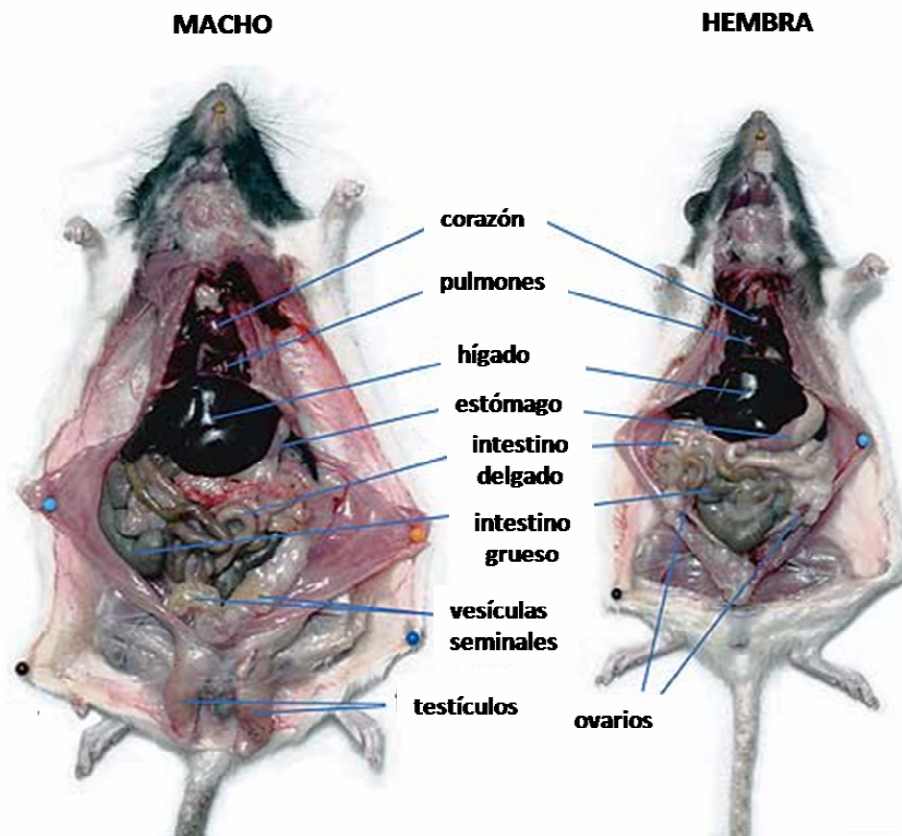


Figura 1. Disección de un ratón.

- **Región torácica.** En la región del tórax, por transparencia, se puede observar el corazón y los pulmones. Se pincha la aorta, con cuidado de no traspasarla, o una cavidad del corazón con una jeringuilla de insulina, previamente heparinizada, y se extrae un poco de sangre. Se deposita una gota de la muestra de sangre cerca del extremo de un portaobjetos limpio (Figura 2). Para extender la gota de sangre sobre el portaobjetos y formar una lámina delgada se coloca sobre ella otro portaobjetos inclinado que se desliza, sobre el primero, con un movimiento rápido y regular. Se puede controlar el grosor de la extensión variando el grado de inclinación del portaobjetos móvil: la capa es más delgada cuanto mayor sea el ángulo formado por ambas superficies. La extensión de sangre se deja secar a temperatura ambiente.

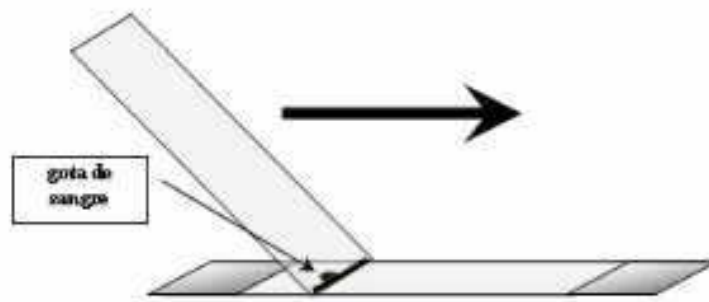


Figura 2. Realización de un frotis de sangre.

- **Región abdominal.** Se realiza una incisión en la línea media del plano muscular a lo largo de todo el abdomen manteniendo las tijeras de punta roma horizontales para no dañar las vísceras. Separar los dos labios de la incisión con unas pinzas y los sujetaremos con alfileres a ambos lados. Observar las vísceras abdominales: hígado con varios lóbulos, estómago, páncreas, bazo, paquete intestinal. Se obtendrán fragmentos de intestino delgado e intestino grueso para su estudio microscópico óptico y electrónico de transmisión.

- **Región craneal.** Se coloca el ratón con la cara dorsal hacia arriba y se hace una pequeña incisión de la piel a la altura del cuello que se continúa hasta el hocico. Estirar lateralmente la piel y coger la cabeza del ratón con el dedo pulgar y el medio para perforar el hueso craneal con cuidado. Con la ayuda de unas pinzas se va rompiendo el techo del cráneo hasta que quede al descubierto el bulbo olfatorio, los hemisferios cerebrales y la mayor parte del cerebelo. Se extrae el cerebro para el estudio de las células nerviosas con microscopía óptica.

5. Fijación.

El proceso de fijación varía dependiendo de la procedencia de las muestras y el tipo de estudio que se vaya a realizar:

5.1. Muestras de procedencia animal.

5.1.1. Los fragmentos de intestino delgado e intestino grueso obtenidos se colocan sobre placas de cera y son troceados de la siguiente forma:

- Fragmentos (2-3) de 1 cm³ que son rápidamente depositados en casetes de inclusión, previamente etiquetados con lápiz, e introducidos en el líquido de Bouin (24 horas) para su posterior estudio al microscópico óptico (MO).
- Uno de los fragmentos anteriores de intestino delgado se deposita sobre una gota de líquido fijador frío (glutaraldehído en tampón cacodilato a 4°C) en la placa de cera y troceado en fragmentos de 1 mm³ (10) que son recogidos con un pincel y depositados en un tubo de cristal, previamente etiquetado, que contiene el líquido fijador frío (3 horas) para su posterior estudio al microscopio electrónico de transmisión (MET).

- La solución fijadora se elimina con una pipeta Pasteur, con cuidado de no arrastrar los fragmentos de la muestra, y se añade líquido lavador durante 15 minutos a 4°C.

- A continuación, las muestras son post-fijadas con tetróxido de osmio al 1% en tampón cacodilato 0.2 M pH 7.2 a 4°C (1 hora) y nuevamente lavadas a 4°C. Se utiliza cabina con extractor de gases y mascarilla.

5.1.2. El cerebro se sumerge en un frasco con la solución de formol al 10% (24 horas) para su posterior estudio al MO.

5.2. Muestras de procedencia vegetal.

Fragmentos de 1-2 cm de longitud de peciolo de higuera o de hiedra se sumergen en frascos de cristal, previamente etiquetados, que contienen etanol al 70% (48 horas) para su posterior estudio al MO.

<Precauciones>

- La fijación ha de realizarse lo más rápidamente posible después de la extracción de las muestras.
- En el caso de muestras procedentes de intestino es conveniente limpiarlas antes de introducirlas en el fijador. Para ello se baña el fragmento extraído con una pipeta Pasteur con el mismo líquido fijador que vamos a utilizar.

D. PREGUNTAS DE EVALUACIÓN.

1. En que se basa la diferencia de tamaño en las muestras procesadas para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.
2. Diferencias del proceso de fijación para las muestras de MO y MET.
3. Indica que tipo de muestras has obtenido y en donde se encuentran.

PRÁCTICA 2. INCLUSIÓN, CORTE Y MONTAJE DE LAS MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ÓPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

A. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA.

1. Comprender el concepto de inclusión.
2. Diferenciar el proceso de inclusión para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.
3. Manejar el microtomo de deslizamiento para obtener cortes de tejido incluido en parafina.
4. Ser capaz de montar secciones de parafina sobre portaobjetos.
5. Visita a los laboratorios de microscopía del Departamento de Biología Celular e Histología.

B. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

La **inclusión** consiste en la impregnación de la muestra a estudiar en un material lo más químicamente neutro posible para formar, junto a ella, un bloque sólido que permita su corte para obtener secciones delgadas. La muestra es sometida a la acción de varios disolventes para conseguir que el medio de inclusión, frecuentemente hidrófobo, penetre en un tejido que, en principio, está hidratado. Cada uno de los disolventes diferentes utilizados prepara la penetración del siguiente y elimina el anterior por lo que debe de ser miscible con ellos. El fundamento de la inclusión es el mismo para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión y, tiene como objetivos básicos, *la conservación del material y permitir la obtención de secciones delgadas* y seriadas. Sin embargo se diferencian, por lo general, en el tipo de disolventes utilizados y el tiempo de exposición, en cada uno de ellos.

Los medios de inclusión más utilizados son no hidrosolubles:

- *Microscopía óptica*: parafina. Es una mezcla de hidrocarburos saturados y, a veces, de ceras. A temperatura ambiente es sólida y hay varias clases de parafina según su punto de fusión. La más utilizada funde a 65°C. Ofrece muchas ventajas prácticas y las mayores posibilidades para la aplicación de las técnicas posteriores ya que es químicamente neutra, es soluble en muchos disolventes y es fácil de cortar con cuchilla.

- *Microscopía electrónica de transmisión*: resinas de tipo epoxi. Se trata de una mezcla de monómeros líquidos que polimeriza, solidificándose, en presencia de un catalizador en caliente sin afectar la ultraestructura celular. Algunos medios de inclusión de tipo acrílico son parcialmente miscibles en agua por lo que no es necesario el paso de la deshidratación y aclaramiento posteriores y polimerizan, con luz ultravioleta, a bajas temperaturas.

El **proceso de inclusión** incluye:

- la **deshidratación** de las muestras cuando el medio de inclusión es no hidrosoluble. Ésta se puede realizar mediante sustitución en fase líquida o por desecación (aire o vacío). El agente deshidratante más utilizado es el alcohol etílico tanto en la inclusión

para MO como para MET. La deshidratación se hace progresiva (alcohol 70%, 96%, absoluto) y en el caso de la microscopía electrónica el proceso se inicia con alcohol 30%. Los tiempos de deshidratación varían dependiendo de las dimensiones de las muestras, de la velocidad de penetración del agente deshidratante y del grado de hidratación inicial de la muestra. Los tiempos de exposición son, por tanto, distintos en MO y MET.

- el **aclaramiento**, necesario cuando el agente deshidratante no es miscible con el medio de inclusión, y que supone la utilización de un líquido intermediario. Los más utilizados son el tolueno, xilol, benceno para MO y el óxido de propileno para MET. En la actualidad hay agentes aclarantes biodegradables para el procesado en parafina de las muestras. Este agente aclarante, conocido como sustituto, reemplaza el xilol y no es tóxico, no es cancerígeno, no huele y es respetuoso con el medio ambiente. No se evapora tan rápidamente como el xilol y no absorbe agua del aire. Como en el caso anterior, los tiempos de exposición son más cortos en la inclusión de MET que en la de MO.

- la **impregnación** supone la sustitución del líquido intermediario por el medio de inclusión. Para facilitar la penetración del medio de inclusión en la muestra se pueden realizar baños intermedios en mezclas que contengan líquido intermediario y medio de inclusión, en proporciones crecientes de este último (2:1, 1:1; 1:2). El tiempo de exposición varía de acuerdo con el tamaño de la muestra y el medio de inclusión de que se trate.

La **confección del bloque** supone la inmovilización de las muestras en bloques endurecidos del medio de inclusión. El modo en el que se produce el endurecimiento es variable y depende de cada uno de los medios de inclusión. La confección del bloque ha de permitir la orientación adecuada de la muestra en su interior para obtener, posteriormente, las secciones deseadas.

La **microtomía** es el método por el cual las muestras son seccionadas y los cortes obtenidos adheridos a una superficie para su observación, tras la tinción, en un microscopio. Los microtomos son los instrumentos que con una cuchilla afilada de acero, nos permiten obtener cortes delgados, transparentes y de un grosor determinado. Hay varios tipos de microtomos que utilizaremos según el tipo de inclusión realizada: microtomo de mano, microtomo de congelación, criostato, microtomo de parafina y ultramicrotomo. El corte a mano con cuchilla se usa casi exclusivamente para muestras vegetales. Cuando son necesarias secciones de tejidos con urgencia se realizan secciones por congelación con un microtomo de congelación, para muestras previamente fijadas, o criostato para muestras no fijadas. Estas formas de corte por congelación se utilizan para preservar los enzimas y los componentes lipídicos que se suelen eliminar por disolución durante el proceso de deshidratación e inclusión. Las secciones que se obtienen con el microtomo de congelación son secciones gruesas (20-100 μm) mientras que las secciones de criostato son más delgadas (5-10 μm).

También se pueden obtener secciones del orden de los nanómetros cuando se realizan con un ultracriotomo. En estos casos se suelen utilizar anticongelantes que impiden la formación de cristales. Las secciones de parafina se cortan en un microtomo de rotación o de deslizamiento obteniéndose secciones consecutivas de unas 4-10 μm de grosor. El ultramicrotomo permite obtener secciones semifinas (1 μm) o ultrafinas (200-500 nm) utilizando cuchillas de vidrio o diamante. Las secciones semifinas permiten seleccionar, al MO, el área de estudio de mayor interés en la muestra. Las secciones ultrafinas son colocadas en rejillas de cobre, como soporte.

El **microtomo de parafina** consta de un soporte móvil y orientable para el bloque de parafina, un soporte fijo y también orientable para la cuchilla y un sistema mecánico de rotación para el avance automático del bloque. Hay dos tipos de microtomos de parafina: el de rotación y el de deslizamiento (menos usados). Para obtener buenos cortes es esencial el estado de la cuchilla. Se pueden utilizar cuchillas de acero o pequeñas y delgadas cuchillas desechables que, en cualquier caso, deben tener un filo delgado de pulido perfecto, sin muescas ni estrías, que pueden desgarrar los tejidos y producen rayas en el corte que lo pueden fragmentar. La cuchilla, situada perpendicularmente frente al bloque, debe estar inclinada para evitar el aplastamiento de la parafina. El grosor de la cuchilla así como el ángulo de corte pueden ser escogidos por el manipulador de acuerdo con el material a cortar. El microtomo de parafina permite la obtención de secciones seriadas. Cada corte se adhiere al extremo del corte anterior al deslizarse por la cuchilla, de manera que se pueden obtener tiras de cortes seriados de la longitud deseada. Para reconocer y mantener la misma orientación de los cortes seriados, en el momento de adherirlos al portaobjetos, el bloque se puede tallar al darle forma de trapecio a la superficie de corte del bloque.

Previo a la **adhesión de los cortes de parafina** sobre los porta-objetos para evitar su pérdida durante el proceso de tinción, éstos deben de ser estirados ya que, en general, se pliegan cuando se obtienen con el microtomo. Para ello, los porta-objetos, previamente desengrasados y limpios, son impregnados con una delgada película de una sustancia adhesiva como la albúmina-glicerina o poly-L-lysina en solución acuosa que se deja secar. Para eliminar los pliegues de los cortes se utiliza el agua como líquido de extensión.

C. PROCEDIMIENTO.

1. Inclusión.

1.1. Observación del proceso de inclusión en parafina.

1.1.1. Material necesario.

Casetes con las muestras fijadas	Pinza histológica
Procesador de tejido	Moldes de acero
Estación de parafina	Pinza de punta curva

1.1.2. Procedimiento.

Los casetes conteniendo las muestras fijadas se introducen con la ayuda de las pinzas curvas en el baño de alcohol de 70% del procesador de tejidos. El procedimiento de inclusión se realiza según el siguiente protocolo:

- *Deshidratación*

- Alcohol 70% I.	30 min
- Alcohol 70% II.	30 min
- Alcohol 80%.	1 h 30 min
- Alcohol 96%.	1 h
- Alcohol Absoluto I.	1 h
- Alcohol Absoluto II.	1 h
- Alcohol Absoluto III.	1 h 30 min

- *Aclaramiento*

- Amil acetato I.	1 h
- Amil acetato II.	1 h
- Amil acetato III.	1 h 30 min

- *Impregnación*

- Parafina I.	1 h 30 min
- Parafina II.	Toda la noche

- *Confeción de los bloques*

- Del dispensador de la estación se vierte un poco de parafina líquida en el molde de acero.
- Con las pinzas histológicas se coloca la muestra en el interior del molde con la orientación deseada.
- Separar la tapa del casete de inclusión, colocarla sobre el molde y rellenar hasta el borde con parafina líquida.
- Dejar solidificar el molde de parafina en la superficie de enfriamiento.
- Desmoldar con cuidado el bloque.

Este protocolo depende del tipo de tejido y el tamaño de las muestras.

1.2. Observación del proceso de inclusión en resina epoxi.

1.2.1. Material necesario.

Tubos con las muestras fijadas y lavadas	Cápsulas de gelatina
Solución de acetato de uranilo	Etiquetas en papel seda
Alcohol etílico	Aguja histológica
Óxido de propileno	Pipeta Pasteur
Mezcla de resina epoxi	Estufa de polimerización

1.2.2. Procedimiento.

Después de la fijación y el lavado de las muestras y, previo a la inclusión, las muestras son sometidas a un tratamiento de intensificación del contraste. Posteriormente se deshidratan, aclaran e impregnan en la mezcla de resinas epoxi según el siguiente protocolo:

- <i>Solución de contraste</i>	1 hora
- Tampón Michaelis	
- Acetato sódico 3H ₂ O	4'855 g
- Veronal sódico	7'357 g
- Agua destilada	250 ml
- Solución stock de acetato de uranilo	
- Acetato de uranilo	4'8 g
- Agua destilada	100 ml
- Solución de trabajo de acetato de uranilo	
- Tampón Michaelis	5 ml
- HCl 0'1 N	7 ml
- Solución stock de acetato de uranilo	13 ml

Tras retirar el líquido lavador con una pipeta Pasteur de los tubos de ensayo se añade la Solución de trabajo de acetato de uranilo y se mantiene a 4°C.

- <i>Deshidratación</i>	
- Alcohol etílico 30%	15 min
- Alcohol etílico 50%	15 min
- Alcohol etílico 70%	15 min
- Alcohol etílico 80%	15 min
- Alcohol etílico 96%	15 min
- Alcohol etílico absoluto + sulfato de cobre (saturación)	15 min
- <i>Aclaramiento</i>	
- Óxido de propileno I	15 min (campana)
- Óxido de propileno II	15 min (campana)

- *Impregnación*

La impregnación se realiza con las resinas: Epon 812, DDSA, MNA que se mezclan, agitando constantemente, según el orden indicado. Se prepara junto antes de usarla aunque se puede guardar congelada. Para facilitar la impregnación, las muestras son tratadas con mezclas de líquido intermediario y la mezcla de resinas preparada con el siguiente protocolo:

- Óxido de propileno+resina epoxi (2:1) 30 min (campana)
- Óxido de propileno+resina epoxi (1:2) 30 min (campana)
- Mezcla de resinas noche

- Confección de los bloques

La confección de los bloques se realiza con la mezcla de resinas con la que se realiza la impregnación a la que se le ha añadido 1'5 ml del catalizador DMP-30. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se coloca una gota de esta mezcla en el fondo de la cápsula de gelatina, previamente deshidratada, y colocada en posición vertical en un soporte, evitando las burbujas en las proximidades de la muestra.

Con la ayuda de una aguja histológica se coloca la etiqueta de papel seda en la pared de la cápsula de manera que resulte legible por el exterior de la cápsula. A continuación se coge uno de los fragmentos de la muestra y se coloca en el fondo de la cápsula, con la orientación deseada. Por último se rellena con la mezcla de resinas toda la cápsula.

- Se introducen en la estufa de polimerización a 45°C durante 24 horas y, posteriormente, a 60°C durante 2 días.
- Una vez endurecida la resina se elimina la cápsula de gelatina con agua caliente.

<Precauciones>

- Los residuos de los diferentes baños son depositados en los recipientes de seguridad preparados a tal efecto.
- Los cambios de óxido de propileno se realizan en campana extractora de gases.
- La resina debe de manejarse con guantes.

2. Obtención de secciones de parafina con un microtomo de rotación.

2.1. Material necesario.

Bloques de parafina fríos	Caja de cartón para guardar las secciones
Microtomo de parafina de rotación	Aguja histológica
Cuchilla desechable	Pincel
Pinzas de punta fina	Brocha para limpiar

2.2. Procedimiento.

- Colocar el bloque de parafina, previamente tallado, en el portabloques del microtomo, sujetándolo con la pinza o el tornillo ajustables.
- Colocar la cuchilla en el portacuchillas del microtomo, seleccionar el ángulo de corte y orientar la cuchilla, perpendicularmente, a la superficie del bloque antes de fijar su posición.
- Fijar el avance del bloque, es decir el número de micras que se desee que tenga la sección, con el tornillo micrométrico.
- Quitar el mecanismo de bloqueo de la manivela del sistema de rotación y girarla para proceder a cortar.
- Profundizar el bloque de parafina, mediante cortes gruesos, para eliminar la parafina de la superficie del bloque hasta que comienza a aparecer la muestra. Asimismo se orienta el portabloques para obtener secciones uniformes de toda la muestra.
- Obtener cortes seriados de 3-4 μm de espesor.
- Sostener, con la ayuda de una aguja histológica o una pinza de punta fina, la tira de cortes seriados que quedan unidos al filo de la cuchilla, mientras que con la mano derecha se hace girar la manivela para seguir obteniendo mas secciones. Cuando la tira de cortes tiene la longitud deseada, se coloca sobre la caja de cartón con la ayuda del pincel y la aguja histológica.
- Tener cuidado de no superponer las tiras de cortes ya que se pegarían y quedarían inutilizados. Para facilitar su posterior manipulación, los cortes deben quedar con su cara brillante hacia abajo.
- Bloquear el mecanismo de rotación, una vez que hemos terminado de cortar, y retirar el bloque de parafina del portabloques. El tornillo micrométrico se coloca en 0 micras y los componentes del microtomo se limpian, con una brocha, de los fragmentos de cortes de parafina. La cuchilla desechable se limpia para evitar su deterioro o se elimina en el recipiente especial de color amarillo para materiales cortantes.
- Cubrir el microtomo con la funda protectora.

3. Extensión y adhesión de los cortes de parafina.

3.1. Material necesario.

Caja de cartón con secciones
Platina o baño eléctrico
Portaobjetos
Lápiz

Agua destilada
Aguja histológica
Albúmina glicerizada
Pincel o pinza de punta fina

3.2. Procedimiento.

- Depositar una gota de albúmina glicerizada sobre un portaobjetos y extenderla con el dedo sobre la superficie.
- Colocar el portaobjetos impregnado sobre una platina o baño eléctrico a la temperatura de 40-45°C.
- Depositar unas gotas de agua en cada portaobjetos.
- Colocar uno o varios cortes, con la cara brillante hacia abajo, sobre el agua templada con la ayuda de una aguja histológica. Si la temperatura del agua es la adecuada, el corte se extenderá lentamente. En ocasiones es necesario utilizar la aguja para estirar la sección con cuidado de no romper la muestra.
- Decantar el agua, sujetando la sección por un extremo con la aguja histológica, manteniendo la adecuada orientación de la muestra.
- Dejar en posición horizontal unos minutos hasta que se desprenda todo el agua y retirar con papel de filtro el agua restante del borde del portaobjetos.
- Colocar en posición horizontal en una bandeja hasta su posterior uso.

D. PREGUNTAS DE EVALUACIÓN.

1. Defina en el proceso de inclusión: inclusión, deshidratación, impregnación, confección de bloques, contraste, líquido de conservación.
2. Diferencias y similitudes entre el proceso de inclusión para microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.
3. Utilidad de los distintos aparatos para la obtención de secciones microscópicas.

PRÁCTICA 3. TÉCNICAS DE TINCIÓN CONVENCIONALES. HISTOQUÍMICA E INMUNOCITOQUÍMICA.

A. OBJETIVOS DE LA PRÁCTICA.

1. Realizar tinciones convencionales de microscopía óptica y ser capaz de interpretar los resultados.
2. Comprender el concepto de técnica especial.
3. Ser capaz de seguir el protocolo de las diferentes técnicas especiales: histoquímica e inmunocitoquímica y de interpretar los resultados.
4. Ser capaz de preparar las diluciones de los anticuerpos.

B. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA.

Los tejidos animales son en su gran mayoría incoloros excepto aquellos que poseen algún tipo de pigmento. En las plantas, sin embargo, existe una mayor variedad de pigmentos naturales (clorofila, carotenos, antocianinas, etc.) que permiten su observación directa con el MO, a lo que ayuda la presencia de una pared celular, poco permeable a veces lignificada o suberificada, que facilita la delimitación celular y la discriminación entre diferentes tejidos. Además hay que tener en cuenta que los productos de secreción elaborados por las plantas son químicamente complejos (resinas, taninos, gomas, mucílagos, esencias) y que determinados tejidos de las plantas poseen células muertas, carentes de citoplasma. Las muestras han de poseer suficiente contraste para discriminar entre los diferentes componentes celulares o tisulares. En la mayor parte de los casos, el contraste de la muestra se obtiene artificialmente. En microscopía óptica se obtiene mediante la tinción y en microscopía electrónica de transmisión mediante el contraste. Las **reacciones de tinción**, tanto en Histología Animal como en Histología Vegetal, tienen, por tanto, por objeto aumentar el contraste de las estructuras biológicas para facilitar su observación e identificación, según la afinidad que tengan para determinados colorantes. La mayoría de ellas se realizan mediante reacciones de coloración química en las que se utilizan sustancias coloreadas que tienen especial afinidad por las diferentes estructuras biológicas, debido a sus propiedades químicas. Estas técnicas histológicas generales nos muestran la topografía general de la muestra. Los colorantes son generalmente sales neutras con radicales ácidos o básicos que reaccionan con las estructuras básicas o ácidas del tejido, respectivamente, siendo los radicales de los colorantes los responsables del color. Las estructuras biológicas básicas se tiñen con los colorantes ácidos y se llaman acidófilas y las estructuras básicas se tiñen con los colorantes básicos y se llaman basófilas. Por tanto, estas interacciones son reacciones de tipo ácido-base.

Una de las técnicas de coloración de rutina mas utilizada en Histología Animal es la **Hematoxilina-eosina**, dónde la hematoxilina, por su carácter básico, tiñe de color morado fundamentalmente los núcleos y otras estructuras de naturaleza ácida como las zonas del citoplasma ricas en ARN. La eosina, de carácter ácido, tiñe el citoplasma y algunos

componentes extracelulares con diferentes tonalidades de rojo-rosa. En Histología Vegetal, una de las técnicas más usadas es la **Hematoxilina-verde de iodo**. Las paredes celulares secundarias lignificadas se tiñen con el verde de yodo y las paredes primarias, no lignificadas y ricas en pectina, se tiñen con la hematoxilina. En las técnicas de tinción de muestras vegetales, una práctica habitual es la destrucción del citoplasma de las células para eliminar las interferencias con los colorantes, para lo que se someten los cortes no teñidos a un baño de hipoclorito sódico, seguido de un baño de agua acidulada, a fin de aclarar y vaciar el contenido citoplasmático. Los frotis de sangre se tiñen habitualmente con **Giemsa** y el cerebro con **Violeta de cresilo**. La solución de Giemsa es una mezcla de colorantes iónicos donde el componente aniónico (ácido) es la eosina y los catiónicos (básicos) son el azur B y el azul de metileno.

La mayor parte de los colorantes empleados en el proceso de tinción son solubles en agua y actúan en medio acuoso. En consecuencia, cuando utilizamos materiales fijados, deshidratados e incluidos en medios no hidrosolubles como la parafina, hemos de invertir el proceso previo para eliminar el medio de inclusión y devolver el contenido en agua al tejido. Para eliminar la parafina, el corte adherido al portaobjetos se introduce en baños de líquido aclarante, después se procede a su deshidratación, partiendo de un baño de alcohol etílico absoluto y siguiendo, a través de soluciones acuosas de concentraciones decrecientes de alcohol etílico, hasta finalizar con un baño de agua y, así, conseguir una hidratación gradual previa a la tinción.

Las secciones, una vez teñidas, se cubren con láminas de vidrio muy delgadas conocidas como cubre-objetos. Entre la sección y el cubre-objetos se interpone un material adhesivo con un índice de refracción similar al vidrio que se conoce como medio de montaje. Existen medios de montaje hidrosolubles como la mezcla glicerina-gelatina que se utiliza cuando se montan las preparaciones hidratadas y los medios no hidrosolubles, como el bálsamo de Canadá y otros medios sintéticos como el DPX, que conservan mejor la preparación, pero ésta ha de ser previamente deshidratada y aclarada. La deshidratación se consigue mediante el uso de baños de alcohol etílico, en solución acuosa, de concentraciones crecientes, hasta alcohol absoluto y el aclarado posterior se realiza en baños de xilol.

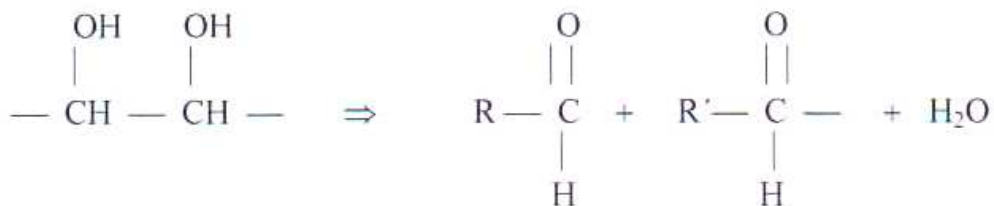
Las secciones ultrafinas son contrastadas para aumentar la capacidad de las estructuras para desviar los electrones y, por tanto, aumentar el contraste. El contraste se realiza con acetato de uranilo, una sal en solución acuosa, que se utiliza para aumentar el contraste general de la muestra, específicamente las estructuras que contienen ADN, aunque no tiñe bien las membranas celulares. Se utiliza en combinación con sales de plomo (citrate de plomo) que incrementan el contraste general de la muestra.

Las **técnicas histoquímicas** son *técnicas de tinción especiales* que identifican macromoléculas aprovechando la reactividad de determinados radicales químicos presentes

en componentes de las células o de la matriz extracelular, al ponerlos de manifiesto mediante diversas reacciones. Entre otros compuestos, estas técnicas pueden poner en evidencia los hidratos de carbono.

Histoquímicamente, los hidratos de carbono se clasifican con arreglo a la presencia en ellos de determinados grupos funcionales, detectables por las técnicas apropiadas. Los azúcares, mas o menos polimerizados, pueden clasificarse en seis grandes grupos: polisacáridos simples, mucosustancias neutras con grupos hexosamina, mucosustancias ácidas con unidades de acetilhexosamina y ácidos como el ácido hialurónico, el pirúvico o el sulfúrico, mucoproteínas con mas de un 4% de nitrógeno, glucoproteínas con menos de un 4% de nitrógeno y glucolípidos o cerebrósidos.

La técnica del **ácido periódico-Schiff (PAS)** es la más ampliamente utilizada para la demostración de carbohidratos. El ácido periódico es un oxidante que rompe con gran especificidad los enlaces $-C-C-$, cuando los carbonos contiguos soportan cada uno un hidroxilo (como es el caso de los grupos Vic-glicoles presentes en las mucinas neutras y el glucógeno) produciendo aldehídos. La reacción posterior entre el reactivo de Schiff y el grupo aldehído producido, da lugar a una sustancia coloreada de color rojo, cuya intensidad depende del número de aldehídos presentes, o lo que es lo mismo, del número de moléculas portadoras de enlaces Vic-glicol existentes en la estructura tisular.



De esta manera se pueden poner de manifiesto en las muestras biológicas: el glucógeno, el almidón, mucinas neutras y sialomucinas lábiles, cápsulas de hongos, membranas basales, reticulina, gránulos de zimógeno pancreáticos, coloide tiroideo, cuerpos amiláceos, cuerpos de Russell, etc.

Entre los componentes celulares que pueden ser identificados en los tejidos mediante las técnicas histoquímicas se encuentran los enzimas. Basta con suministrar un sustrato apropiado así como las condiciones químicas óptimas para la actuación del enzima, objeto de estudio (fijación, temperatura, pH), para que se produzca la interacción enzima-sustrato, de tal modo que se origina un producto de reacción, insoluble, que podemos observar al MO y/o MET, o a una sustancia que, mediante reacción con otra molécula, puede ser detectada al microscopio.

Las **fosfatasas** (fosfato-éster hidrolasas) son enzimas que catalizan la ruptura de un éster fosfórico, separando el grupo fosfato del éster y transfiriéndolo a otro alcohol. Histoquímicamente se clasifican en fosfatasas alcalinas (actúan en valores de pH entre 8'8 y

9´4) y fosfatasa ácida (actúan en valores de pH entre 4´8 y 5´4). El glicerofosfato sódico (sustrato) es precipitado, por la acción de la fosfatasa alcalina, en medio básico (pH 9) y en presencia de Ca^{++} como copuladores, Mg^+ que actúan como activadores y un tampón apropiado, el veronal, para mantener el pH, en forma de fosfato cálcico. El fosfato cálcico reacciona con una sal de cobalto para dar fosfato de cobalto, que pasará a sulfuro de cobalto, de color negro, en presencia de sulfuro de amonio.

Las **técnicas inmunocitoquímicas** permiten localizar proteínas y macromoléculas específicas en células y tejidos. Cuando una macromolécula, denominada antígeno, es introducida en un organismo (conejo o cabra), al que es extraña, el organismo la identifica como una sustancia ajena y produce anticuerpos (policlonales) directamente contra ella. El anticuerpo así producido es capaz de reconocer el antígeno (proteína en el tejido) y unirse a él mediante una reacción de alta afinidad muy específica, formándose un complejo antígeno-anticuerpo. A su vez, los anticuerpos pueden unirse químicamente a sustancias marcadoras, sin perder por ello, la capacidad de unirse con el antígeno. El marcaje de los anticuerpos puede realizarse con compuestos fluorescentes (rodamina, fluoresceína), enzimas (peroxidasa, fosfatasa alcalina), oro. Si se puede producir el anticuerpo adecuado y preservar el antígeno, no hay límites para que las sustancias puedan ser localizadas por este método.

La localización del glucagón, hormona producida y almacenada en las células A de los islotes de Langerhans del páncreas, se realiza mediante la aplicación de una técnica inmunocitoquímica indirecta. En primer lugar se aplica el anticuerpo obtenido, contra la molécula a identificar (1^{er} anticuerpo, anti-glucagón). A continuación se aplica un 2^o anticuerpo, obtenido contra la gammaglobulina del animal en el que se ha obtenido el 1^{er} anticuerpo, conjugado con un fluorocromo que se excita a una determinada longitud de onda. El segundo anticuerpo, que es en realidad un anti-anticuerpo, se une a la gammaglobulina (1^{er} anticuerpo) que a su vez está unida al antígeno (molécula a identificar).

Para comprobar que la reacción obtenida es específica se realizan, paralelamente, controles de especificidad, también llamados controles negativos, los cuales pueden ser de dos tipos:

1. Preabsorbiendo el anticuerpo a la dilución de trabajo con su antígeno específico en solución (10 nm/ml), previo a su uso en la técnica inmunocitoquímica.
2. Omitiendo la incubación con el primer anticuerpo.

En ambos casos, la ausencia de inmunotinción indica que la reacción es específica ya que el anticuerpo sólo ha reaccionado con su antígeno específico. Si, por el contrario, apareciera alguna inmunotinción, significaría que el anticuerpo utilizado presenta reacción cruzada con otros elementos del tejido y, por tanto, debe ser descartado para identificar el antígeno deseado.

C. PROCEDIMIENTO.

1. Técnicas de tinción convencionales.

1.1. Hematoxilina-eosina.

1.1.1. Material necesario.

Secciones de intestino montadas y secas	Batería de deshidratación y aclarado
Batería para desparafinar	Medio de montaje
Solución de hematoxilina de Hansen	Cubreobjetos
Solución de eosina amarillenta	Aguja histológica
Agua destilada	Papel de filtro

1.1.2. Preparación de reactivos.

1.1.2.1. Solución de hematoxilina de Hansen.

- Disolver 1 gr de hematoxilina en 100 ml de agua destilada caliente.
- Disolver 20 gr de alumbre potásico en 200 ml de agua destilada.
- A las 24 horas se mezclan las dos soluciones anteriores (en caliente) junto a 0´177 gr de permanganato potásico, manteniéndose la mezcla en ebullición 1 min y dejándola enfriar antes de ser filtrada.

1.1.2.2. Solución de eosina amarillenta:

- Disolver 0´5 gr de eosina en 100 ml de agua destilada.

1.1.3. Procedimiento.

1. Desparafinado de los cortes

- Xilol 5 min
- Xilol 5 min

2. Hidratación

- Alcohol etílico absoluto 3 min
- Alcohol etílico de 96% 3 min
- Alcohol etílico de 70% 3 min
- Agua destilada 5 min

3. Tinción

- Solución de hematoxilina 5 min
- Agua en agua corriente hasta que no destiña el colorante
- Solución de eosina 1-3 min
- Lavar brevemente en agua corriente

4. Deshidratación

- Alcohol etílico de 70% 3 min
- Alcohol etílico de 96% 3 min
- Alcohol etílico absoluto 3 min

5. Aclarado

- Xilol 5 min
- Xilol 5 min

6. Montaje

- Medio de montaje DPX
- Cubrir la sección con una gota de DPX y colocar el cubreobjetos. Una vez montadas, las preparaciones se depositan horizontalmente sobre una bandeja antes de su observación al microscopio.

1.1.4. Resultados.

Las células muestran el núcleo teñido de color violeta, teñido con la hematoxilina, y el citoplasma de color rosa, teñido con la eosina. Además, la hematoxilina tiñe también las zonas del citoplasma ricas en ARN.



1.2. Hematoxilina verde de yodo.

1.2.1. Material necesario.

Secciones de peciolo montadas y secas	Batería de deshidratación y aclarado
Batería para desparafinar	Medio de montaje
Solución de hematoxilina de Hansen	Cubreobjetos
Solución de verde de yodo	Aguja histológica
Agua destilada	Papel de filtro

1.2.2. Preparación de reactivos.

1.2.2.1. Solución de hematoxilina de Hansen.

- Disolver 1 gr de hematoxilina en 100 ml de agua destilada caliente.
- Disolver 20 gr de alumbre potásico en 200 ml de agua destilada.
- A las 24 horas se mezclan las dos soluciones (en caliente) junto a 0'177 gr de permanganato potásico, manteniéndose la mezcla en ebullición 1 min y dejándola enfriar antes de ser filtrada.

1.2.2.2. Solución de verde de yodo.

- Disolver 2 gr de verde de iodo en 200 ml de agua destilada.

1.2.3. Procedimiento.

- Desparafinado de los cortes
 - Xilol 5 min
 - Xilol 5 min
- Hidratación
 - Alcohol etílico absoluto 3 min
 - Alcohol etílico de 96% 3 min
 - Alcohol etílico de 70% 3 min
 - Agua destilada 5 min
- Tinción
 - Solución de hematoxilina 5 min
 - Agua en agua corriente hasta que no destiña el colorante
 - Solución de eosina 1-3 min
 - Lavar brevemente en agua corriente
- Deshidratación
 - Alcohol etílico de 70% 3 min
 - Alcohol etílico de 96% 3 min
 - Alcohol etílico absoluto 3 min
- Aclarado
 - Xilol 5 min
 - Xilol 5 min
- Montaje
 - Medio de montaje DPX
 - Cubrir la sección con una gota de DPX y colocar el cubreobjetos. Una vez montadas, las preparaciones se depositan horizontalmente sobre una bandeja antes de su observación al microscopio.

1.2.4. Resultados.

Las paredes primarias, no lignificadas y ricas en pectina, se tiñen de color violeta con la hematoxilina y las paredes celulares secundarias, lignificadas, se tiñen de color verde con el verde de yodo.

<Precauciones>

- El hipoclorito sódico destruye el contenido de las células dejando únicamente visibles las paredes celulares.
- El ácido acético actúa como mordiente y prepara las paredes celulares para la tinción.



1.3. Violeta de cresilo.

1.3.1. Material necesario.

Secciones de cerebro secas	Papel de filtro
Pocillos de tinción	Medio de montaje
Solución de violeta de cresilo	Cubreobjetos
Agua destilada	Aguja histológica
Batería de deshidratación y aclarado	

1.3.2. Preparación de reactivos.

1.3.2.1. Solución de violeta de cresilo.

- Solución de violeta de cresilo al 0'1%	0'1 gr
- Agua destilada	100 ml

Justo antes de usar, añadir 15 gotas de ácido acético glacial al 10% y filtrar.

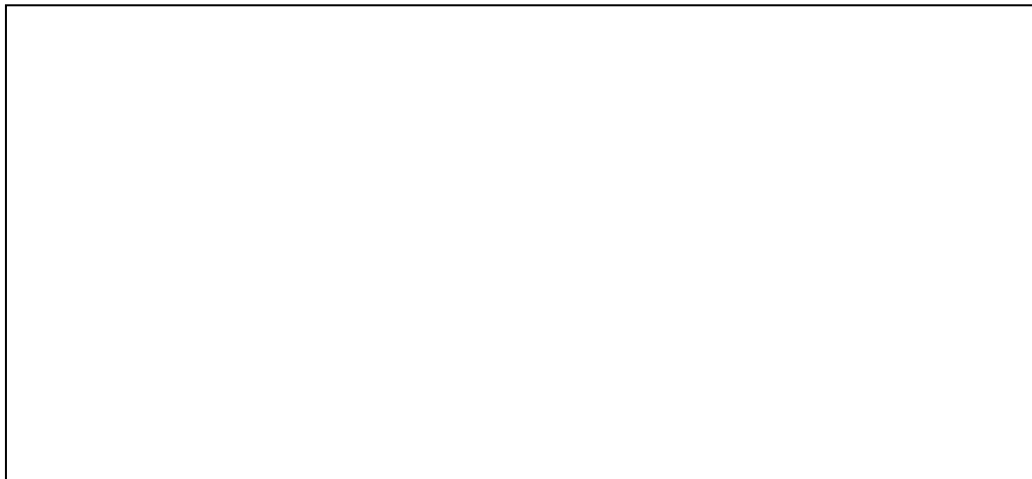
1.3.3. Procedimiento.

Los cortes por congelación de cerebro que han sido previamente fijadas en formol al 10%, se sumergen en un baño de agua destilada para eliminar el líquido crioprotector. Los cortes se recogen, sumergiendo el portaobjetos y sujetando sobre él la sección con la ayuda de una aguja histológica. El secado de las preparaciones se realiza presionando éstas sobre papel de filtro, con cuidado de no frotar la muestra contra el papel.

1. Tinción	
- Solución de violeta de cresilo	5 min
2. Deshidratación	
- Alcohol etílico de 70%	3 min
- Alcohol etílico de 96%	3 min
- Alcohol etílico absoluto	3 min
3. Aclarado	
- Xilol	5 min
- Xilol	5 min
4. Montaje	
- Medio de montaje DPX	
- Cubrir la sección con una gota de DPX y colocar el cubreobjetos. Una vez montadas, las preparaciones se depositan horizontalmente sobre una bandeja antes de su observación al microscopio.	

1.3.4. Resultados.

Las neuronas muestran un núcleo claro, grande y redondeado en cuyo interior aparece el nucléolo intensamente teñido de color violeta. En el soma neuronal se observan los grumos de Nissl.



1.4. Giemsa.

1.4.1. Material necesario.

Frotis de sangre	Papel de filtro
Pocillos de tinción	Medio de montaje
Solución de Giemsa	Cubreobjetos
Agua destilada	Aguja histológica
Batería de deshidratación y aclarado	

1.4.2. Preparación de reactivos.

1.4.2.1. Solución de Giemsa.

- Solución de Giemsa comercial	1 volumen
- Agua destilada	10 volúmenes

La solución de Giemsa diluida se debe de preparar en el momento de usar y ha de mantenerse en oscuridad.

1.4.3. Procedimiento.

Previo a la tinción, la extensión de sangre será fijada por inmersión en metanol al 95% durante 5 minutos, secada al aire.

1. Tinción

- Solución de Giemsa (1:10)	30-60 min
- Agua destilada	

2. Deshidratación

- Alcohol etílico de 70%	3 min
- Alcohol etílico de 96%	3 min
- Alcohol etílico absoluto	3 min

3. Aclarado

- Xilol	5 min
- Xilol	5 min

4. Montaje

- Medio de montaje DPX

- Cubrir la sección con una gota de DPX y colocar el cubreobjetos. Una vez montadas, las preparaciones se depositan horizontalmente sobre una bandeja antes de su observación al microscopio.

Los pasos 2, 3 y 4 pueden ser eliminados si las preparaciones se van a montar con glicerina.

1.4.4. Resultados.

Los eritrocitos se tiñen de color naranja. Los leucocitos poseen los núcleos teñidos de color púrpura y el citoplasma de distinto color según el tipo de gránulos que presenten. El color púrpura y el color azul indican basofilia, el rosa amarillento indica acidofilia y el salmón indica neutrofilia o afinidad por la mezcla compleja.



2. Histoquímica.

2.1. Técnica de ácido periódico de Schiff (PAS).

2.1.1. Material necesario.

Secciones de intestino montadas y secas	Agua destilada
Solución de hematoxilina de Hansen	Reactivo de Schiff
Batería para desparafinar	Agua sulfurosa
Batería de deshidratación y aclarado	Medio de montaje
Solución de ácido periódico	Cubreobjetos
Aguja histológica	Papel de filtro

2.1.2. Reactivos.

2.1.2.1. Solución de ácido periódico al 0'5%.

- Ácido periódico	0'5 gr
- Agua destilada	100 ml

2.1.2.2. Reactivo de Schiff.

- Disolver 1 gr de fucsina básica en 200 ml de agua destilada hirviendo. Agitar y dejar enfriar hasta alcanzar la temperatura del laboratorio. Filtrar y añadir al filtrado 20 ml de CIH-N.
- A los 10 minutos añadir 1 gr de metabisulfito sódico o potásico. Dejar reposar esta solución en la oscuridad de 12 a 24 horas y, a continuación, añadirle 2 gr de carbón activo, agitando 1 minuto y filtrando.
- Esta solución debe guardarse en oscuridad y en frío y debe ser renovada cada mes.

2.1.2.3. Agua sulfurosa.

- CIH-N	10 ml
- Solución del 10% de bisulfito sódico	10 ml
- Agua destilada hasta alcanzar los	100 ml

CONTROL

A una preparación se le realizará un tratamiento durante 1 hora a 37°C con amilasa y, posteriormente, se lavan durante 5 min con agua corriente.

2.1.3. Procedimiento.

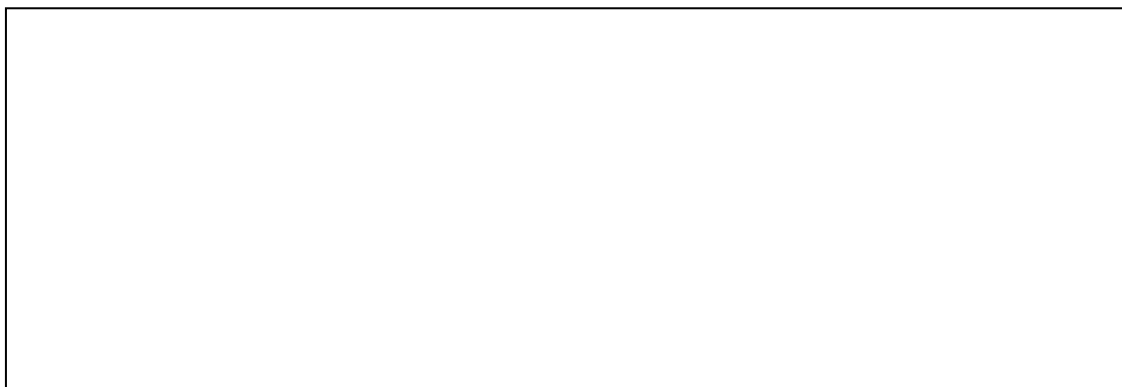
- | | |
|---|-----------|
| 1. Desparafinado de los cortes | |
| - Xilol | 5 min |
| - Xilol | 5 min |
| 2. Hidratación | |
| - Alcohol etílico absoluto | 3 min |
| - Alcohol etílico de 96% | 3 min |
| - Alcohol etílico de 70% | 3 min |
| - Agua destilada | 5 min |
| 3. Tinción | |
| - Solución acuosa de ácido periódico al 0'5% | 5-10 min |
| - Agua destilada | 3 min |
| - Reactivo de Schiff | 15-20 min |
| - Lavar en agua sulfurosa preparada recientemente | |
| - Lavar en agua corriente | |
| - Solución de hematoxilina de Hansen | 3 min |
| 4. Deshidratación | |
| - Alcohol etílico de 70% | 3 min |
| - Alcohol etílico de 96% | 3 min |
| - Alcohol etílico absoluto | 3 min |
| 5. Aclarado | |
| - Xilol | 5 min |
| - Xilol | 5 min |
| 6. Montaje | |
| - Medio de montaje DPX | |
| - Cubrir la sección con una gota de DPX y colocar el cubreobjetos. Una vez montadas, las preparaciones se depositan horizontalmente sobre una bandeja antes de su observación al microscopio. | |

2.1.4. Resultados.

Los mucopolisacáridos, producidos por las células caliciformes presentes en el epitelio intestinal, se tiñen de color rojo intenso o púrpura.

<Precauciones>

- El pH óptimo para que se produzca la rotura del enlace Vic-glicol está entre 3 y 4'5.
- La temperatura óptima para la reacción es la del laboratorio (18-20°C) ya que el calor excesivo puede alterar la especificidad de la misma.
- Lavar muy bien las preparaciones después de la actuación del reactivo de Schiff con el objeto de evitar una reoxidación de la leucofucsina que hubiera quedado atrapada en el tejido, por el oxígeno atmosférico.



2.2. Método de calcio-cobalto según Gomori (1952).

2.2.1. Material necesario.

Criosecciones de riñón	Solución de sulfuro de amonio
Pocillos de tinción	Agua destilada
Tampón veronal sódico 0'2M, pH 8'8	Medio de montaje hidrosoluble
Medio de incubación	Cubreobjetos
Solución de nitrato de cobalto al 2%	Aguja histológica

2.2.2. Material y reactivos.

2.2.2.1. Criosecciones de ratón.

Secciones obtenidas en criostato, a partir de riñón no fijado químicamente, congelado en nitrógeno líquido.

2.2.2.2. Tampón veronal sódico 0'2M, pH 8'8.

- | | |
|---|--------|
| - Veronal (barbital) sódico | 10'3 g |
| - Agua destilada | 500 ml |
| - Ácido clorhídrico 0'1 N | |
| - Disolver el veronal sódico en 450 ml de agua destilada, ajustar el pH a 8'8 con HCl 0'1 N y completar el volumen hasta 500 cc con agua destilada. | |

2.2.2.3. Medio de incubación.

- | | |
|--|-------|
| - Solución de β -glicerofosfato sódico al 3% | 10 cc |
| - Solución de dietil barbiturato sódico al 2% | 10 cc |
| - Agua destilada | 5 cc |
| - Solución de cloruro cálcico al 2% | 20 cc |
| - Solución de sulfato de magnesio al 5% | 1 cc |

Todas las soluciones son acuosas.

2.2.2.4. Solución de sulfuro de amonio.

- | | |
|--|---------|
| - Solución al 5% de sulfuro de amonio en solución al 0'45% de cloruro sódico | |
| - Cloruro sódico | 0'45 gr |
| - Agua destilada | 100 cc |
| - Sulfuro de amonio | 5 cc |

2.2.3. Procedimiento.

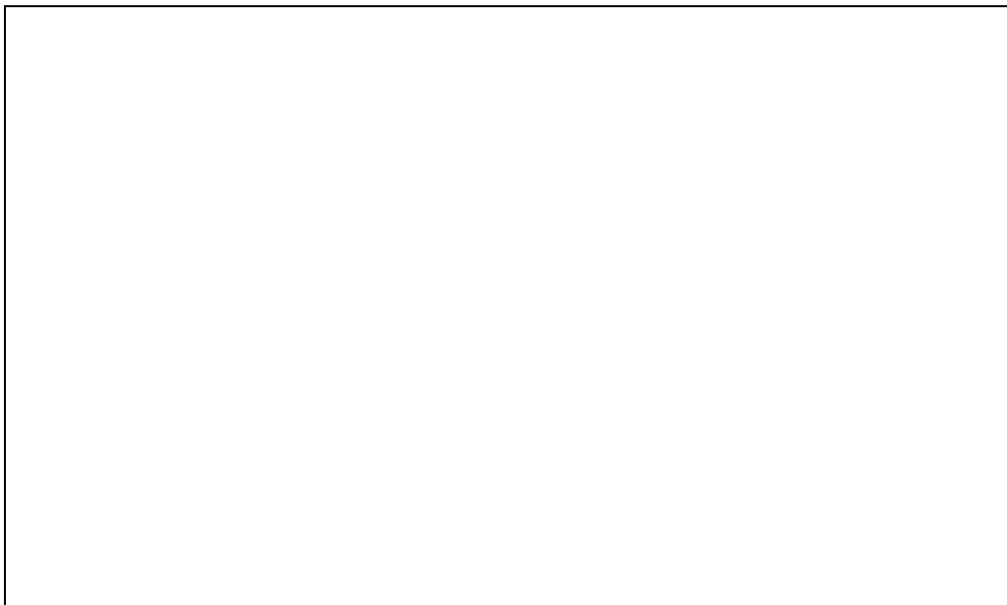
- | | |
|--|-----------|
| 1. Lavado de los cortes en tampón veronal sódico 0'2 M, pH 8'8 | 15 min |
| 2. Sumergir las secciones en el medio de incubación (recién preparado) | 30-60 min |
| 3. Lavar en agua corriente | 3 min |
| 4. Tratar los cortes con la solución de nitrato de cobalto al 2% | 3-5 min |
| 5. Lavar en agua destilada, dos veces | 3+3 min |
| 6. Tratar los cortes con la solución de sulfuro de amonio | 1-2 min |
| 7. Lavar en agua destilada | 3 min |
| 8. Montar las preparaciones con medio de montaje hidrosoluble: cubrir la sección con una gota de glicerina y colocar el cubreobjetos y colocar la preparación, horizontalmente, en una bandeja antes de su observación al microscopio. | |

2.2.4. Resultados.

Se observan depósitos negros en las estructuras renales con actividad fosfatasa alcalina.

<Precauciones>

- Es conveniente medir y ajustar el pH del tampón veronal antes de su uso para asegurarnos que el enzima actúe correctamente.
- El sulfuro de amonio tiene un olor desagradable por lo que se recomienda usarlo en la campana extractora de gases.
- Se recomienda la realización conjunta de un control de la reacción: 1) utilización de un inhibidor de la enzima o 2) ausencia del sustrato.
- Se realizará una tinción de contraste con hematoxilina en una preparación adyacente para la identificación del tejido con reacción positiva.



3. Inmunocitoquímica.

3.1. Material necesario.

Secciones de páncreas montadas y secas	Micropipetas
Rallador de vidrio	Puntas desechables
Batería para desparafinar	PBS pH 7'2-7'4
Medio de montaje hidrosoluble (glicerina)	Cubreobjetos
Cámara húmeda	Aguja histológica
Solución anti-IgG de ratón obtenido en cobaya	Solución anti-glucagón
Microscopio óptico de fluorescencia	

3.2. Reactivos.

3.2.1. Tampón fosfato salino (PBS) pH 7'2-7'4.

- Solución A	
- Na ₂ HPO ₄	0'333 gr
- H ₂ O destilada	187'5 ml
- Solución B	
- NaH ₂ PO ₄	0'103 gr
- 75 ml	

A la solución A se le va añadiendo la solución B hasta conseguir un pH 7'2-7'4. A continuación se añaden 2'192 gr de NaCl a 250 ml de la solución A+B.

3.2.2. Anti-glucagón 1:250.

3.3. Procedimiento.

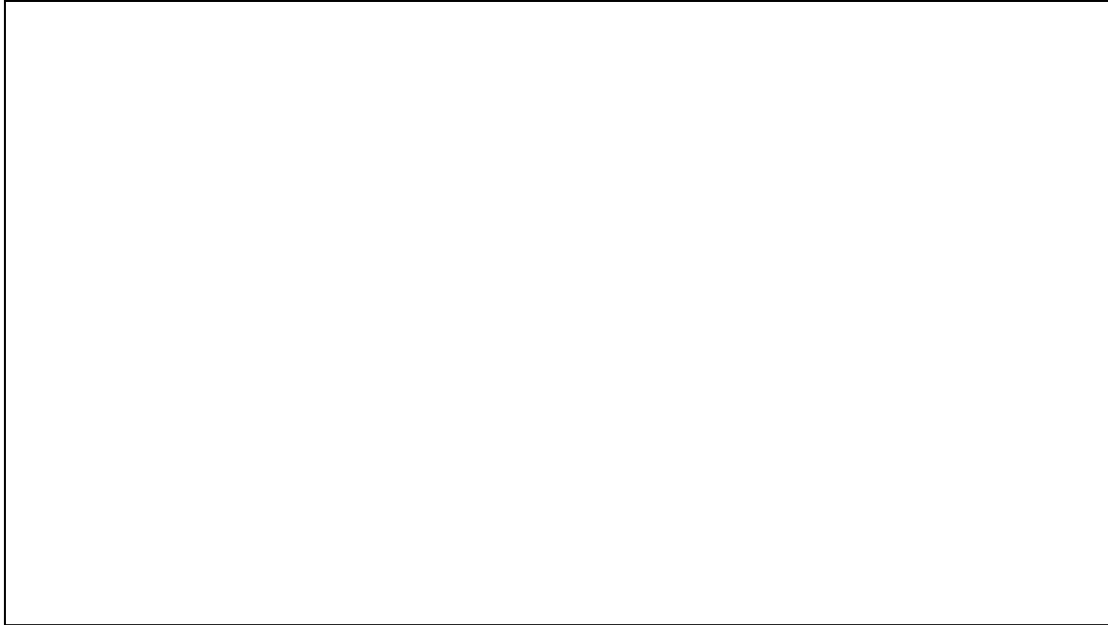
1. Realizar con el rallador de vidrio un círculo alrededor de la sección.
2. Desparafinado de los cortes
 - Xilol 5 min
 - Xilol 5 min
3. Hidratación
 - Alcohol etílico absoluto 3 min
 - Alcohol etílico de 96% 3 min
 - Alcohol etílico de 70% 3 min
4. Lavar con PBS dos veces 15 min+5 min
5. Incubar con el anti-G 1:250 a 4°C en cámara húmeda 60 minutos
6. Lavar en PBS dos veces 15 min + 5min
7. Lavar con PBS dos veces 15min + 5min
8. Incubar con el segundo anticuerpo GAR-TRICT 1:30 a temperatura ambiente en cámara húmeda 30min
9. Lavar en PBS dos veces 15min + 5min
10. Montar la preparación con el medio de montaje hidrosoluble: cubrir el corte con una gota de glicerina y colocar el cubreobjetos. Guardar la preparación horizontalmente en la cámara húmeda antes de su observación al microscopio.

3.4. Resultados.

Las células que contienen glucagón, localizadas en la periferia de los islotes de Langerhans, muestran fluorescencia roja.

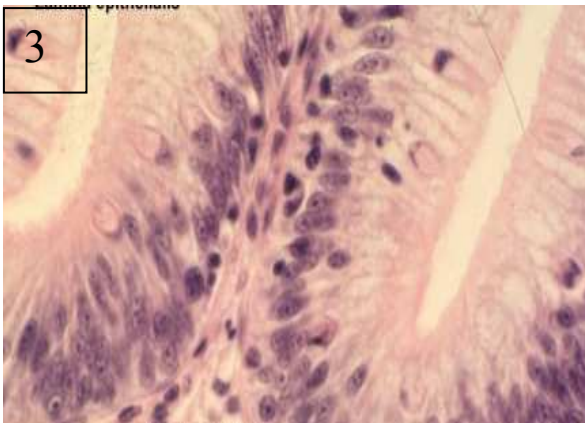
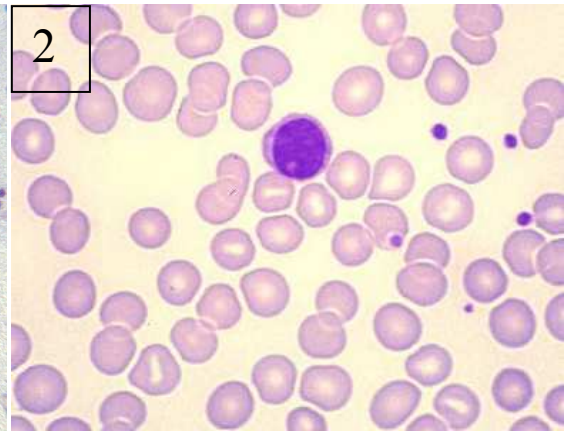
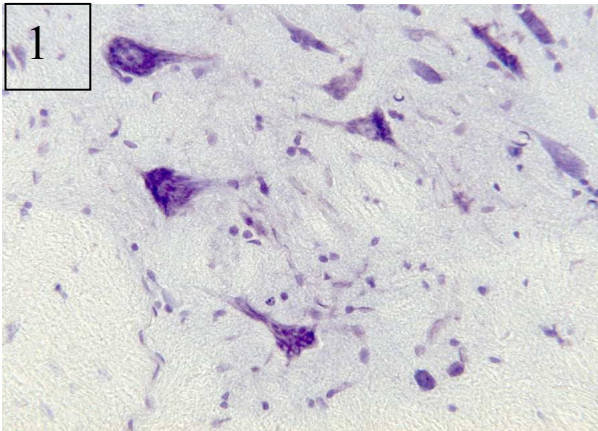
<Precauciones>

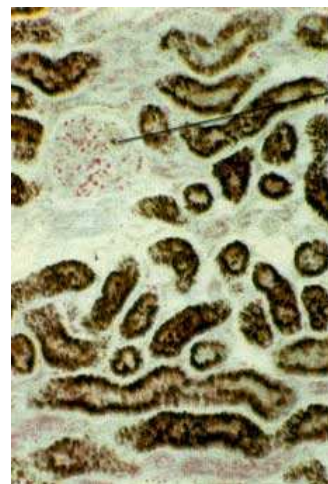
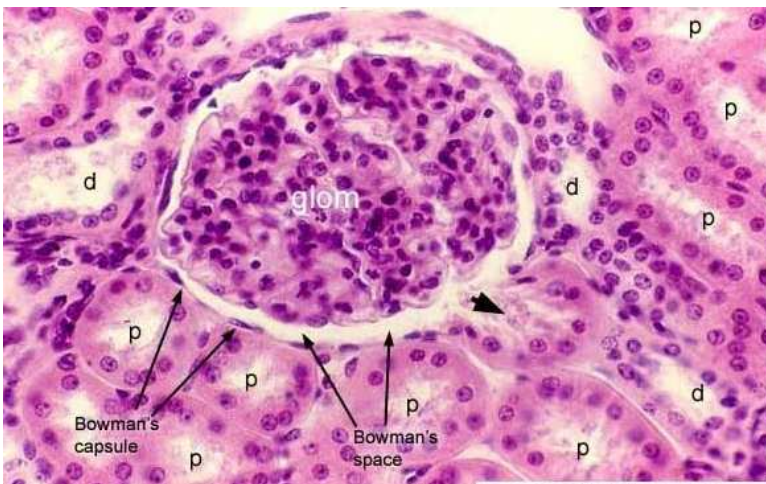
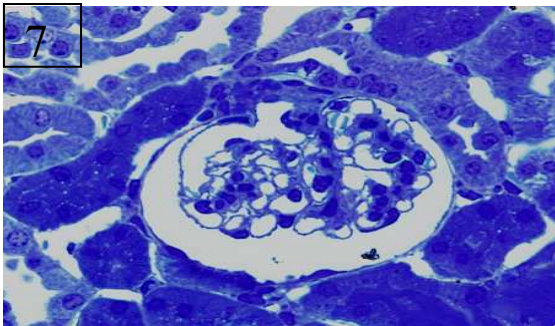
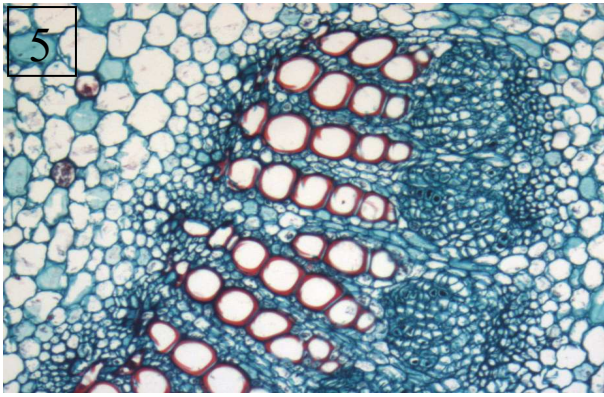
- Es importante conocer la compatibilidad del fijador usado para preservar el tejido con la técnica inmunocitoquímica a aplicar. En el caso de las hormonas peptídicas, el fijador mas adecuado es el líquido de Bouin.-
- Se recomienda la utilización de poly-L-lisina como medio adherente de las secciones.
- Se recomienda almacenar congeladas pequeñas cantidades (25 μ l) del primer anticuerpo muy poco diluidas (1:10)

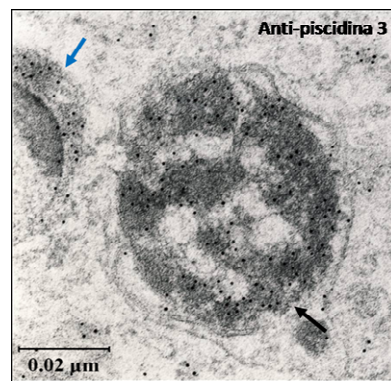
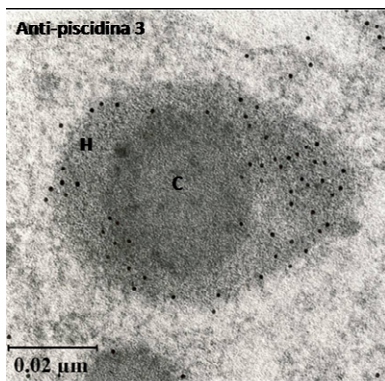
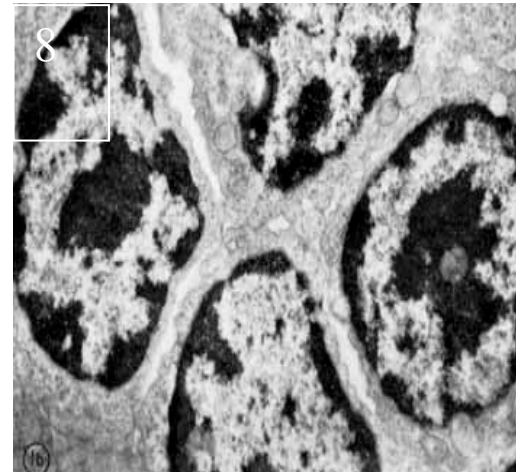
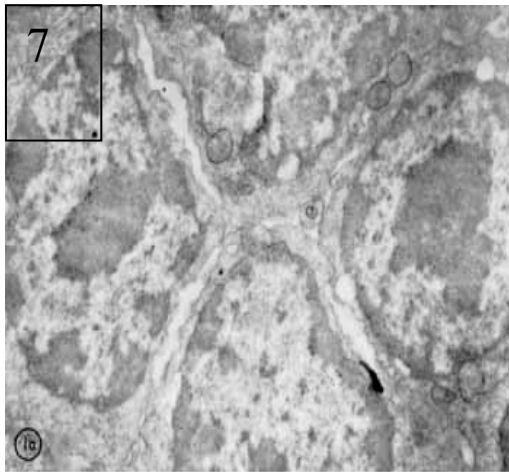
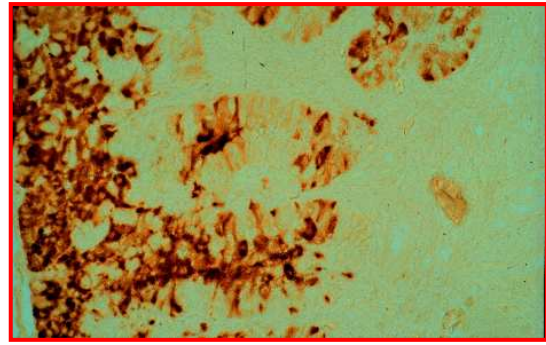
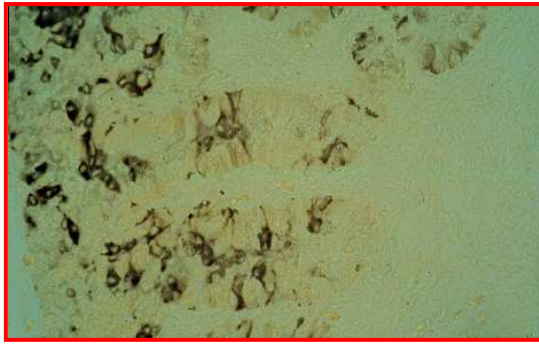


D. PREGUNTAS DE AUTOEVALUACIÓN.

1. Identificar, en las siguientes imágenes, el tipo de fijación, inclusión y tinción que se ha realizado. Justificar.







2. En el caso de que haya reacción positiva sino ha utilizado anticuerpo primario en la técnica inmunocitoquímica, ¿a qué cree que es debido?
3. ¿Por qué es necesario un microscopio de fluorescencia para observar las preparaciones en las que ha realizado la técnica inmunocitoquímica?
4. Conoce algún otro tipo de técnica histoquímica distinto a las que ha realizado en las actividades prácticas.

PRÁCTICA 4. VISITA AL SERVICIO UNIVERSITARIO DE MICROSCOPIA DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA Y ESTUDIO DE LAS PREPARACIONES.

1. El Servicio Universitario de Microscopía de la Universidad de Murcia se encuentra ubicado en la planta sótano del edificio SAI (Servicio de Apoyo a la Investigación) en el Campus de Espinardo.

(<http://www.um.es/sai/servicios/microscopia.php>).



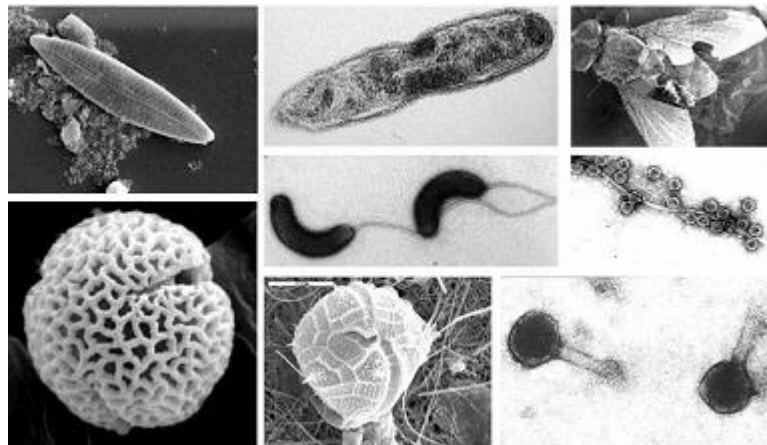
El Servicio Universitario de Microscopía (SUM) ofrece prestaciones relacionadas con la utilización del:

- Microscopio Electrónico de Transmisión.
- Barrido.
- Microscopio Óptico incluyendo el Microscopio Confocal.
- Técnicas accesorias para cada tipo de Microscopía. El estudio puede hacerse tanto de células aisladas, como cultivadas o en tejidos. Varios equipos permiten obtener imagen en fotografía o en formato digital.

Las técnicas de Microscopía abarcan un amplio espectro de áreas de aplicación entre las que se incluyen Anatomía, Histología y Embriología, Virología, Cirugía, Genética, Química, Bioquímica, Tecnología de los Alimentos, Botánica, Geología, Arqueología, Bellas Artes, Fisiología Humana y Animal, Microbiología, Farmacología, Hematología, Física, Radiología, Patología, Edafología Biología Vegetal, Medicina Forense, Metalurgia, Sanidad Animal, etc.

Se destacan las siguientes aplicaciones:

- Estudio ultraestructural de células y tejidos normales y patológicos.
- Morfología y ultraestructura de microorganismos.
- Localización y diagnóstico de virus.
- Caracterización inmunocitoquímica e histoquímica de distintos tipos celulares.
- Estudios morfológicos para la caracterización taxonómica en Zoología y Botánica.
- Ayuda en diagnóstico pericial.
- Comprobación morfológica de tratamientos terapéuticos experimentales.
- Estudio ultraestructural de suspensiones celulares y orgánulos aislados.
- Control de materiales mediante observación de superficies.
- Valoración del deterioro de materiales.
- Microanálisis de elementos en superficies o en secciones finas desde el carbono al uranio.
- Estudios y análisis de pinturas.
- Estudios de Parasitología y enfermedades parasitarias.



Observación de muestras en el microscopio electrónico de transmisión, microscopio electrónico de barrido y el microscopio confocal.

2. Estudio de las preparaciones.

Cada grupo de alumnos presentará los resultados de una de las tinciones en la sala de prácticas.