booksmedicos.org

1 TÉCNICAS

FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA / 1
PREPARACIÓN DEL TEJIDO / 2
Tinción con hematoxilina-eosina con fijación en formalina / 2
Otros fijadores / 3
Otras técnicas de tinción / 3
HISTOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA / 3
Composición química de las muestras histológicas / 4
Fundamentos químicos de la tinción / 5
Digestión enzimática / 7
Histoquímica enzimática / 7
Inmunocitoquímica / 7
Técnicas de hibridación / 10
Autorradiografía / 11
Microscopía de expansión / 12
MICROSCOPÍA / 12
Microscopía óptica / 12
Estudio de un preparado histológico en el microscopio óptico / 14
Otros sistemas ópticos / 15
Microscopía de superresolución / 21
Microscopía electrónica / 21
Microscopía de fuerza atómica / 23
Microscopía virtual / 23
Cuadro 1-1 Correlación clínica: biopsias por congelación / 4
Cuadro 1-2 Consideraciones funcionales: microespectrofotometría de Feulgen / 7
Cuadro 1-3 Correlación clínica: anticuerpos monoclonales en medicina / 9
Cuadro 1-4 Consideraciones funcionales: uso correcto del microscopio óptico / 17
HISTOLOGÍA 101 / 26

■ FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA

El objetivo de un curso de histología es lograr que el estudiante comprenda la microanatomía de las células, los tejidos y los órganos, así como correlacionar estas estructuras con su función.

La ***histología*** (*gr., histos, tejido; gr., logia, ciencia*), también llamada ***anatomía microscópica***, es el estudio científico de las estructuras microscópicas de los tejidos y los órganos del cuerpo. La histología moderna no es solo una ciencia descriptiva, sino que también incluye numerosos aspectos de la biología molecular y celular, que ayudan a describir la organización y la función celular. Las técnicas utilizadas por los histólogos son muy diversas. La mayoría de los contenidos de un curso de histología se pueden formular en términos de la microscopía óptica. En la actualidad, los estudiantes en los laboratorios de histología utilizan ya sea **microscopios ópticos** o, con mayor frecuencia, **microscopía virtual**, en la que se pueden observar muestras microscópicas sobre la pantalla de un equipo informático o dispositivo móvil. Antes se realizaba una interpretación más detallada de la microanatomía con **microscopio electrónico** (**ME**), tanto con el **ME de transmisión** (**MET**) como con el **ME de barrido** (**MEB**). Hoy en día, el **microscopio de fuerza atómica** (**MFA**) también puede proporcionar **imágenes de alta resolución** que son comparables o incluso mejores que las obtenidas con el MET. Tanto el ME como el MFA, debido a su resolución mayor y aumento más útil, suelen ser el último paso en la adquisición de datos a partir de muchas técnicas auxiliares de la biología celular y molecular. Sin embargo, el empleo de técnicas de superresolución se está incrementando en la investigación biológica celular y molecular, en gran parte porque se pueden obtener imágenes de alta resolución directamente de las células vivas mediante microscopía de fluorescencia. Estas **técnicas auxiliares** incluyen:

- Varios métodos de tinción (que mejoran el contraste de las imágenes microscópicas)
- Histoquímica y citoquímica
- Técnicas de inmunocitoquímica y de hibridación
- Autorradiografía

booksmedicos.org

- Cultivo de tejidos y órganos
- Separación de células y orgánulos por centrifugación diferencial
- Preparación tisular especializada (p. ej., en la microscopía de expansión)
- Técnicas microscópicas especializadas (p. ej., microscopía de superresolución)
- Sistemas ópticos especializados (p. ej., microscopios de polarización, de barrido confocal o de fluorescencia de lámina de luz)

Los estudiantes pueden sentirse ajenos a estas técnicas y procedimientos experimentales debido a que no suelen tener una experiencia directa con ellos en los programas actuales de la asignatura. Sin embargo, es importante conocer estos procedimientos especializados y los datos que proporcionan. *Este capítulo ofrece un resumen de las técnicas y una explicación de cómo los datos aportados por estas pueden ayudar al estudiante a comprender mejor la función de las células, los tejidos y los órganos.*

Un problema que enfrentan los estudiantes de histología es comprender la naturaleza de la imagen bidimensional del preparado histológico de una microfotografía electrónica y cómo esta imagen se relaciona con la estructura tridimensional de la cual proviene. Para salvar esta brecha conceptual, primero es necesario presentar una descripción de las técnicas mediante las cuales se producen los preparados y las muestras de la microscopía electrónica.

■ PREPARACIÓN DEL TEJIDO

Tinción con hematoxilina-eosina con fijación en formalina

El corte habitual teñido con hematoxilina-eosina es la muestra que se utiliza con mayor frecuencia.

El conjunto de preparados que se entrega a cada estudiante junto con el microscopio óptico en general contiene muestras **fijadas con formalina** (**formol**), **incluidas en parafina** y **teñidas con hematoxilina-eosina** (**H&E**). Casi todas las microfotografías ópticas en la sección del *Atlas* de esta obra son de preparados de estos grupos de estudio. Además, la mayoría de las microfotografías utilizadas para ilustrar tejidos y órganos en la cátedra y las conferencias de histología son de estos preparados. A veces se emplean otras técnicas de tinción para mostrar 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**, que en general se logra mediante una sustancia química o una mezcla de estas, conserva de forma permanente la estructura del tejido para tratamientos posteriores. Las muestras deben sumergirse en el fijador inmediatamente después de extraerse del cuerpo. La fijación sirve para:

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

El fijador más habitual es la **formalina**, una solución acuosa de formaldehído al 37% (formol), en diluciones variadas y en combinación con otras sustancias químicas y amortiguadores. El formaldehído conserva la estructura general de la célula y de los componentes extracelulares al reaccionar con los grupos amino de las proteínas (a menudo, con los enlaces cruzados de residuos de lisina). Como el formaldehído no altera de forma significativa la estructura tridimensional, las proteínas mantienen su capacidad para reaccionar con anticuerpos específicos. Esta propiedad es importante en los métodos inmunocitoquímicos de tinción (*véase* p. 7). La solución comercial estándar de formaldehído amortiguado con fosfatos (pH 7) actúa con lentitud, pero penetra bien en el tejido. Sin embargo, como no reacciona con los lípidos, es un mal fijador de las membranas celulares.

En el segundo paso, la muestra se prepara para su inclusión en parafina con el fin de permitir su corte.

Para examinar una muestra, se requiere de su infiltración con un **medio de inclusión** que permita realizar cortes muy finos, en general en el rango de 5-15 µm (1 micrón [µm] equivale a 1/1000 milímetros [mm]; tabla 1-1). Después de la fijación, la muestra se **lava** y se **deshidrata** en una serie de disoluciones de alcohol cuya concentración se incrementa al 100% para remover el agua. En el siguiente paso, el **aclaramiento**, se utilizan solventes orgánicos como el xileno o el tolueno, que son miscibles tanto en alcohol como en **parafina**, para extraer el alcohol antes de la infiltración de la muestra con la parafina fundida.

Cuando la parafina fundida se ha enfriado y endurecido, se corta para formar un bloque de tamaño adecuado. Este bloque se coloca en una máquina cortadora especial, el **microtomo**, que lo secciona con una cuchilla de acero. Los cortes obtenidos se montan sobre un portaobjetos de vidrio utilizando un **medio de montaje** como adhesivo. El *medio de montaje* es una solución que se endurece en un montaje permanente y mantiene la muestra unida al vidrio, lo que evita su deterioro con el tiempo (oscurecimiento, desvanecimiento, disolución, cristalización, etc.). Los medios de montaje permanente no acuosos empleados con mayor frecuencia son resinas sintéticas basadas en tolueno (Permount®), bálsamo de Canadá (una trementina hecha de la resina del abeto balsámico) y muchos otros. Los medios de base acuosa se usan a menudo en inmunocitoquímica e incluyen productos a base de glicerol y gelatina.

En el tercer paso, la muestra se tiñe para permitir su observación.

Como los cortes en parafina son incoloros, la muestra todavía no está lista para su observación bajo el microscopio óptico. Para teñir los cortes histológicos, la parafina debe disolverse y extraerse, otra vez con xileno o tolueno, y los tejidos deben rehidratarse mediante una serie de disoluciones de alcohol con concentración decre-

TABLA 1-1 Equivalentes lineales de empleo frecuente

1 picómetro	=	0.01 angstrom (Å)
1 angstrom	=	0.1 nanómetro (nm)
10 angstroms	=	1 nanómetro
1 nanómetro	=	1 000 picómetros (pm)
1000 nanómetros	=	1 micrón (µm)
1000 micrones	=	1 milímetro (mm)

booksmedicos.org

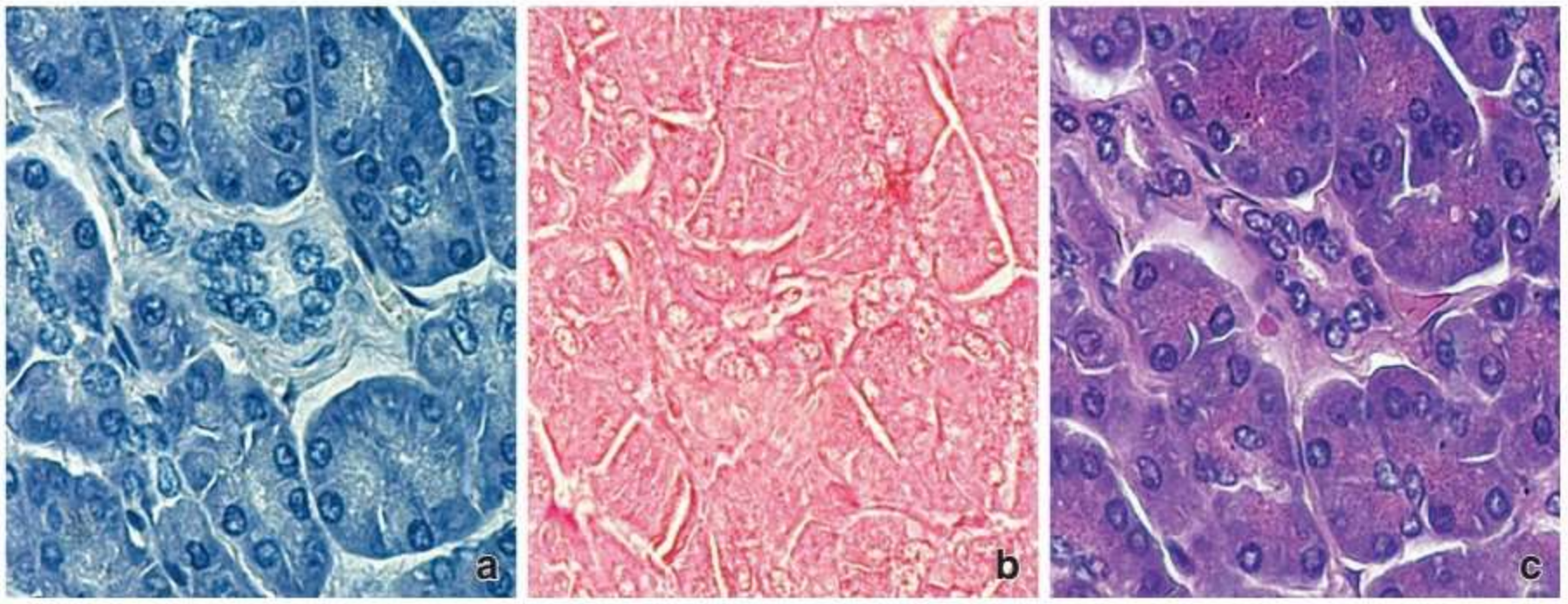


FIGURA 1-1. Tinción con hematoxilina-eosina (H&E). Este conjunto de muestras del páncreas son secciones en serie (adyacentes) que permiten observar el efecto de la hematoxilina y la eosina utilizadas solas y en combinación. **a.** Esta microfotografía solo revela la tinción con hematoxilina. Aunque hay una tinción global de la muestra, los componentes y las estructuras que tienen una alta afinidad por el colorante se tiñen con mayor intensidad (p. ej., el ADN nuclear y las áreas de la célula que contienen ARN citoplasmático). **b.** En esta microfotografía, la eosina (la contratinción) también tiene un efecto de tinción global cuando se usa sola. Sin embargo, se aprecia que el núcleo es menos visible que en la muestra teñida solo con hematoxilina. Una vez que la muestra está teñida con hematoxilina y se prepara para ser teñida con eosina en una disolución de alcohol, la hematoxilina que no está estrechamente unida se pierde y la eosina tiñe aquellos componentes con los que tiene una alta afinidad. **c.** En esta microfotografía se aprecia el efecto de la tinción combinada de H&E. 480×.

ciente. A continuación, el tejido sobre el portaobjetos se tiñe con **hematoxilina** en agua. Debido a que el colorante de contraste, la **eosina**, es más soluble en alcohol que en agua, se vuelve a deshidratar la muestra a través de una serie de disoluciones alcohólicas de concentración creciente y después se tiñe con eosina en alcohol. En la figura 1-1 se presentan los resultados de la tinción con hematoxilina sola, con eosina sola y con ambos colorantes. Una vez teñida, la muestra se pasa por xileno o tolueno y se le coloca un medio de montaje no acuoso encima antes de cubrirla con un cubreobjetos para obtener un preparado permanente.

Otros fijadores

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

Si bien los cortes teñidos con H&E de muestras fijadas en formalina resultan prácticos, ya que muestran adecuadamente las características estructurales generales, no permiten dilucidar la composición química específica de los elementos celulares. Además, muchos componentes se pierden durante la preparación de la muestra. Para conservar estos componentes y estructuras, se deben utilizar otras técnicas de fijación. En general, estas técnicas se fundamentan en un conocimiento sólido de la química implicada. Por ejemplo, los alcoholes y solventes orgánicos que se usan en preparados de rutina diluyen los lípidos neutros.

Para conservar los lípidos neutros, como los de las células adiposas, deben emplearse cortes por congelación de tejido fijado en formalina y colorantes que se disuelvan en grasa; para conservar las estructuras de la membrana, se utilizan fijadores especiales con metales pesados, como permanganato y osmio, que se unen a los fosfolípidos (cuadro 1-1). El uso rutinario 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.

Otras técnicas de tinción

La hematoxilina y la eosina se usan principalmente para observar las características estructurales.

A pesar de las ventajas de la tinción con H&E, el procedimiento no permite ver de forma adecuada ciertos componentes estructurales de los cortes histológicos, como la elastina, las fibras reticulares, las membranas basales y los lípidos. Cuando se desea observar estos componentes, se pueden utilizar otros métodos de tinción, en su mayoría selectivos. Estos procedimientos incluyen la orceína y la fucsina-resorcina para el material elástico y la impregnación argéntica para las fibras reticulares y las membranas basales. Las bases químicas de muchos métodos de tinción no se entienden por completo. Comprender los conceptos básicos de un procedimiento de tinción es a menudo más importante que conocer con precisión todos los pasos que están involucrados en ese proceso.

■ HISTOQUÍMICA Y CITOQUÍMICA

Los procedimientos químicos específicos pueden proporcionar información acerca de la función de las células y de los componentes extracelulares de los tejidos.

Los procedimientos histoquímicos y citoquímicos pueden basarse en la **unión específica de un colorante**, en el uso de **anticuerpos marcados con un colorante fluorescente para un componente celular** en particular o en la **actividad enzimática inherente** de un elemento constitutivo de la célula. Además, muchas macromoléculas presentes en las células pueden detectarse mediante una **autorradiografía**, en la cual precursores moleculares marcados radioactivamente se agregan a las células y los tejidos antes de la fijación. Muchos de estos procedimientos pueden emplearse en preparados tanto para la microscopía óptica como para la electrónica.

booksmedicos.org

CUADRO 1-1

CORRELACIÓN CLÍNICA: BIOPSIAS POR CONGELACIÓN

Algunas veces se solicita a un patólogo que evalúe inmediatamente el tejido obtenido durante la cirugía, en especial cuando el diagnóstico patológico instantáneo puede determinar cómo procederá la operación. Hay varias indicaciones para realizar una evaluación de este tipo, conocida habitualmente como ***corte por congelación*** o *cortes congelados*. Lo más frecuente es que un cirujano en el quirófano pida un corte por congelación cuando no tiene un diagnóstico preoperatorio o cuando se deben identificar hallazgos intraoperatorios inesperados. Además, el cirujano puede querer determinar si se ha extirpado toda una masa patológica dentro del límite de tejido sano y si el margen de la resección quirúrgica está libre de tejido enfermo. Los cortes por congelación también se emplean en combinación con otros procedimientos como la endoscopia o la biopsia con aguja fina para confirmar si el material de biopsia obtenido se podrá utilizar en estudios patológicos adicionales.

En la preparación de los cortes por congelación hay tres pasos principales involucrados:

- **Congelación de la muestra de tejido.** Las muestras pequeñas de tejido se congelan usando dióxido de carbono comprimido o mediante inmersión en un líquido frío (isopentano) a una temperatura de −50 °C. La congelación puede lograrse en un refrigerador especial de alta eficiencia. La congelación vuelve sólido el tejido y permite la sección con un microtomo.
- **Corte del tejido congelado.** El corte se realiza, en general, dentro de un criostato, un compartimento refrigerado que contiene un microtomo. Como el tejido está congelado, se pueden efectuar cortes extremadamente finos (5-10 µm). Las secciones se montan sobre un portaobjetos.
- **Tinción de los cortes.** La tinción se lleva a cabo para diferenciar los núcleos celulares del resto del tejido. Las tinciones más utilizadas para las secciones congeladas son H&E, azul de metileno (fig. C1-1-1) y ácido peryódico de Schiff.

El proceso completo de preparación y evaluación de los cortes congelados puede finalizarse en solo 10 minutos. El tiempo total para obtener resultados depende en gran medida del tiempo de transporte del tejido desde el quirófano al laboratorio de patología, la técnica histológica utilizada y la experiencia del patólogo. Luego, los hallazgos se comunican directamente al cirujano que espera en el quirófano.

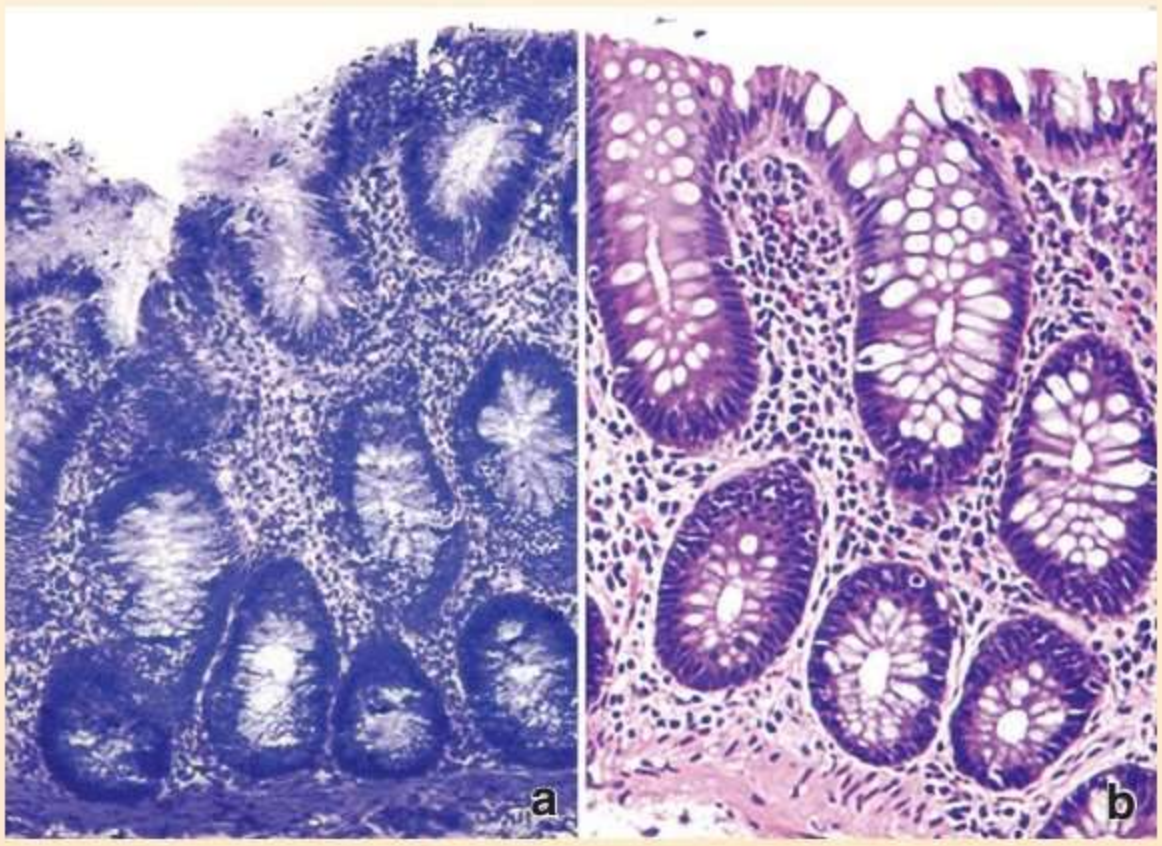


FIGURA C1-1-1. Evaluación de una muestra obtenida durante una cirugía mediante la técnica de corte por congelación. a. En esta microfotografía se observa una muestra obtenida del intestino grueso que se preparó mediante la técnica de corte por congelación y se tiñó con *azul* de metileno. 160×. **b.** Parte de la muestra se fijó en formalina y se procesó como una preparación rutinaria de H&E. El estudio del corte por congelación reveló que era normal. Este diagnóstico se confirmó más tarde al examinar la muestra de H&E preparada de forma rutinaria. 180× (cortesía del Dr. Daniel W. Visscher).

Antes de analizar la química de las tinciones de rutina y de las técnicas histoquímicas y citoquímicas, es conveniente describir brevemente la naturaleza de un corte histológico de rutina.

Composición química de las muestras histológicas

La composición química de un tejido listo para una tinción de rutina difiere de la composición del tejido vivo.

Los componentes que permanecen después de la fijación son principalmente moléculas grandes que no se disuelven con facilidad, en especial después de aplicar el fijador. Estas moléculas, sobre todo aquellas que reaccionan con otras moléculas grandes para formar complejos macromoleculares, en general se conservan en una sección de tejido. Los siguientes son ejemplos de estos grandes complejos macromoleculares:

- **Nucleoproteínas** formadas por ácidos nucleicos unidos a proteínas.
- **Proteínas intracelulares del citoesqueleto** en complejos con proteínas asociadas.
- **Proteínas extracelulares** en grandes agregados insolubles, unidos a moléculas similares mediante enlaces cruzados de moléculas vecinas, como ocurre en la formación de las fibras de colágeno.
- **Complejos de fosfolípidos y proteínas (o hidratos de carbono) en las membranas.**

Estas moléculas constituyen la estructura de las células y los tejidos, es decir, son los elementos celulares del tejido. Son la base de la organización del tejido que se observa con el microscopio.

booksmedicos.org

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 son los componentes estructurales visibles y además participan en el proceso de contracción. El ácido ribonucleico (ARN) del citoplasma aparece como parte de un componente estructural (p. ej., el ergastoplasma o retículo endoplásmico rugoso [RER] de las células secretoras o el cuerpo de Nissl de las neuronas) y es también el participante activo en las síntesis de proteínas.

Muchos de los componentes tisulares desaparecen durante el proceso de preparación de rutina de los cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

Aunque los ácidos nucleicos, las proteínas y los fosfolípidos en su mayoría se conservan en los cortes tisulares, también se pierden de forma considerable. Las proteínas y los ácidos nucleicos pequeños, como los ARN de transferencia, en general desaparecen durante la preparación del tejido. Como ya se mencionó, los lípidos neutros suelen disolverse en los solventes orgánicos utilizados en la preparación de tejidos. También pueden perderse otras moléculas grandes, por ejemplo, al ser hidrolizadas como consecuencia del pH desfavorable de las soluciones fijadoras. Algunos ejemplos de moléculas que se pierden durante la fijación de rutina en fijadores acuosos son:

- **Glucógeno** (hidrato de carbono intracelular abundante en el hígado y las células musculares).
- **Proteoglucanos** y **glucosaminoglucanos** (hidratos de carbono complejos extracelulares que se encuentran en el tejido conjuntivo).

Sin embargo, estas moléculas pueden conservarse si se utilizan fijadores no acuosos para el glucógeno o se añaden agentes ligadores especiales a la solución fijadora que preserven las moléculas extracelulares que contienen hidratos de carbono.

También se pierden componentes solubles, iones y moléculas pequeñas durante la preparación de muestras de parafina.

Se pierden metabolitos intermedios, glucosa, sodio, cloro y sustancias similares durante la preparación de muestras de rutina en parafina teñidas con H&E. Muchas de estas sustancias pueden estudiarse en preparados especiales, a veces con una pérdida considerable de la integridad estructural. Estos iones y pequeñas moléculas solubles no constituyen los elementos celulares de un tejido; participan en procesos de síntesis o reacciones celulares. Cuando pueden conservarse y detectarse mediante técnicas específicas, aportan información muy valiosa sobre el metabolismo celular, 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 estabilizar la estructura macromolecular a través de uniones de hidrógeno.

Fundamentos químicos de la tinción

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 [colorante$^-$ Na$^+$].

Un **colorante básico** tiene una *carga neta positiva* en su parte coloreada y se describe con la fórmula general [colorante$^+$Cl$^-$].

La **hematoxilina** no es exactamente un colorante básico, pero tiene propiedades muy semejantes a las de estos. El color de un colorante no está relacionado con el hecho de que sea ácido o básico, como lo demuestran los ejemplos de colorantes ácidos o básicos presentados en la tabla 1-2.

TABLA 1-2 Algunos colorantes básicos y ácidos

Colorantes	Color
Básicos	
Verde de metilo	Verde
Azul de metileno	Azul
Pironina G	Rojo
Azul de toluidina	Azul
Ácidos	
Fucsina ácida	Rojo
Anilina azul	Azul
Eosina	Rojo
Naranja G	Naranja

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

Los **componentes aniónicos** incluyen 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 para reaccionar con un colorante básico se denomina ***basofilia*** (*afinidad por bases o álcalis*). Los componentes tisulares que se tiñen con hematoxilina también exhiben basofilia.

La reacción de los grupos aniónicos varía según el pH:

- Con un *pH alto* (cerca de 10), los tres grupos están ionizados y disponibles para la reacción con el colorante básico mediante uniones electrostáticas.
- Con un *pH ligeramente ácido a neutro* (de 5 a 7), los grupos fosfato y sulfato están ionizados y disponibles para reaccionar con el colorante básico a través de uniones electrostáticas.
- Con un *pH bajo* (inferior a 4), solo los grupos sulfato se mantienen ionizados y reaccionan con colorantes básicos.

Por lo tanto, la tinción con colorantes básicos a un pH determinado se puede utilizar para centrar el estudio sobre grupos aniónicos específicos; como estos grupos predominan en ciertas macromoléculas, la tinción sirve como un indicador de estas.

Como se mencionó anteriormente, la **hematoxilina** no es un colorante básico en sentido estricto: se emplea con un **mordiente** (un intermediario entre el componente del tejido y el colorante). El mordiente hace que la tinción se parezca a un colorante básico. La unión en el complejo **tejido-mordiente-hematoxilina** no es un simple enlace electrostático; cuando los cortes se colocan en agua, la hematoxilina no se disocia del tejido. La hematoxilina es adecuada para aquellos procedimientos tintoriales en los que dicha tinción viene seguida por soluciones acuosas de colorantes ácidos. A diferencia de la hematoxilina, los colorantes básicos verdaderos no suelen utilizarse en secuencias en las que estos van seguidos por un colorante ácido. Los colorantes básicos verdaderos tienden a disociarse del tejido durante los lavados en soluciones acuosas entre las dos soluciones de tinción.

booksmedicos.org

Los colorantes ácidos reaccionan con los grupos catiónicos en 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*** (*afinidad por los ácidos*). Las reacciones de los componentes celulares y tisulares 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; por ello, los colorantes ácidos a veces se utilizan en combinación para teñir selectivamente distintos componentes tisulares. Por ejemplo, en la **técnica de tinción de Mallory** se emplean tres colorantes ácidos: anilina azul, fucsina ácida y naranja G. Estos colorantes tiñen de forma selectiva el colágeno, el citoplasma (en general) y los eritrocitos, respectivamente. La fucsina ácida también tiñe los núcleos.

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

Los colorantes básicos también pueden utilizarse en combinación o de forma secuencial (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.

Hay pocas sustancias dentro de las células y en la matriz extracelular que presentan basofilia.

Entre estas sustancias se incluyen:

- **Heterocromatina** y **nucléolos** en el 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 ARN ribosómico).
- **Materiales extracelulares**, por ejemplo, los hidratos de carbono complejos de la matriz del cartílago (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.

Entre estas sustancias se 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 especializado.
- La mayoría de las **fibras extracelulares** (principalmente debido a grupos amino ionizados).

Metacromasia

Ciertos colorantes básicos reaccionan con componentes tisulares que cambian su color normal de azul a rojo o púrpura; este cambio de la absorbancia se llama *metacromasia*.

El mecanismo subyacente para la **metacromasia** es la presencia de **polianiones** en el tejido. Cuando estos tejidos se tiñen con una solución colorante básica concentrada, como el **azul de toluidina**, las moléculas del colorante están lo suficientemente cerca como para formar agregados diméricos y poliméricos. Las propiedades de absorción de estos agregados difieren de las propiedades individuales de absorción de las moléculas no agregadas de colorante.

Las estructuras celulares y tisulares que tienen altas concentraciones de grupos sulfato y fosfato ionizados, como la sustancia fundamental del cartílago ionizado, los gránulos de heparina de los mastocitos y el retículo endoplasmático rugoso de los plasmocitos, exhiben metacromasia. Por lo tanto, el azul de toluidina se observará de púrpura a rojo cuando tiña estos componentes.

Grupos aldehído y el reactivo de Schiff

La capacidad de la fucsina básica decolorada (reactivo de Schiff) para reaccionar con los grupos aldehído causa la aparición de un color rojo distintivo y es la base de las reacciones de ácido peryódico de Schiff y de Feulgen.

La reacción de **ácido peryódico de Schiff** (**PAS, *periodic acid-Schiff reaction***) tiñe hidratos de carbono y macromoléculas con abundancia de estos. Se usa para mostrar el glucógeno en las células, el moco en diversas células y tejidos, y la membrana basal subyacente en epitelios y fibras reticulares en el tejido conjuntivo. El reactivo de Schiff también se utiliza en la **reacción de Feulgen**, basada en una hidrólisis débil con ácido clorhídrico para teñir el ácido desoxirribonucleico (ADN).

La reacción de PAS tiene los siguientes fundamentos:

- Los anillos de hexosa de los hidratos de carbono contienen carbonos contiguos, cada uno de los cuales lleva un grupo hidroxilo (–OH).
- Las hexosaminas de los glucosaminoglucanos contienen carbonos contiguos, uno de los cuales lleva un grupo –OH, mientras que el otro lleva un grupo amino ($-NH_2$).
- El ácido peryódico escinde la unión entre estos átomos de carbono contiguos y forma grupos aldehído.
- Estos grupos aldehído reaccionan con el reactivo de Schiff para dar un color púrpura distintivo.

La tinción PAS de la membrana basal (fig. 1-2) y las fibras reticulares se basa en el contenido o asociación de proteoglucanos (hidratos de carbono complejos asociados con un núcleo proteínico). Esta tinción es una alternativa a los métodos de impregnación argéntica, que también se basan en la reacción con las moléculas de sacáridos en los proteoglucanos.

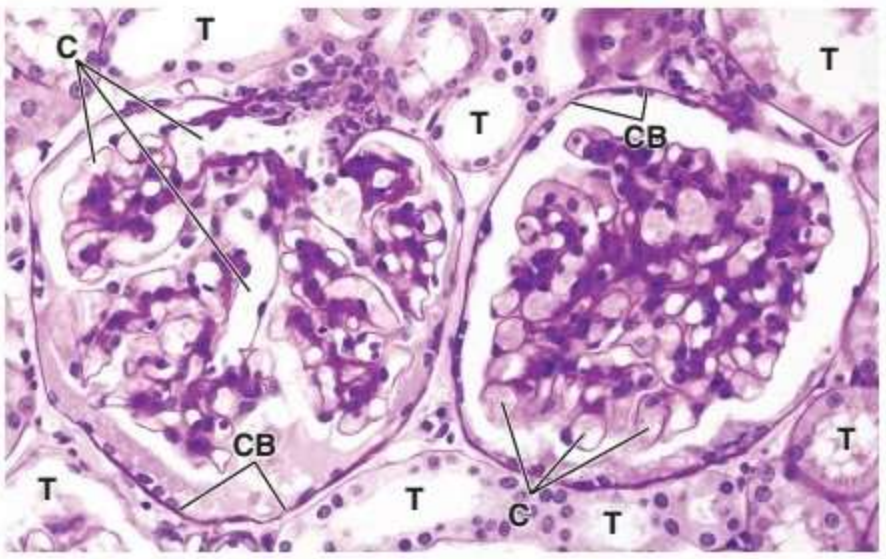


FIGURA 1-2. Microfotografía de tejido renal teñido con el método del ácido peryódico de Schiff (PAS). En este método histoquímico se muestran y localizan los hidratos de carbono y las macromoléculas ricas en estas sustancias. Las membranas basales son positivas al PAS, como lo muestra el color *magenta* de estos sitios. Los túbulos renales (*T*) están delimitados por la membrana basal teñida que rodea los túbulos. Los capilares glomerulares (*C*) y el epitelio de la cápsula de Bowman (*CB*) también presentan membranas basales PAS positivas. La tinción de contraste de la muestra, con hematoxilina, permite visualizar los núcleos celulares. 320×.

booksmedicos.org

CUADRO 1-2

CONSIDERACIONES FUNCIONALES: MICROESPECTROFOTOMETRÍA DE FEULGEN

La **microespectrofotometría de Feulgen** es una técnica creada para estudiar los aumentos de ADN en las células en desarrollo y para analizar la *ploidía*, es decir, la cantidad de veces que se multiplica el contenido normal de ADN de una célula (se dice que una célula normal, sin división, es *diploide*; un espermatozoide o un óvulo son *haploides*). Para cuantificar el ADN nuclear se utilizan dos técnicas: **citometría estática** para las secciones de tejido y **citometría de flujo** para las células individuales.

La citometría estática de las muestras de tumores teñidas con Feulgen utiliza microespectrofotometría junto con un sistema de imágenes digitalizadas para medir la absorción de luz emitida por las células y los grupos celulares en una longitud de onda de 560 nm. Por otra parte, la citometría de flujo emplea instrumentos capaces de detectar solo células individuales que pasan por un sensor en un medio líquido. Esta técnica proporciona un análisis rápido y cuantitativo de una sola célula para medir la emisión de luz fluorescente.

Actualmente, la microespectrofotometría de Feulgen se utiliza para estudiar los cambios en el contenido de ADN en células en división que experimentan diferenciación. También se emplea en la clínica para analizar cantidades anómalas de cromosomas (patrones de ploidía) en células malignas. En cuanto a las células malignas que tienen un patrón en gran parte diploide, se dice que están "bien diferenciadas"; los tumores con estos tipos de células tienen un mejor pronóstico que los tumores *aneuploides* (que no son múltiplos de la cantidad haploide de ADN) y las células tetraploides. La microespectrofotometría de Feulgen ha sido particularmente útil para estudiar adenocarcinomas específicos (cánceres epiteliales) y cáncer de mama, riñón, colon (y otros cánceres digestivos), endometrio (epitelio uterino) y ovario. Es una de las herramientas más valiosas para los patólogos al momento de evaluar el potencial metastásico de estos tumores y durante la toma de decisiones de pronóstico y tratamiento.

La **reacción de Feulgen** se basa en la escisión de las purinas de la desoxirribosa del ADN mediante una hidrólisis ácida débil; el anillo sacárido se abre y se forman grupos aldehído. Una vez más, los grupos aldehído recién formados reaccionan con el reactivo de Schiff para generar el color púrpura característico (cuadro 1-2). La reacción del reactivo de Schiff con el ADN es **estequiométrica**, lo que significa que el producto de esta reacción es mensurable y proporcional a la cantidad de ADN. Por consiguiente, se puede usar en los métodos espectrofotométricos para cuantificar la cantidad de ADN en el núcleo de una célula. El ARN no se tiñe con el reactivo de Schiff porque carece de desoxirribosa.

Digestión enzimática

La digestión enzimática de una sección adyacente de un componente específico teñido (como glucógeno, ADN o ARN) puede usarse para confirmar la identidad del material que se tiñe.

El material intracelular que se tiñe mediante la reacción de PAS puede identificarse como glucógeno a través del tratamiento previo de los cortes con diastasa o amilasa. La falta de tinción después de este tratamiento identifica de manera positiva el material teñido como glucógeno.

Del mismo modo, el pretratamiento de los cortes histológicos con una desoxirribonucleasa (ADNasa) impedirá la tinción de Feulgen en esos cortes; el tratamiento de las muestras de epitelios secretores de proteínas con una ribonucleasa (ARNasa) evitará la tinción del ergastoplasma con colorantes básicos.

Histoquímica enzimática

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

Para localizar enzimas en cortes histológicos, se debe tener un cuidado especial en la fijación con el fin de preservar la actividad enzimática. En general, la fijación aldehídica leve es el método preferido. En estos procedimientos se detecta el producto de reacción de la actividad enzimática y no la enzima propiamente dicha. En general, se utiliza un **reactivo de captura**, ya sea un colorante o un metal pesado, para atrapar o fijar el producto de la reacción de la enzima mediante su precipitación en el sitio de 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 captura (T), el cual precipitará uno de los productos de la siguiente manera:

$$AB + T \xrightarrow{\text{enzima}} AT + B$$

En esta fórmula se muestra que AT es el producto final capturado y B es el sustrato hidrolizado.

Por medio de estas técnicas fue posible correlacionar el lisosoma (identificado por primera vez en estudios celulares de centrifugación diferencial) con un componente vacuolar visible en 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 que se precipitan (p. ej., fosfato de plomo derivado de la acción de la fosfatasa ácida). Entonces, el producto reactivo precipitado puede observarse tanto con un microscopio óptico como con uno electrónico. Se han desarrollado procedimientos histoquímicos similares para mostrar la fosfatasa alcalina, las adenosinas trifosfatasas (ATPasas) de varios tipos (incluida la Na^+/K^+ ATPasa, que es la base enzimática de la bomba de sodio en células y tejidos), diversas esterasas y numerosas enzimas respiratorias (fig. 1-3a).

Uno de los métodos histoquímicos más habituales (empleado con frecuencia junto con la inmunocitoquímica) usa una peroxidasa de rábano para la detección de antígenos mediada por enzimas. Un sustrato ampliamente utilizado para la peroxidasa de rábano es la 3,3'-diaminobenzidina (DAB), un compuesto orgánico incoloro que genera un producto insoluble de color pardo en el sitio de la reacción enzimática (fig. 1-3b). El producto de esta reacción enzimática se puede localizar de manera simple en las células, con lo que produce imágenes de alta resolución tanto en un microscopio óptico como en uno electrónico.

Inmunocitoquímica

La especificidad de la reacción entre el antígeno y el anticuerpo es el fundamento de la inmunocitoquímica.

Los **anticuerpos**, también denominados ***inmunoglobulinas***, son glucoproteínas producidas por células específicas del sistema inmunitario como respuesta a una proteína extraña o **antígeno**.

booksmedicos.org

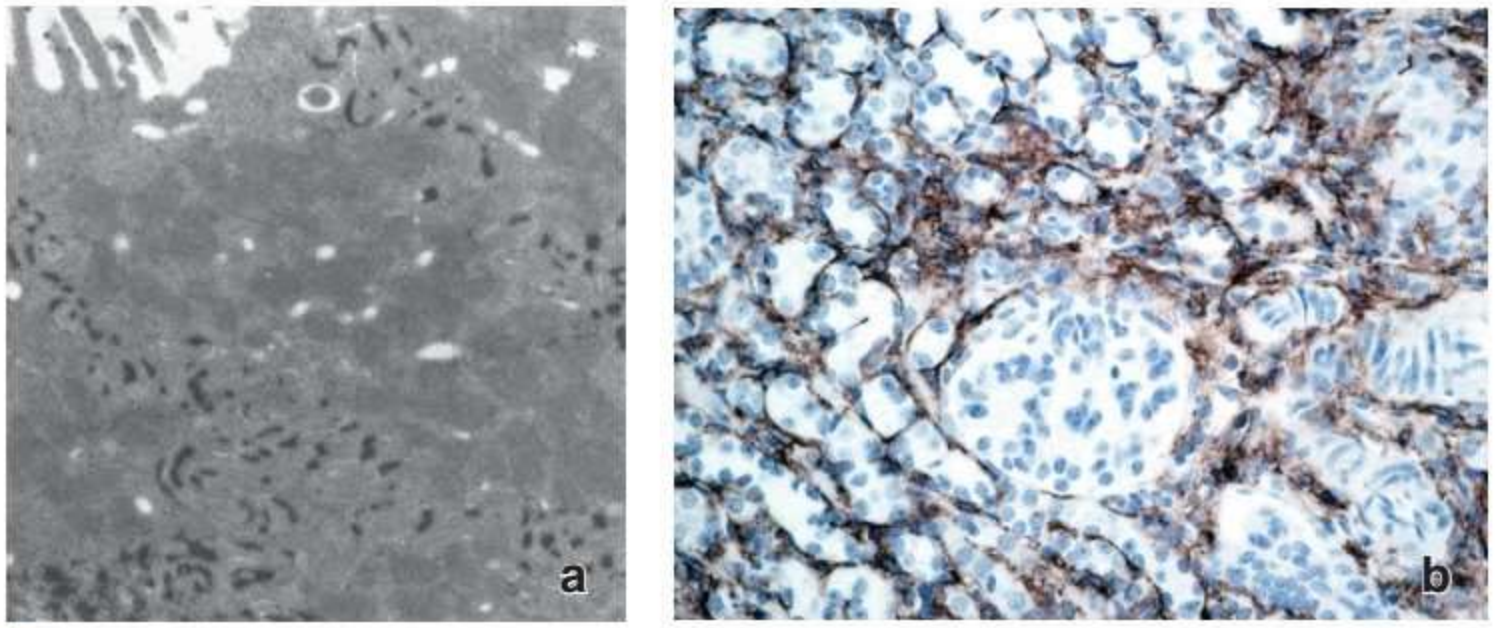


FIGURA 1-3. Procedimientos histoquímicos con microscopía de luz y electrónica. a. En esta microfotografía electrónica se muestra la localización de la ATPasa de membrana en células epiteliales de la vesícula biliar de un conejo. Las *áreas oscuras* visibles en la microfotografía electrónica muestran la ubicación de la enzima ATPasa. Esta enzima se detecta en la membrana plasmática en los dominios laterales de las células epiteliales, que corresponden a la ubicación de las bombas de sodio. Estas células epiteliales están involucradas en el transporte activo de moléculas a través de la membrana plasmática. 26 000×. **b.** Esta microfotografía muestra los macrófagos teñidos con un método histoquímico utilizando anticuerpos marcados con peroxidasa y reactivo DAB. Se tiñó una sección incluida en parafina de riñón de ratón con hipertensión vascular renal en busca de la proteína marcadora específica F4/80+, expresada solo en la superficie de los macrófagos. Inicialmente, los cortes fueron expuestos a anticuerpos de rata antirratón primarios F4/80+, seguido de la incubación con anticuerpos IgG de cabra antirrata secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante. La muestra fue lavada y tratada con un amortiguador (solución tampón o *buffer*) que contenía DAB. En las áreas donde hay macrófagos puede observarse un precipitado marrón (producto de la oxidación del DAB por la peroxidasa de rábano picante). La tinción de contraste de la muestra, con hematoxilina, permite visualizar los núcleos celulares. 400× (cortesía del Dr. Joseph P. Grande).

En el laboratorio, los anticuerpos pueden purificarse de la sangre y conjugarse (asociarse) con un colorante fluorescente. En general, los colorantes fluorescentes (**fluorocromos**) son productos químicos que absorben la luz de diferentes longitudes de onda (p. ej., luz ultravioleta) y luego emiten luz visible de una longitud de onda específica (p. ej., verde, amarillo, rojo). La **fluoresceína**, el colorante más utilizado, absorbe la luz ultravioleta y emite luz verde. Los anticuerpos conjugados con fluoresceína pueden emplearse en cortes de tejidos congelados o ligeramente fijados en un portaobjetos de vidrio para localizar un antígeno en células y tejidos. La reacción del anticuerpo con el antígeno puede entonces observarse y fotografiarse con un microscopio de fluorescencia o un microscopio confocal que produce una reconstrucción tridimensional de los tejidos examinados (fig. 1-4).

En la inmunocitoquímica se utilizan dos tipos de anticuerpos: policlonales, producidos por animales inmunizados, y monoclonales, sintetizados por líneas celulares inmortalizadas que se duplican continuamente.

En un procedimiento típico, una proteína específica, como la actina, se aísla a partir de una célula muscular de una especie (p. ej., una rata) y se inyecta en la circulación de otra (p. ej., un conejo). En el conejo inmunizado, el sistema inmunitario del conejo reconoce las moléculas de actina de la rata como un antígeno extraño. Este reconocimiento desencadena una cascada de reacciones inmunitarias que activan múltiples grupos (clones) de células inmunitarias llamadas ***linfocitos B***. Los clones de linfocitos B finalmente conducen a la producción de anticuerpos antiactina. En conjunto, estos **anticuerpos policlonales** representan mezclas de diferentes anticuerpos producidos por muchos clones de linfocitos B, en los que cada clon reconoce diferentes regiones de la molécula de actina. Los anticuerpos son retirados de la sangre, purificados y conjugados con un colorante fluorescente. Entonces, pueden utilizarse para localizar moléculas de actina en tejidos o células de rata. Si la actina se encuentra presente en una célula o tejido, como un fibroblasto en el tejido conjuntivo, el anticuerpo marcado con fluoresceína se une a la actina y la reacción puede verse con el microscopio de fluorescencia.

Los **anticuerpos monoclonales** (cuadro 1-3) son aquellos producidos por una **línea celular productora de anticuerpos** formada por un solo grupo (clon) de linfocitos B. Se observa un único clon que

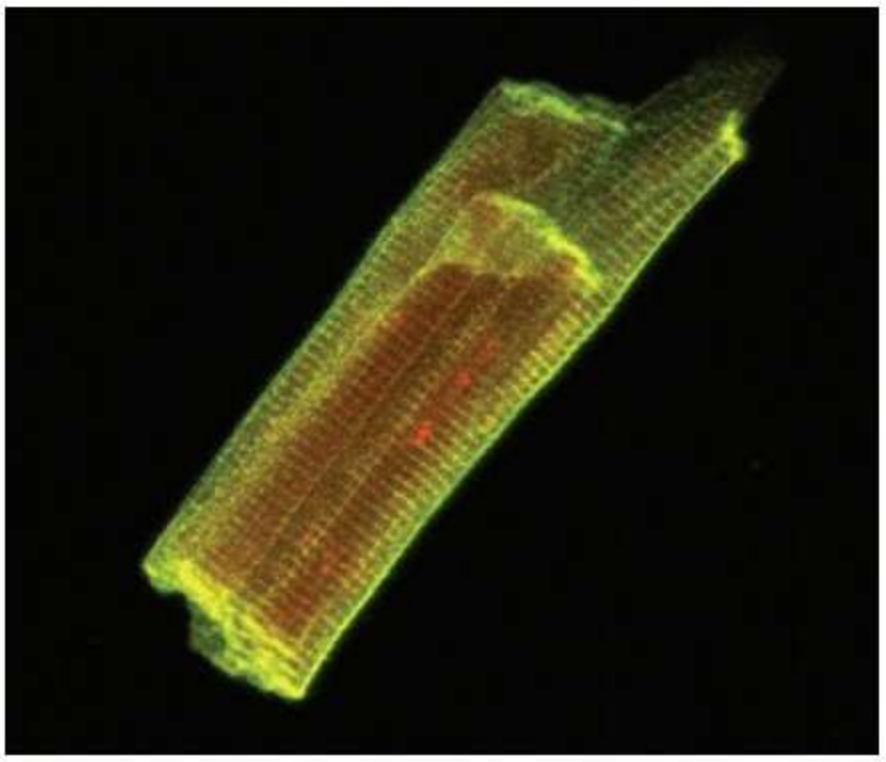


FIGURA 1-4. Imagen microscópica confocal de una célula muscular cardíaca de rata. Esta imagen se obtuvo con un microscopio confocal con el método de inmunofluorescencia indirecta. Se usaron dos anticuerpos primarios. El primero reconoce un transportador de lactato específico (MCT1) y es detectado con un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (*rojo*). El segundo está dirigido contra la proteína transmembrana CD147, estrechamente relacionada con MCT1. Este anticuerpo fue detectado por un anticuerpo secundario marcado con fluoresceína (*verde*). Se puede ver el color *amarillo* en el punto donde los dos anticuerpos secundarios marcados se ubican conjuntamente y con precisión 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 es visible en la profundidad, alejado de la membrana plasmática. Cortesía de los Dres. Andrew P. Halestrap y Catherine Heddle.

booksmedicos.org

CUADRO 1-3

CORRELACIÓN CLÍNICA: ANTICUERPOS MONOCLONALES EN MEDICINA

Los **anticuerpos monoclonales** se utilizan de manera amplia en las técnicas inmunocitoquímicas y también tienen muchas aplicaciones clínicas. Los anticuerpos monoclonales conjugados con compuestos radioactivos se emplean para detectar y diagnosticar metástasis tumorales, diferenciar subtipos de tumores y etapas de su diferenciación, y en el diagnóstico de enfermedades infecciosas al identificar microorganismos en la sangre y los líquidos tisulares. En la actualidad se utilizan anticuerpos monoclonales conjugados con inmunotoxinas, fármacos quimioterápicos o radioisótopos para administrar agentes terapéuticos a células tumorales específicas en el cuerpo.

se convierte en una línea celular en individuos con **mieloma múltiple**, un tumor derivado de una sola célula plasmática productora de anticuerpos. Los pacientes con mieloma múltiple producen una gran población de anticuerpos homogéneos e idénticos con una especificidad idéntica contra un antígeno. Para producir anticuerpos monoclonales contra un antígeno específico, se inmuniza un ratón o rata con ese antígeno. Entonces, los linfocitos B activados se aíslan del tejido linfático (bazo o ganglios linfáticos) del animal y se fusionan con una línea celular del mieloma. Esta fusión produce un **hibridoma**, una línea celular individual inmortalizada que secreta anticuerpos. Para obtener anticuerpos monoclonales contra las moléculas de actina de rata, por ejemplo, los linfocitos B de los órganos linfáticos de conejos inmunizados deben fusionarse con células de mieloma.

Para localizar un antígeno diana en células y tejidos, se utilizan métodos inmunocitoquímicos directos e indirectos.

La técnica de inmunocitoquímica más antigua utilizada para identificar la distribución de un antígeno dentro de las células y los tejidos se conoce como ***inmunofluorescencia directa***. Esta técnica emplea un **anticuerpo primario** marcado con fluorocromo (ya sea policlonal o monoclonal) que reacciona con el antígeno dentro de la muestra (fig. 1-5a). Como procedimiento de un solo paso, este método involucra un único anticuerpo marcado. La visualización de las estructuras no es ideal por la baja intensidad de la emisión de la señal. Debido a la sensibilidad subóptima, los métodos indirectos están reemplazando cada vez más a los métodos de inmunofluorescencia directa.

La **inmunofluorescencia indirecta** proporciona una sensibilidad mucho mayor que los métodos directos y a menudo recibe el nombre de "técnica del emparedado" o "de la capa doble". En lugar 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 **anticuerpo secundario** dirigido contra el anticuerpo primario de rata (p. ej., un anticuerpo de cabra dirigido contra el anticuerpo de rata; fig. 1-5b). Cuando la fluoresceína se conjuga directamente con el anticuerpo primario específico, el método es directo; cuando la fluoresceína se conjuga con un anticuerpo secundario, es indirecto. El método indirecto aumenta de forma considerable la emisión de la señal de fluorescencia del tejido. Una ventaja adicional del método de marcaje indirecto es que un solo anticuerpo secundario se puede utilizar para localizar la unión específica de tejido de diferentes anticuerpos primarios (fig. 1-6). Para los estudios microscópicos, el anticuerpo secundario puede conjugarse con diferentes colorantes fluorescentes, de modo que se vean múltiples marcas en el mismo corte de tejido (*véase* fig. 1-4). Las desventajas de la inmunofluorescencia indirecta son que es costosa, requiere de mucho trabajo y no se adapta fácilmente a los procedimientos automatizados.

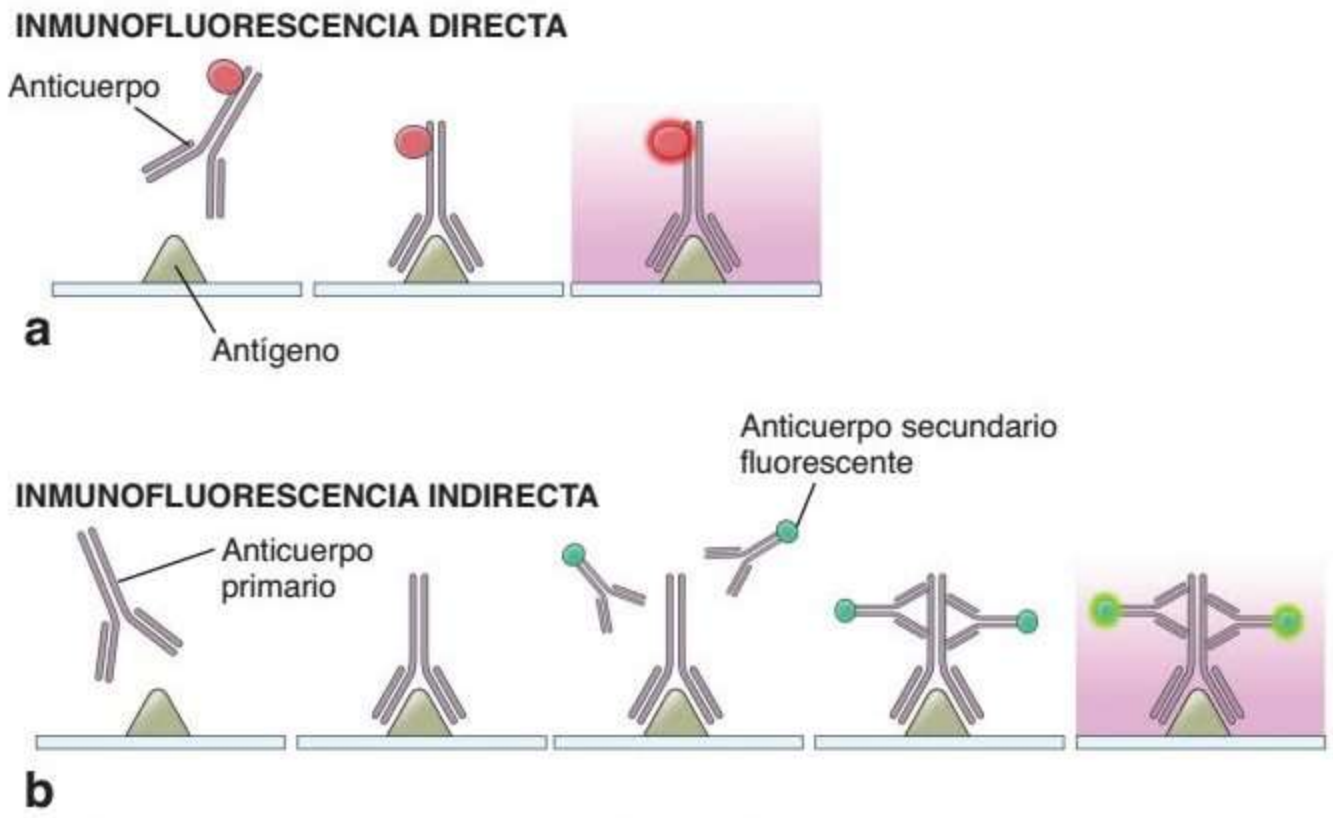


FIGURA 1-5. Inmunofluorescencia directa e indirecta. a. En la inmunofluorescencia directa, un anticuerpo primario marcado con fluorocromo reacciona con un antígeno específico dentro de la muestra de tejido. Las estructuras marcadas se observan después en el microscopio de fluorescencia, en el que una longitud de onda de excitación (en general, luz ultravioleta) desencadena la emisión de otra longitud de onda. Esta longitud de onda depende de la naturaleza del fluorocromo utilizado para el marcado de anticuerpos. **b.** El método indirecto implica dos procesos. Primero, los anticuerpos primarios específicos reaccionan con el antígeno de interés. En segundo lugar, los anticuerpos secundarios, que están marcados con fluorocromo, reaccionan con los anticuerpos primarios. La visualización de estructuras marcadas dentro del tejido es la misma en ambos métodos y requiere el microscopio de fluorescencia.

booksmedicos.org

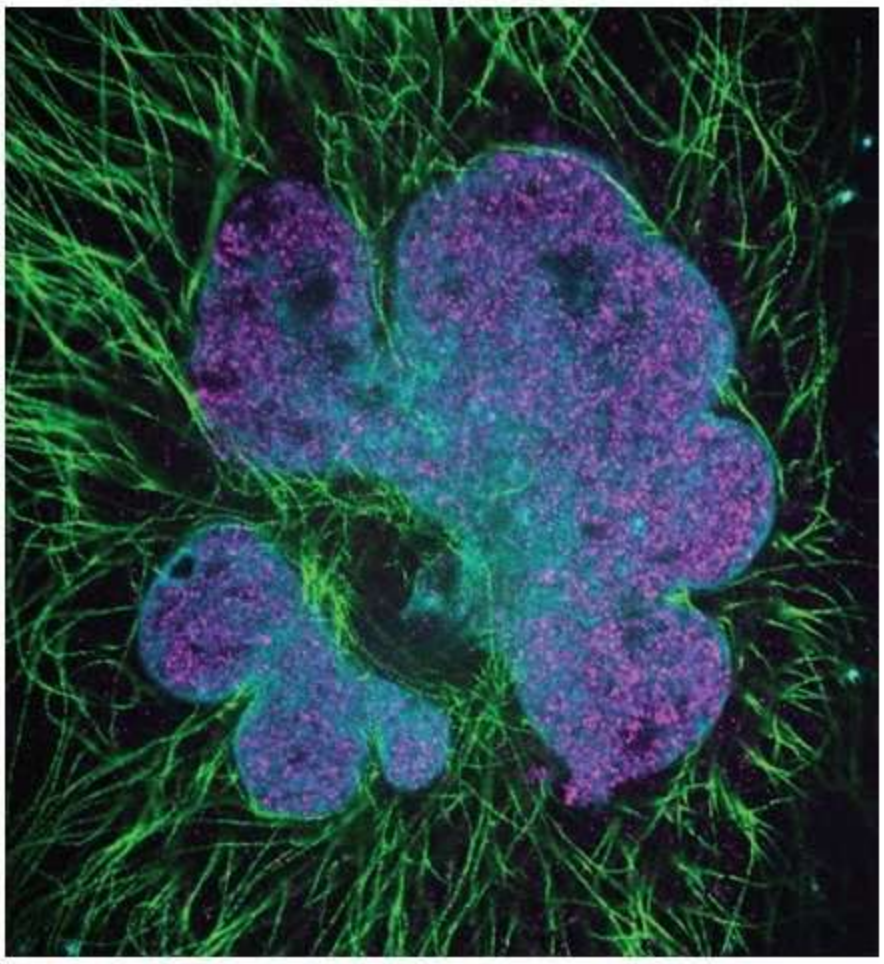


FIGURA 1-6. Microtúbulos e histonas específicas del núcleo visualizados por métodos inmunocitoquímicos utilizando microscopía de expansión. La distribución de los microtúbulos (elementos del citoesqueleto celular marcados en *verde*) y de las histona H3 fosforilada (Ser10) específicas del núcleo (marcadas en *magenta*) obtenidas de la línea celular del cáncer cervical humano HeLa se puede estudiar *in vitro* usando el microscopio de fluorescencia. Los microtúbulos se marcaron mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos primarios policlonales de conejo anti-α-tubulina, y se visualizaron mediante anticuerpos de cabra conjugados secundarios anticonejo con colorante fluorescente *verde* (Alexa Fluor 488). Las histonas se marcaron con anticuerpos primarios antihistona H3 fosforilada (anti-Ser10) monoclonales de ratón y se visualizaron mediante anticuerpos secundarios antirratón conjugados de cabra con colorante fluorescente (CF633). Se realiza una tinción de contraste del ADN de los núcleos con coloración *azul* inespecífica (tinción DAPI). La red de microtúbulos está bien visualizada debido a la alta resolución proporcionada por el procedimiento de microscopía de expansión (factor de expansión: 4.2). Microfotografía cortesía de los Dres. Yongxin Zhao y Edward S. Boyden, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA.

También se pueden conjugar anticuerpos policlonales o monoclonales con otras sustancias, como enzimas (p. ej., peroxidasa de rábano), que convierten sustratos incoloros (p. ej., DAB) en un producto insoluble de un color específico que precipita en el sitio de la reacción enzimática. La tinción que resulta de este **método de inmunoperoxidasa** puede observarse en el microscopio óptico (*véase* fig. 1-3b), con técnicas inmunocitoquímicas directas o indirectas. En otra variante, el oro coloidal o la ferritina (una molécula que contiene hierro) pueden unirse a la molécula de anticuerpo. Estos marcadores electrodensos pueden observarse directamente con el microscopio electrónico.

Técnicas de hibridación

La hibridación es un método de localización de ARN mensajero (ARNm) o ADN mediante la hibridación de la secuencia de interés a una hebra complementaria de una sonda de nucleótidos.

En general, el término ***hibridación*** describe la capacidad de las moléculas monocatenarias de ARN o ADN para interactuar (hibridar) con secuencias complementarias. En el laboratorio, la hibridación requiere el aislamiento del ADN o ARN, que se mezcla a continuación con una secuencia de nucleótidos complementaria (denominada ***sonda de nucleótidos***). Los híbridos se detectan con mayor frecuencia mediante un marcador radioactivo adherido a un componente del híbrido.

La unión de la sonda y la secuencia puede tener lugar en una solución o en una membrana de nitrocelulosa. En la **hibridación *in situ***, la unión de la sonda de nucleótidos a la secuencia de ADN o ARN de interés se realiza dentro de células o tejidos, como células cultivadas o embriones completos. Esta técnica permite la localización de secuencias de nucleótidos específicas tan pequeñas como 10 o 20 copias de ARNm o ADN por célula.

Se utilizan varias sondas de nucleótidos en la hibridación *in situ*. Las **sondas de oligonucleótidos** pueden ser tan pequeñas como de 20-40 pares de bases. Las sondas de ADN monocatenario o bicatenario son mucho más largas y pueden contener hasta 1000 pares de bases. Para la localización específica del ARNm, se utilizan sondas de ARN complementarias. Estas sondas están marcadas con isótopos radioactivos (p. ej., ^{32}P, ^{35}S, ^{3}H), un nucleótido específicamente modificado (digoxigenina) o biotina (un marcador covalente multipropósito). Las sondas radioactivas se pueden detectar y visualizar mediante una autorradiografía. La digoxigenina y la biotina se detectan mediante 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. Se forma un enlace más fuerte entre una sonda de ADN y su cadena complementaria y uno más débil entre una sonda de ARN y su cadena complementaria. Si se espera que una muestra de tejido contenga una cantidad mínima de ARNm o un transcrito vírico, pueden emplearse una amplificación mediante la **reacción en cadena de la polimerasa** (**PCR, *polymerase chain reaction***) para el ADN o una PCR con **transcripción inversa** (**RT-PCR, *reverse transcription-PCR***) para el ARN. Los transcritos amplificados obtenidos con estos procedimientos en general se detectan con sondas de nucleótidos complementarias marcadas con técnicas estándares de hibridación *in situ*.

Recientemente, se han combinado tinciones fluorescentes con sondas de nucleótidos, por lo que es posible visualizar múltiples sondas al mismo tiempo (fig. 1-7). Esta técnica, llamada ***técnica de hibridación* in situ *con fluorescencia*** (**FISH**), tiene un uso muy difundido en la clínica para estudios genéticos. Por ejemplo, se puede utilizar

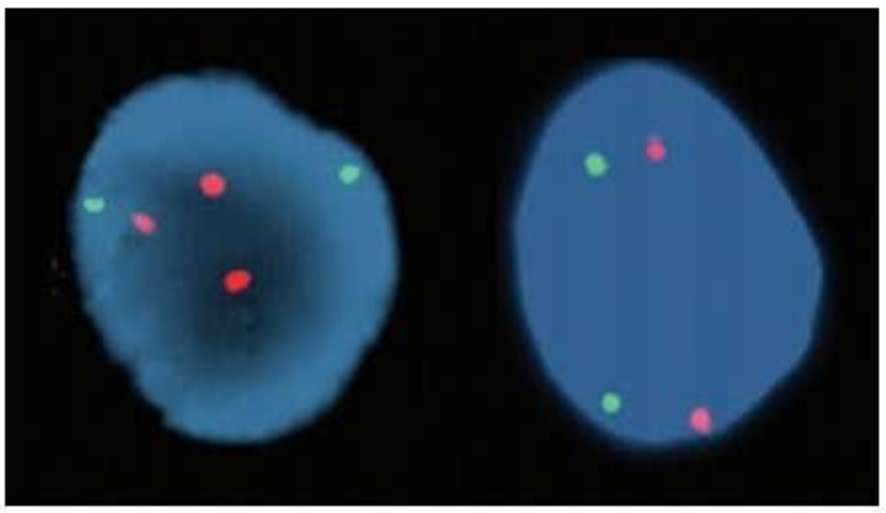


FIGURA 1-7. Ejemplo de la técnica FISH utilizada en las pruebas de diagnóstico prenatal. Núcleos en interfase de células obtenidas de muestras de líquido amniótico hibridadas con dos sondas de ADN específicas. La sonda *naranja* (LSI 21) es específica del locus para el cromosoma 21, y la sonda *verde* (LSI 13) es específica del locus para el cromosoma 13. El núcleo de la *derecha* es de una muestra de líquido amniótico normal y revela dos señales *verdes* y dos *naranjas*, que indican dos copias de los cromosomas 13 y 21, respectivamente. El núcleo de la *izquierda* tiene tres señales *naranjas*, que indican trisomía 21 (síndrome de Down). Se ha realizado una tinción de contraste del ADN de los núcleos con un colorante *azul* inespecífico (tinción DAPI) para hacer visible el núcleo. 1250× (cortesía del Dr. Robert B. Jenkins).

booksmedicos.org

una sonda hibridada con cromosomas en metafase para identificar la posición cromosómica de un gen. La **técnica FISH** se emplea para examinar simultáneamente los cromosomas, la expresión génica y la distribución de productos génicos, como proteínas patológicas o anómalas. En la actualidad, hay en el mercado numerosas **sondas fluorescentes** específicas que se utilizan en la clínica para los **procedimientos de cribado** para el cáncer de cuello uterino o para la detección de células infectadas con VIH. La técnica FISH también se utiliza en **pruebas de diagnóstico prenatal** para visualizar cromosomas en células fetales obtenidas mediante amniocentesis o muestreo de vellosidades coriónicas a fin de detectar anomalías cromosómicas. Además, esta técnica también se puede utilizar para evaluar los cromosomas de los linfocitos de los astronautas y estimar la dosis de radiación absorbida durante su estadía en el espacio. La frecuencia de translocaciones cromosómicas en los linfocitos es proporcional a la dosis de radiación absorbida.

Autorradiografía

La autorradiografía utiliza una emulsión fotográfica que se coloca sobre un corte histológico para localizar material radioactivo en los tejidos.

Numerosos precursores moleculares pequeños de moléculas más grandes, como los aminoácidos que integran las proteínas o los nucleótidos que forman los ácidos nucleicos, pueden marcarse mediante la incorporación de uno o varios átomos radioactivos en su estructura molecular. A continuación, se detecta la radioactividad para localizar las moléculas más grandes en células y tejidos. Es posible inyectar moléculas precursoras marcadas en animales o introducirlas en células o cultivos de órganos. Por ejemplo, se pueden introducir **precursores radioactivos** del **ADN** (**^{3}H-timidina**) o el **ARN** (**^{3}H-uridina**) en células vivas para estudiar la síntesis de ADN y la posterior división celular, o la síntesis de ARNm para encontrar la síntesis de proteínas en la célula. Otros precursores radioactivos pueden mostrar la secreción celular de proteínas y localizar productos sintéticos dentro de las células y en la matriz extracelular.

Los cortes de las muestras que han incorporado material radioactivo se montan en un portaobjetos. En condiciones de oscuridad, este se sumerge en una emulsión fotográfica líquida, produciendo de este modo una película fotográfica delgada sobre su superficie. Después de la exposición adecuada en una cámara oscura, por lo general durante días o semanas, la emulsión expuesta se revela con las técnicas fotográficas habituales y el portaobjetos con la muestra se monta de forma permanente con un cubreobjetos. Los preparados se pueden teñir antes o después de la exposición y el revelado. Con este procedimiento, se exponen y se revelan los gránulos de plata en la emulsión sobre las moléculas marcadas radioactivamente y aparecen como puntos oscuros que recubren el sitio de la emisión radioactiva cuando la muestra se examina con el microscopio óptico (fig. 1-8a).

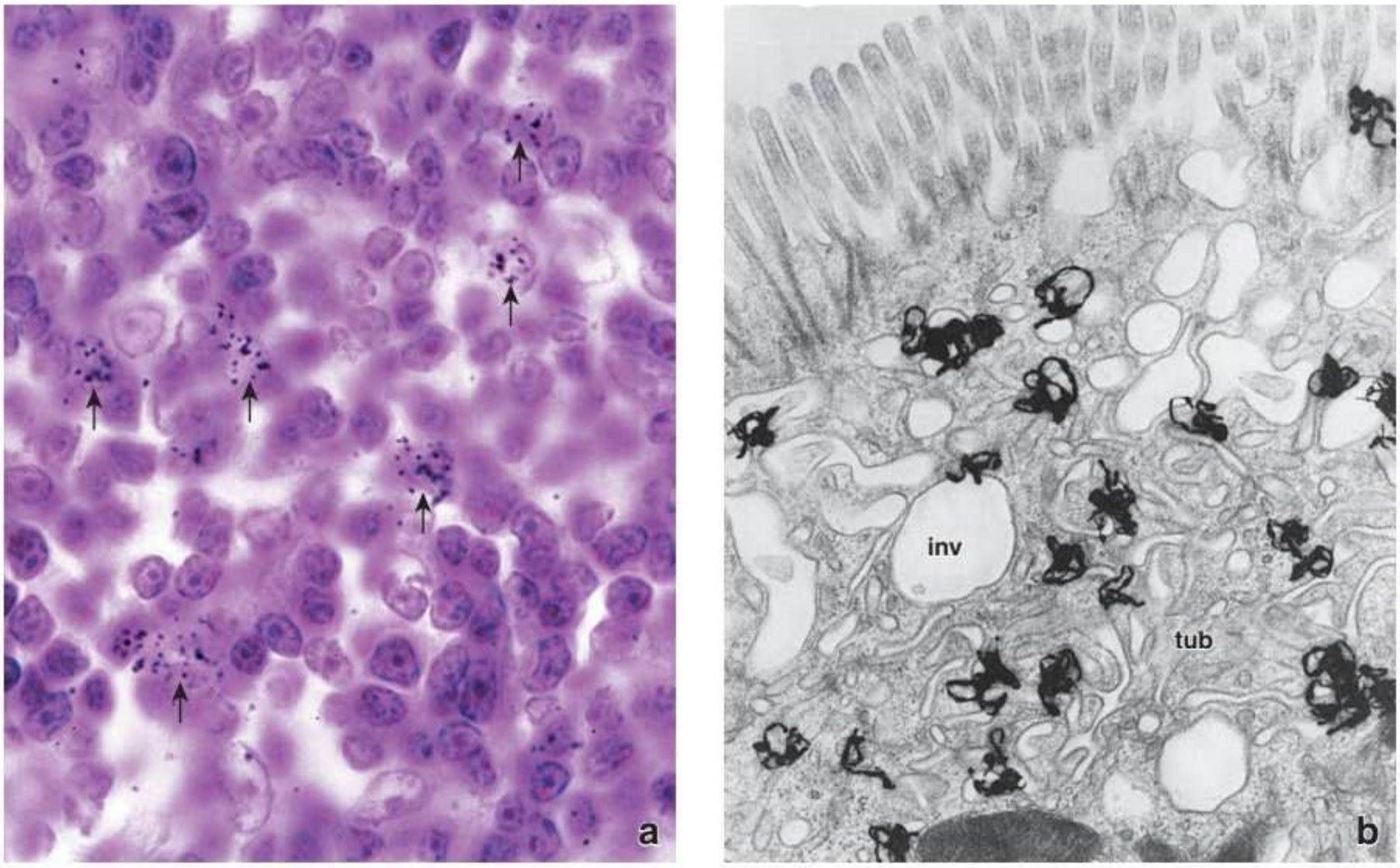


FIGURA 1-8. Ejemplos de autorradiografía utilizados en microscopía óptica y electrónica. a. Microfotografía de un corte de ganglios linfáticos de un animal inyectado con [^{3}H]-timidina. Algunas de las células muestran agregados de gránulos de plata metálicos, que aparecen como pequeñas partículas negras (*flechas*). Estas células sintetizaron el ADN en preparación para la división celular y han incorporado la [^{3}H]-timidina en el ADN recién formado. Con el tiempo, las partículas radioactivas de baja energía emitidas por la [^{3}H]-timidina golpean cristales de haluro de plata en una emulsión fotográfica que cubre la muestra (exposición) y crean una imagen latente (muy parecida a una película fotográfica en una cámara). Durante el revelado fotográfico de la placa con su emulsión de recubrimiento, la imagen latente (en realidad, el haluro de plata activado en la emulsión) se reduce a plata metálica, que luego aparece como granos negros en el microscopio. 1200× (muestra original cortesía del Dr. Ernst Kallenbach). **b.** Autorradiografía microscópica electrónica de la región apical de una célula de absorción intestinal. En esta muestra se inyectó yodo-125 (^{125}I) unido al factor de crecimiento nervioso (NGF, *nerve growth factor*) en un animal, y el tejido se extrajo 1 h más tarde. La muestra se preparó de manera similar a la de la microscopía óptica. El tamaño relativamente pequeño de los gránulos de plata ayuda a la localización precisa de los complejos ^{125}I-NGF. Debe tenerse en cuenta que los gránulos de plata se concentran sobre las invaginaciones apicales (*inv*) y los endosomas tempranos de forma tubular (*tub*). 32 000× (microfotografía electrónica cortesía de la Dra. Marian R. Neutra).

booksmedicos.org

Estos gránulos pueden emplearse simplemente para indicar la ubicación de una sustancia o pueden contarse para proporcionar información semicuantitativa sobre la cantidad de determinada sustancia en un sitio específico. Por ejemplo, después de inyectar timidina tritiada a un animal, las células que han absorbido este nucleótido en su ADN antes de dividirse tendrán aproximadamente el doble de gránulos de plata sobre sus núcleos que las células que se han dividido después de la incorporación del nucleótido marcado.

La autorradiografía también puede realizarse sobre cortes finos de material incluido en plástico para su observación con el ME. En esencia, se emplean los mismos procedimientos; sin embargo, como ocurre con todas las técnicas de preparación de MET, los procesos son mucho más delicados y difíciles; no obstante, también tienen una resolución mucho mayor y una detección más precisa (fig. 1-8b).

Microscopía de expansión

La microscopía de expansión es un método para mejorar la resolución de la microscopía óptica mediante la implementación de una preparación específica que expande físicamente la muestra.

La **microscopía de expansión** (**MEx**) es un proceso en el que las muestras se infiltran con **polímeros expansibles** (hidrogeles: materiales muy absorbentes que se encuentran frecuentemente en los pañales para bebés), los cuales forman redes de polímeros hidrófilos que pueden absorber grandes cantidades de agua y aumentar sus volúmenes. La estructura y la integridad física de estas redes se deben a la presencia de enlaces cruzados fuertes y estables que permiten al hidrogel resistir las fuerzas de expansión generadas por la adición de agua, estabilizando así el gel. Como resultado de la **expansión isotrópica** de la muestra, las moléculas dentro de las células, la membrana plasmática y la matriz extracelular están separadas entre sí por igual en todas las direcciones. La preparación de la muestra para MEx implica los siguientes pasos (fig. 1-9):

- **Fijación.** El proceso de fijación para la MEx es el mismo que para los protocolos de inmunotinción con microscopía óptica.
- **Anclaje.** La estructura celular de interés se marca con una sonda molecular (p. ej., anticuerpos conjugados con tinción de fluoresceína, proteínas fluorescentes y otros) y se incuba con un reactivo de anclaje que expresa sitios de unión específicos para sondas moleculares y con monómeros de gel. Además, algunas moléculas (p. ej., proteínas o ARN) también se pueden anclar directamente al gel.
- **Gelificación (conversión de un sol en gel).** La muestra se infiltra con monómeros de gel (acrilato de sodio) que se polimerizan dentro de las células y los tejidos. Los polímeros resultantes (poliacrilato de sodio) forman una matriz tridimensional densa que está firmemente anclada a las moléculas celulares a través de los sitios de unión en el reactivo de anclaje.
- **Homogeneización mecánica.** La muestra incluida en polímero es sometida a una homogeneización mecánica. Este proceso, que rompe las células, implica la desnaturalización o digestión de moléculas estructurales por proteasas específicas.
- **Expansión.** Se agrega un solvente a la muestra (agua en el caso de los polímeros de poliacrilato de sodio), lo que ocasiona la expansión de la muestra en las tres dimensiones (más de 100 veces en volumen).

Después de esta preparación, la muestra expandida está lista para ser examinada usando microscopía de fluorescencia estándar.

La microscopía de expansión, que utiliza productos químicos de bajo costo y microscopios ópticos estándar, proporciona imágenes de superresolución al aumentar el tamaño de la muestra observada.

La principal ventaja de la MEx radica en su capacidad para separar moléculas que inicialmente no eran detectables como estructuras independientes debido a la resolución innata del microscopio óptico y las limitaciones de la difracción. En las muestras expandidas, estas moléculas se separan lo suficiente como para observarse con facilidad sin cambiar los límites de la resolución del instrumento óptico. Se puede lograr una expansión lineal de 4.5 veces, lo que se correlaciona con un aumento en la resolución en el rango de 60-70 nm. Es interesante que, después de una expansión inicial, la muestra puede someterse a expansiones repetidas con una segunda red de polímero expansible. Este proceso, llamado ***microscopía de expansión iterativa*** (**MExI**), puede emplearse para expandir muestras biológicas hasta 20 veces y obtener imágenes de células y tejidos con una resolución de aproximadamente 25 nm cuando se observan con microscopía de fluorescencia convencional (fig. 1-10).

Recientemente, se han aplicado los protocolos de la MEx a preparaciones de H&E de muestras patológicas para convertir los portaobjetos de vidrio en preparaciones compatibles con la MEx. Este método, conocido como ***patología de expansión*** (**PatEx**), permite el análisis y el diagnóstico con microscopio óptico de enfermedades que previamente requerían microscopía electrónica.

■ MICROSCOPÍA

Microscopía óptica

Un *microscopio*, ya sea simple (una sola lente) o compuesto (lentes múltiples), es un instrumento que amplifica una imagen y permite ver más detalles de lo que es posible a simple vista. El microscopio más simple es una lupa o un par de gafas o anteojos para leer.

El **poder de resolución del ojo humano**, es decir, la distancia a la que deben estar dos objetos para que se vean separados (**0.2 mm**), está determinado por el espacio que hay entre células fotorreceptoras contiguas de la retina. La función de un microscopio es ampliar una imagen a un nivel en el que la retina pueda resolver la información que, de otro modo, estaría por debajo de su límite de resolución. La tabla 1-3 compara la resolución del ojo con la de diversos microscopios.

El poder de resolución es la capacidad de una lente de microscopio o sistema óptico para obtener imágenes separadas de objetos que están muy cerca unos de otros.

La **resolución** depende no solo del sistema óptico, sino también de la longitud de onda de luz y de otros factores, como el espesor de la muestra, la calidad de la fijación y la intensidad de la tinción. Con una luz con longitud de onda de 540 nm (*véase* tabla 1-1), una luz proveniente de un filtro verde a la cual el ojo es muy sensible, y con lentes objetivo y condensador apropiados, la **máxima resolución posible con un microscopio de campo claro** sería de alrededor de **0.2 µm** (*véase* cuadro 1-4, p. 17 para una descripción del método de cálculo). Esta es la resolución teórica y, como se ha mencionado, depende de que todas las condiciones sean óptimas. *La lente ocular aumenta la imagen producida por la lente objetivo, pero no puede incrementar la resolución.*

Hoy en día, la investigación en el campo de la biología dispone de varios microscopios ópticos para el uso general y especializado. Sus diferencias radican, en gran medida, en factores como

booksmedicos.org

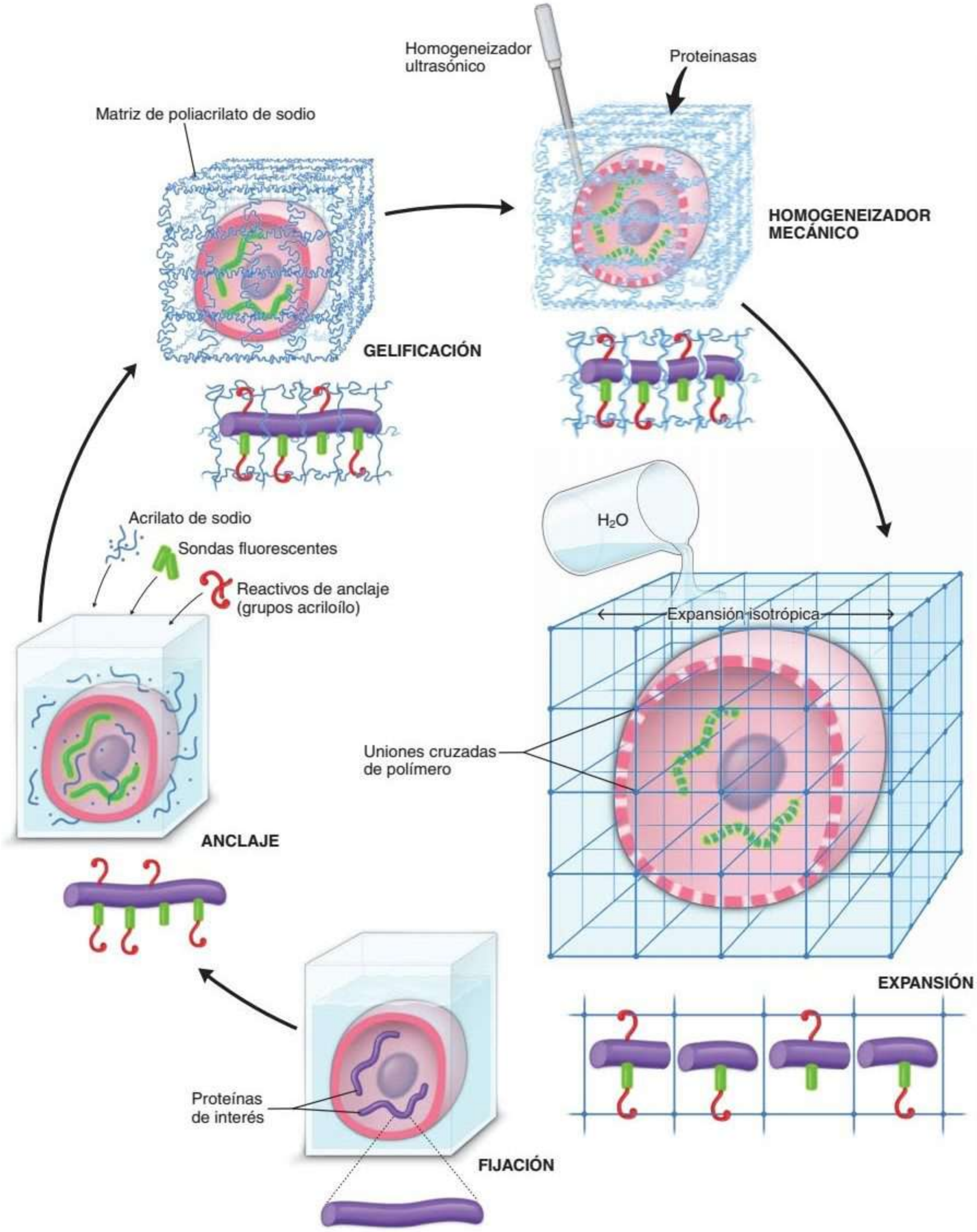


FIGURA 1-9. Pasos en el procesamiento de tejidos para la microscopía de expansión. En este diagrama se muestran los pasos consecutivos de la preparación de una muestra para la microscopía de expansión. Después de la fijación convencional (en formaldehído), la muestra se trata con reactivos de anclaje que se unen a proteínas u otras moléculas de interés y sondas moleculares conjugadas con marcadores fluorescentes. La adición de monómeros de acrilato de sodio desencadena el desarrollo de una matriz de polímero de hidrogel tridimensional densa. Después de la homogeneización mecánica que permite que las células se rompan, la muestra, ahora incluida en una matriz de hidrogel, está lista para la expansión física mediante la adición de agua. Las proteínas de interés permanecen conectadas a la red de polímeros expandidos, que las separa. La integridad del gel expandido se mantiene mediante enlaces cruzados fuertes y estables que resisten las fuerzas de expansión generadas por la adición del agua. Después de la expansión (unas 4.5 veces), la muestra está lista para ser observada con el microscopio de fluorescencia.

booksmedicos.org

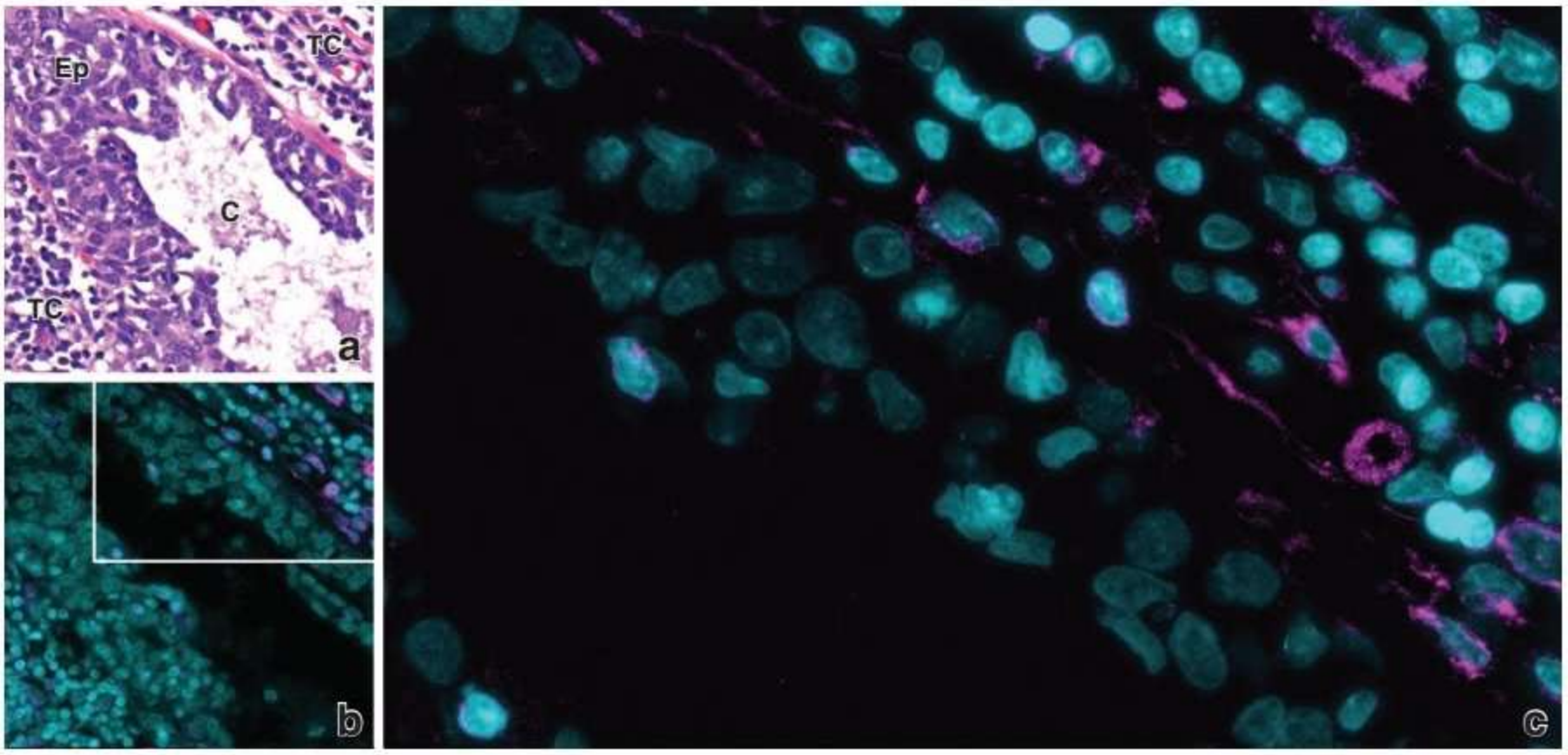


FIGURA 1-10. Comparación de microfotografías de glándula mamaria a partir de microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y microscopía de expansión. Todas las imágenes se obtuvieron de secciones seriadas del mismo tejido y se procesaron de acuerdo con técnicas de microscopía específicas. Todas se obtuvieron con las mismas lentes objetivo de 40×. **a.** En esta microfotografía de una sección de rutina con H&E se muestra el conducto mamario (*C*) y el tejido conjuntivo circundante (*TC*). Hay un aumento notable de las capas celulares dentro del epitelio ductal (*Ep*), que es indicativo de hiperplasia ductal habitual (HDH). Los núcleos se tiñen de *azul* con hematoxilina, y la *línea rosa* alargada debajo del epitelio representa las fibras de tejido conjuntivo teñidas con eosina. Los núcleos pequeños y más intensamente teñidos dentro del *TC* pertenecen a linfocitos infiltrantes. 460×. **b.** Esta imagen inmunofluorescente se obtuvo de la sección teñida para filamentos intermedios de vimentina. Las proteínas vimentinas teñidas en *magenta* se marcaron con anticuerpos policlonales primarios de pollo antivimentina y se visualizaron mediante anticuerpos secundarios conjugados de cabra antipollo con colorante fluorescente (Alexa Fluor 488). El ADN se ha contrateñido con un colorante *azul* inespecífico (tinción DAPI) para hacer visible el núcleo. 1 250×. Con este aumento, muchos núcleos son difíciles de discernir porque la resolución está en el límite. 460×. **c.** La sección adyacente del mismo tejido que se muestra en la imagen **b** se procesó para microscopía de expansión. La muestra se incluyó en el polímero de poliacrilato y se expandió 4.25 veces. La imagen muestra parte de la sección incluida dentro del *rectángulo* en la imagen **b** que se fotografió con la misma ampliación de 460×. Debido a la expansión del tejido, la resolución de esta imagen mejora notablemente en comparación con la de inmunofluorescencia de rutina tomada con el mismo aumento (microfotografía cortesía de los Dres. Yongxin Zhao y Edward S. Boyden, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA).

la longitud de onda con la que se ilumina la muestra, la alteración física de la luz que entra o sale de la muestra y los procesos analíticos específicos que pueden aplicarse a la imagen final. En esta sección se describen brevemente 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 de uso muy difundido en el siglo XIX, e inició la primera gran era de la investigación histológica. Básicamente, los componentes del microscopio de campo claro (fig. 1-11) son los siguientes:

- Una **fuente de luz** para la iluminación de la muestra (p. ej., una lámpara en la base del microscopio).
- Una **lente condensadora** para enfocar el haz de luz a la altura de la muestra.
- Una **platina** sobre la que se coloca el portaobjetos.
- Una **lente objetivo** para recoger la luz que ha atravesado la muestra.
- Una **lente ocular** (o un par de lentes oculares en los microscopios binoculares, de uso más frecuente) a través de la cual se puede examinar directamente la imagen formada por la lente objetivo.

Para que una muestra pueda examinarse con el microscopio de campo claro, debe ser lo suficientemente fina para que la luz pase a través de ella. Si bien algo de luz es absorbida al atravesar la muestra, el sistema óptico del microscopio de campo claro no produce un grado útil de contraste en la muestra no teñida. Por esta razón, se utilizan los diversos métodos de tinción que se analizaron antes.

TABLA 1-3 Resolución ojo *vs.* instrumento

Distancia entre puntos de resolución	
Ojo humano	0.2 mm
Microscopio de campo claro	0.2 µm
Microscopio óptico de superresolución	10-100 nm
MEB	2.5 nm
MET	
Teórica	0.05 nm
Sección de tejido	1 nm
Microscopía de fuerza atómica	50 pm

MEB, microscopio electrónico de barrido; *MET*, microscopio electrónico de transmisión.

Estudio de un preparado histológico en el microscopio óptico

Los órganos son tridimensionales, mientras que los cortes histológicos solo tienen dos dimensiones.

Como se mencionó en la sección anterior *Preparación del tejido*, toda muestra de tejido preparado para su observación por microscopía

booksmedicos.org

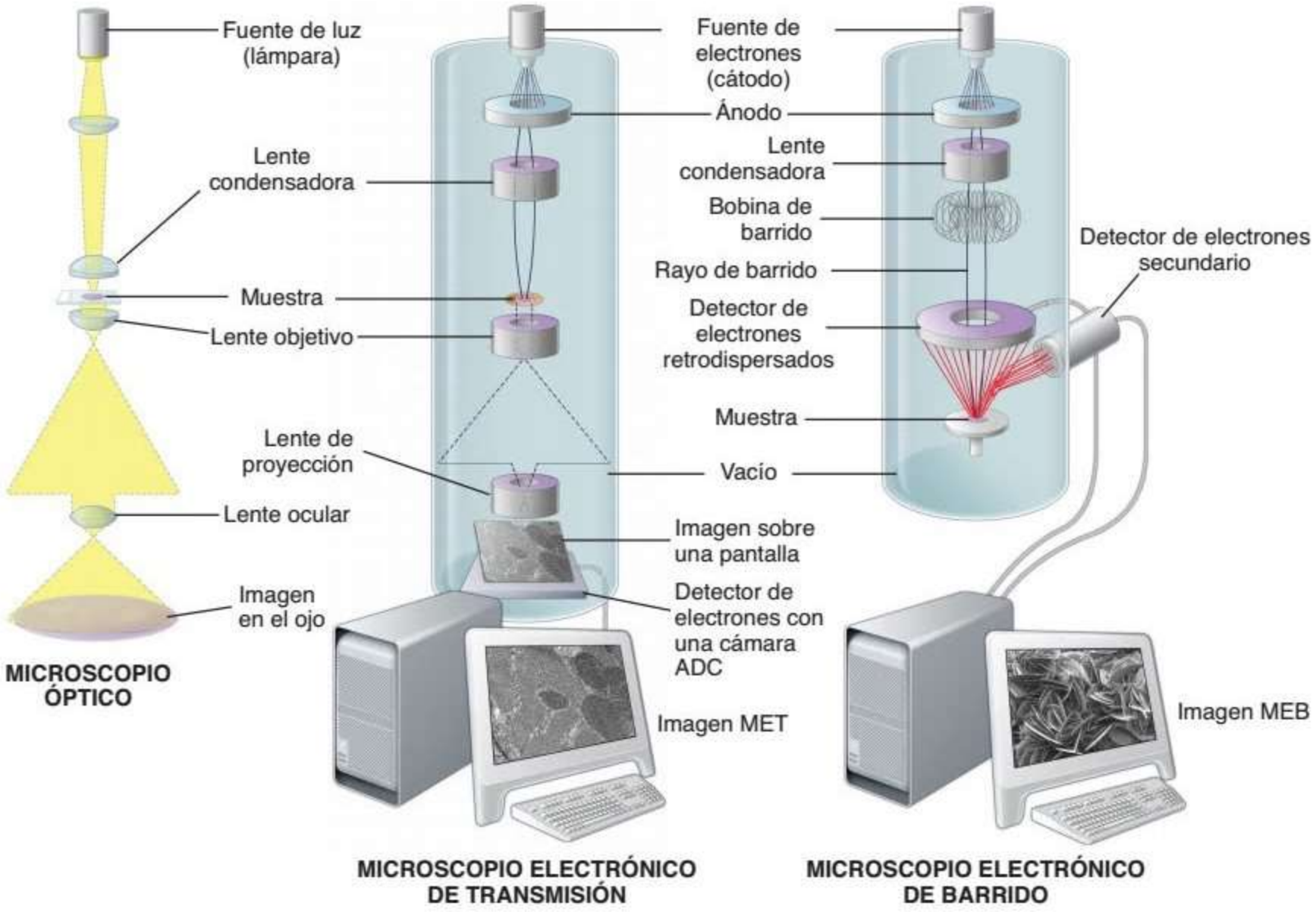


FIGURA 1-11. Diagrama que compara la formación de la imagen en diferentes tipos de microscopios. Para una mejor comparación entre los tres tipos de microscopio, se muestra el microscopio óptico (*izquierda*) como si estuviera invertido. Debe tenerse en cuenta que tanto en el microscopio electrónico de transmisión (*MET*) como en el microscopio electrónico de barrido (*MEB*) las muestras deben incluirse en un ambiente de alto vacío (de 10^{-4} a 10^{-7} Pa).

óptica debe cortarse en secciones muy finas. Por lo tanto, de una muestra tridimensional de tejido se obtienen cortes bidimensionales. Uno de los mayores desafíos para los estudiantes de histología es tratar de reconstruir mentalmente la tercera dimensión "faltante".

Por ejemplo, en la figura 1-12 se ilustran cortes en diferentes planos a través de una naranja. Debe considerarse que cada superficie de corte (indicada por la *línea punteada*) de la naranja entera exhibe diversos tamaños y patrones de superficie según la orientación del corte. Así, al examinar un corte determinado de la naranja, es importante ser capaz de reconstruir mentalmente la organización de la estructura y de sus componentes. Un ejemplo de una estructura histológica, en este caso un corpúsculo renal, se muestra como aparecería en diferentes planos de corte (*véase* fig. 1-12). Obsérvese la marcada diferencia de tamaño, orientación y organización alrededor del tejido en cada corte del corpúsculo renal. Mediante el estudio de una serie de estos cortes bidimensionales, es posible imaginar la configuración tridimensional de la estructura examinada.

En todas las etapas de la preparación del tejido pueden generarse artificios en los preparados histológicos.

La realización de un preparado histológico requiere de una serie de pasos que comienzan con la obtención de la muestra y terminan con la colocación del cubreobjetos. En cada paso puede introducirse un **artificio** (un error en el proceso de preparación). En general, los artificios que aparecen en el preparado terminado están vinculados con la metodología, el equipo o los reactivos utilizados durante la preparación. Una baja pureza de las sustancias químicas y de los reactivos utilizados en el proceso (fijadores, reactivos y tinciones), las imperfecciones en la ejecución de la técnica (intervalos de fijación demasiado cortos o demasiado largos, deshidratación, inclusión, coloración o descuidos en el montaje y la colocación del cubreobjetos) o un equipo inadecuado (p. ej., un microtomo con una hoja defectuosa) pueden producir artificios 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 artificios más habituales.

Otros sistemas ópticos

Además del microscopio de campo claro de uso habitual en el estudio de rutina de los preparados histológicos, en los laboratorios clínicos y de investigación se aplican otros sistemas ópticos (que se describen a continuación). Algunos se utilizan para aumentar el contraste sin teñir (como el microscopio de contraste de fase), mientras que otros están diseñados para visualizar estructuras mediante el empleo de técnicas específicas, como la inmunofluorescencia (microscopios de fluorescencia y confocales; *véase* fig. 1-11).

El microscopio de contraste de fase permite observar células y tejidos no teñidos; además, es especialmente útil 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 relativamente alto (las zonas más densas) se refracta y

booksmedicos.org

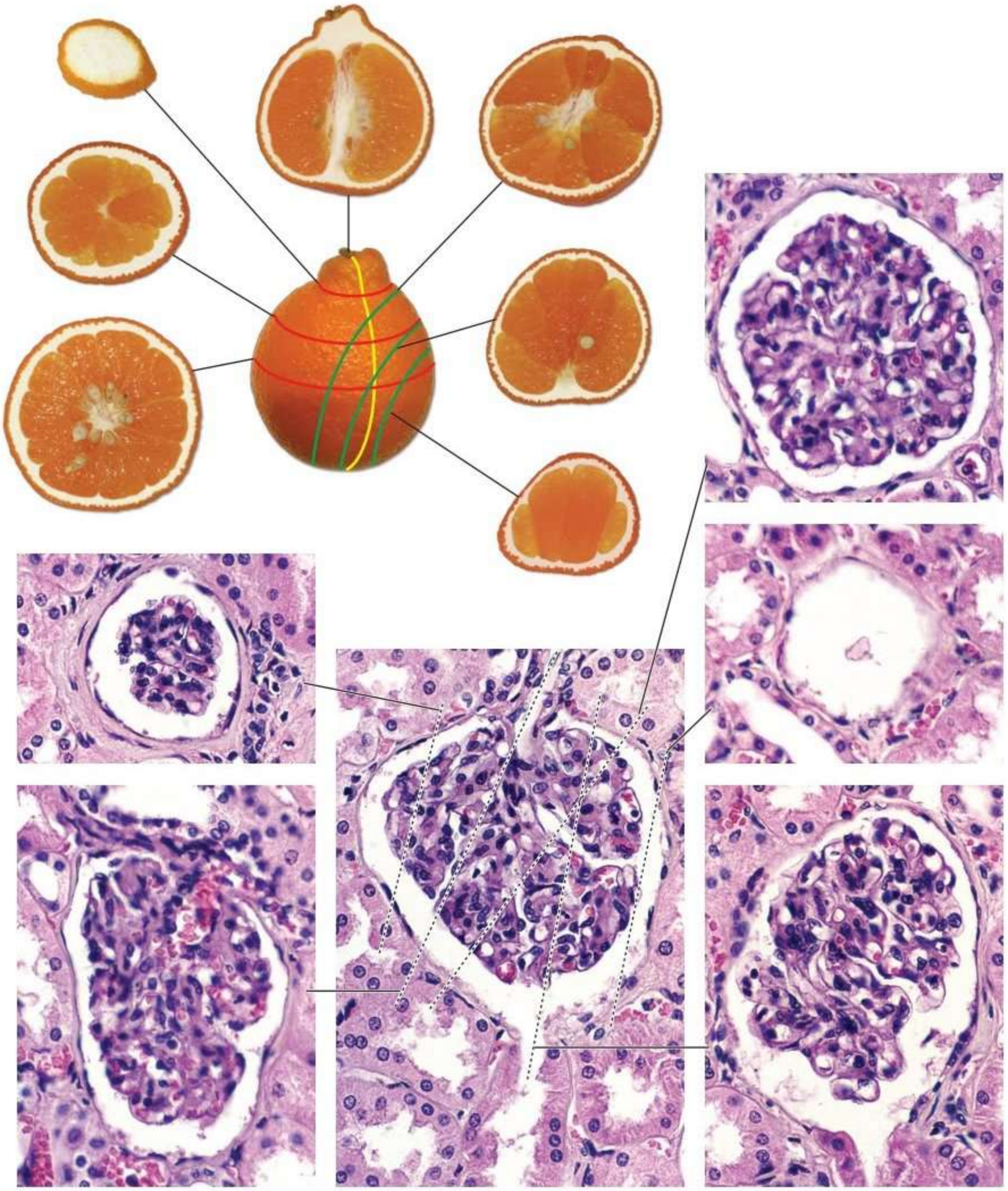


FIGURA 1-12. Ejemplos de cortes de una naranja y un corpúsculo renal. Las *líneas punteadas* dibujadas sobre la naranja entera indican el plano de corte que se correlaciona con cada superficie seccionada. Del mismo modo, los diferentes cortes a través de un corpúsculo renal, que también es una estructura esférica, exhiben diferencias en su aspecto. El tamaño y el aspecto de la estructura interna son un reflejo del plano de corte.

queda fuera de fase con respecto al haz de luz que ha pasado por la muestra. El microscopio de contraste de fase capta las longitudes de onda que están fuera de fase y las dirige a través de una serie de anillos ópticos en las lentes condensador y objetivo, con lo que en esencia se elimina la amplitud de la porción del haz refractado inicialmente y se produce un contraste en la imagen. Las partes oscuras de la imagen corresponden a las regiones densas de la muestra; las claras, a regiones menos densas. El microscopio de contraste de fase se utiliza para examinar células y tejidos vivos (como las células de un cultivo) y también se emplea con frecuencia para examinar cortes semifinos no teñidos (de alrededor de 0.5 µm) de material incluido en plástico.

booksmedicos.org

CUADRO 1-4

CONSIDERACIONES FUNCIONALES: USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Esta breve introducción al uso adecuado del microscopio óptico está dirigida a aquellos estudiantes que utilizarán esta herramienta para el análisis de rutina de los tejidos. Si los siguientes comentarios parecen elementales, es solo porque la mayoría de los usuarios del microscopio no pueden aprovechar todas sus ventajas. A pesar del excelente equipamiento actual, es relativamente escasa la instrucción formal sobre el uso correcto del microscopio óptico.

Los sistemas ópticos costosos y muy corregidos solo pueden funcionar de forma óptima cuando los trayectos de los haces de iluminación y de observación están centrados y apropiadamente ajustados. Trabajar con los ajustes y alineamientos adecuados contribuirá sustancialmente a reconocer detalles diminutos en la muestra y a presentar de forma fidedigna los colores para la visión directa o mediante la microfotografía.

La **iluminación Köhler** es una de las claves de la microscopía de calidad y está incorporada en el diseño de prácticamente todos los microscopios modernos que se utilizan en los laboratorios o en la investigación. La figura C1-4-1 muestra el típico trayecto de la luz y los controles para ajuste de un microscopio moderno; es necesario seguir las instrucciones que se brindan a continuación para obtener una iluminación adecuada en el microscopio.

Los **pasos de ajuste** necesarios para conseguir una buena iluminación Köhler son pocos y sencillos:

- Enfocar la muestra.
- Cerrar el diafragma de campo.
- Enfocar el condensador moviéndolo hacia arriba o hacia abajo hasta que el contorno de su diafragma de campo aparezca nítido y enfocado.
- Centrar el diafragma de campo con los controles correspondientes en la subplatina (donde está el condensador). Después, se abre el diafragma de campo hasta que el haz luminoso cubra todo el campo observado.
- Retirar el ocular (o se utiliza un telescopio de centrado o un accesorio telescópico de fase si se dispone de ellos) y observar la pupila de salida del objetivo. Así se podrá ver un campo circular iluminado cuyo radio es directamente proporcional a la apertura numérica del objetivo. A medida que se cierra el diafragma del condensador, su contorno aparecerá dentro de este campo circular. En la mayoría de los preparados teñidos, el diafragma del condensador debe cerrarse hasta cubrir aproximadamente dos terceras partes de la apertura del objetivo. El resultado de este ajuste es el mejor equilibrio entre la resolución y el contraste (que no es más que la diferencia de intensidades entre las regiones claras y oscuras de la muestra).

Si se ponen en práctica estos cinco consejos simples, la imagen obtenida será la mejor que permita el sistema óptico del microscopio. Ahora se verá por qué.

Primero, ¿por qué ajustamos el diafragma de campo para cubrir solo el campo observado? Iluminar el campo más grande que el sistema óptico puede "ver" solamente conduce a reflexiones internas o a una pérdida de luz, lo cual trae como consecuencia 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, en 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.

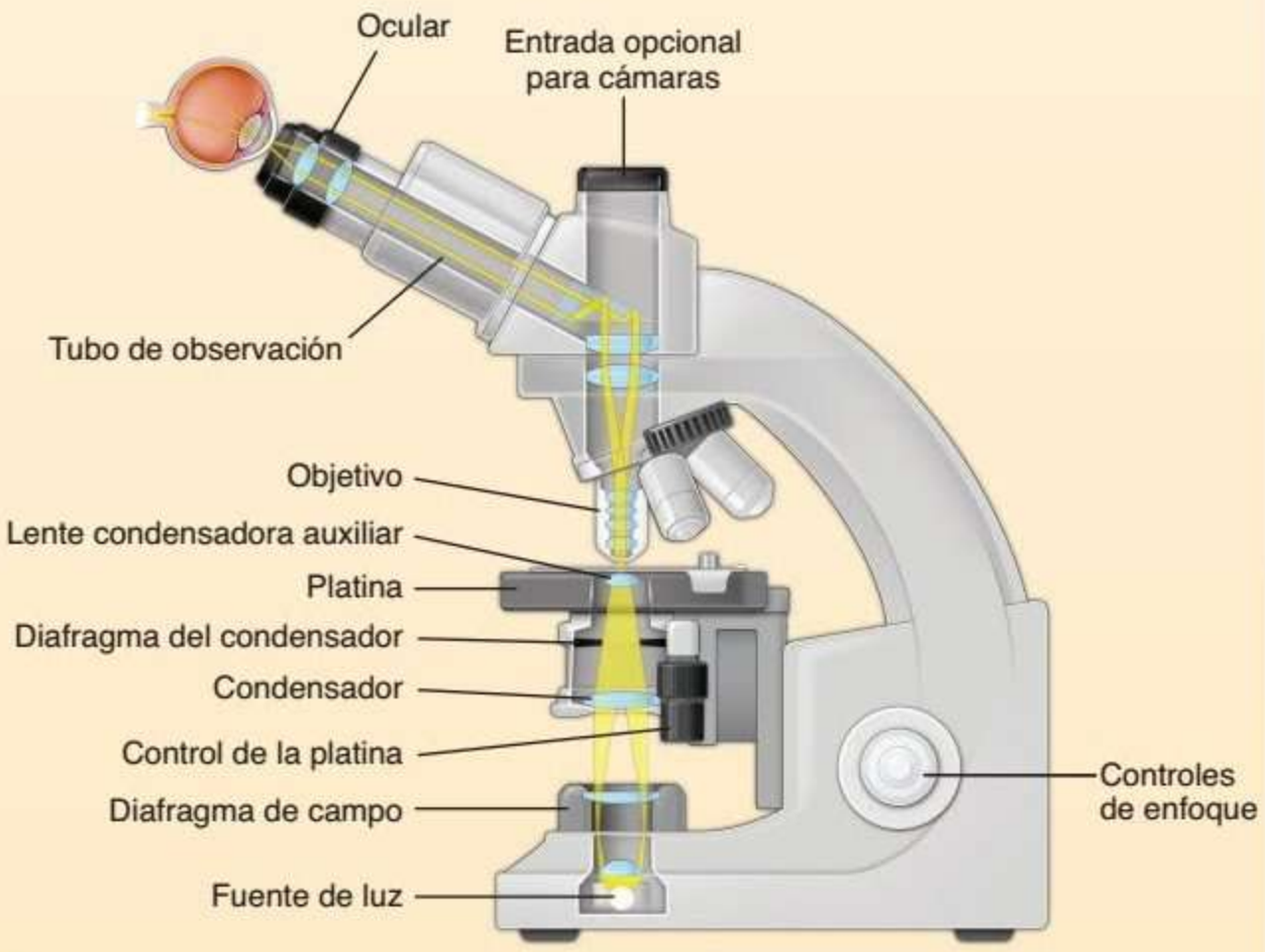


FIGURA C1-4-1. Diagrama de un microscopio óptico típico. En esta ilustración se muestra un corte transversal de un microscopio, sus componentes operativos y la trayectoria de la luz.

(continúa en la p. 18)

booksmedicos.org

CUADRO 1-4

CONSIDERACIONES FUNCIONALES: USO CORRECTO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO (*CONTINUACIÓN*)

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

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

Donde:

d = distancia entre los puntos del detalle resuelto (en nm).
λ = longitud de onda de la luz utilizada (verde = 540 nm).
AN = apertura numérica o seno del semiángulo captado por el objetivo o el condensador de un punto central de la muestra multiplicado por el índice de refracción del medio comprendido entre el objetivo o el condensador y la muestra.

¿Cómo influyen directamente la longitud de onda y la apertura numérica en la resolución? Las estructuras de la muestra difractan la luz. El ángulo de difracción es directamente proporcional a la longitud de onda e inversamente proporcional al espaciado de las estructuras. Según el físico Ernst Abbé, un espacio estructural dado puede resolverse solamente cuando el sistema óptico de observación (objetivo) puede ver parte de la luz difractada producida por el espaciado. Cuanto mayor es la apertura del objetivo, más difractada está la luz que participa en la formación de la imagen, lo que proporciona una mejor resolución de los detalles más pequeños e imágenes más nítidas.

Sin embargo, nuestra sencilla fórmula muestra que la apertura del condensador es tan importante como la apertura del objetivo. Este punto solo es lógico cuando se considera el ángulo de difracción para un haz oblicuo o uno de mayor apertura. Este ángulo permanece esencialmente constante, pero se presenta al objetivo de tal manera que se puede corregir con facilidad.

¿Cómo afecta al contraste el ajuste de la apertura? En teoría, la mejor transferencia de contraste del objeto a la imagen se obtendría gracias a la interacción (interferencia) entre los frentes de onda difractados y no difractados.

Para lograr una transferencia de contraste entre la transmisión total y la absorción completa en una muestra, la relación de intensidad entre la luz difractada y no difractada tendría que ser 1:1 para obtener una interferencia destructiva total (negro) o una interferencia constructiva total (brillo). Cuando la apertura del condensador coincide con la apertura del objetivo, la luz no difractada ingresa en el objetivo con la máxima intensidad, pero solo puede ingresar una parte de la luz difractada, lo que produce un contraste menor. En otras palabras, cerrar la apertura del condensador en dos tercios de la apertura del objetivo hace que la relación de intensidad entre la luz difractada y no difractada se acerque a 1:1 y, por lo tanto, optimiza el contraste. Cerrar la apertura del condensador (o bajar el condensador) más allá de este equilibrio producirá fenómenos de interferencia o artificios de la imagen, como anillos de difracción o líneas artificiales alrededor de las estructuras de la muestra. La mayoría de las técnicas de microscopía utilizadas para mejorar el contraste (p. ej., campo oscuro, iluminación oblicua, contraste de fase o contraste de modulación) se basan en el mismo principio (suprimen o reducen la intensidad de la luz no difractada para mejorar un contraste inherentemente bajo de la muestra).

Si se siguen los pasos descritos y se mantienen las lentes limpias, la calidad y la fidelidad de las imágenes visuales variarán solo en función de la capacidad de rendimiento del sistema óptico.

Dos modificaciones del microscopio de contraste de fase son el **microscopio de interferencia**, que también permite la cuantificación de la masa tisular, y el **microscopio de interferencia diferencial** (usando la óptica de Nomarski), que es especialmente útil para valorar las propiedades de la superficie de las células y otras muestras biológicas.

En la microscopía de campo oscuro, la lente objetivo no capta la luz directa proveniente de la fuente de iluminación.

En la **microscopía de campo oscuro**, solo la luz refractada por las estructuras de la muestra penetra en el objetivo. El microscopio de campo oscuro está equipado con un condensador especial que ilumina el preparado con mucha intensidad y de forma oblicua. Así, el campo de visión aparece como un fondo oscuro en el que las pequeñas partículas en la muestra que reflejan parte de la luz en el objetivo aparecen brillantes.

El efecto es similar al que producen las partículas de polvo en el haz luminoso de un proyector de diapositivas en una habitación oscura. La luz reflejada por las partículas de polvo llega a la retina del ojo y eso las hace visibles.

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

El microscopio de campo oscuro es útil en el estudio de autorradiografías, en las que los gránulos de plata revelados aparecen blancos en un fondo oscuro. En la clínica, la **microscopía de campo oscuro** se emplea para la detección de cristales en la orina, como los de ácido úrico y oxalato, así como para la identificación de bacterias específicas, como las **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 para fluorescer bajo la luz ultravioleta.

Una molécula que fluoresce emite luz de longitudes de onda dentro del espectro visible cuando se expone a una fuente ultravioleta (UV). El **microscopio de fluorescencia** se utiliza para la detección de moléculas con fluorescencia natural (autofluorescencia), como la vitamina A y algunos neurotransmisores. Sin embargo, como no hay muchas moléculas autofluorescentes, la aplicación principal de este microscopio consiste en examinar la fluorescencia secundaria, como en la detección de antígenos o anticuerpos en los procedimientos de tinción inmunocitoquímica (*véase* fig. 1-6). También pueden inyectarse **moléculas fluorescentes** específicas (fluoróforos) en un animal

booksmedicos.org

o directamente en las células y utilizarse como marcadores. Estos métodos han sido útiles en el estudio de uniones intercelulares (de tipo nexo), en la localización del trayecto de fibras nerviosas en neurobiología y en la detección de marcadores fluorescentes del crecimiento de los tejidos mineralizados. Entre la fuente de luz UV y la muestra se insertan varios filtros para producir una luz monocromática o cuasimonocromática (de una sola longitud de onda o de longitud de onda de banda estrecha). Un segundo conjunto de filtros colocados entre la muestra y el objetivo permite que solo la estrecha banda de longitud de onda de la fluorescencia llegue al ojo o a un sensor de un dispositivo de registro o grabado digital.

El microscopio de fluorescencia de lámina de luz utiliza un plano fino de luz para seccionar ópticamente una muestra transparente marcada con moléculas fluorescentes.

El **microscopio de fluorescencia de lámina de luz (MFLL)** utiliza una lámina de luz que está formada por un haz de láser plano. Esta **fina lámina de luz** se genera en el plano focal y secciona ópticamente una muestra transparente marcada con colorantes fluorescentes. La luz fluorescente emitida desde la muestra es recogida perpendicularmente a la trayectoria de la luz por el objetivo del microscopio y se registra mediante un sensor de imágenes (p. ej., un dispositivo de carga acoplada [CCD, *charge-coupled device*]). La muestra se ilumina solo en un **plano focal** a la vez, evitando la excitación de las áreas fuera de foco de la muestra. La lámina de luz por sí sola puede formarse de manera estática o dinámica al mover un haz de láser que se parece a una hoja de luz durante un corto período. Al mover la muestra por la lámina de luz pueden registrarse imágenes en distintos planos y reconstruirse de forma tridimensional (fig. 1-13).

En la actualidad, la microscopía de fluorescencia es una de las técnicas más potentes y versátiles disponibles para los estudios de muestras biológicas.

La mayoría de los laboratorios de investigación modernos utilizan la microscopía de fluorescencia como herramienta principal en la investigación biológica. Se han diseñado moléculas fluorescentes (fluoróforos) para absorber la luz en una longitud de onda específica y para emitir luz en una longitud de onda más larga. Estas moléculas aparecen muy brillantes y son fácilmente distinguibles en las secciones de tejido de otras señales de fondo. Además, con el desarrollo de **proteínas fluorescentes (PF)** codificadas genéticamente, ha sido posible visualizar y crear imágenes de expresión, localización y actividad de proteínas en células vivas. La combinación de técnicas de microscopía de fluorescencia y confocal con un sistema informático de procesamiento de datos rápido permite a los investigadores representar las imágenes en tres dimensiones.

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

La imagen en el **microscopio ultravioleta (UV)** depende de la absorción de luz UV por las moléculas en la muestra. La fuente de luz UV tiene una longitud de onda de alrededor de 200 nm. Así, el microscopio UV puede llegar a una resolución de 0.1 µm. El principio general de la microscopía UV se asemeja al funcionamiento de un

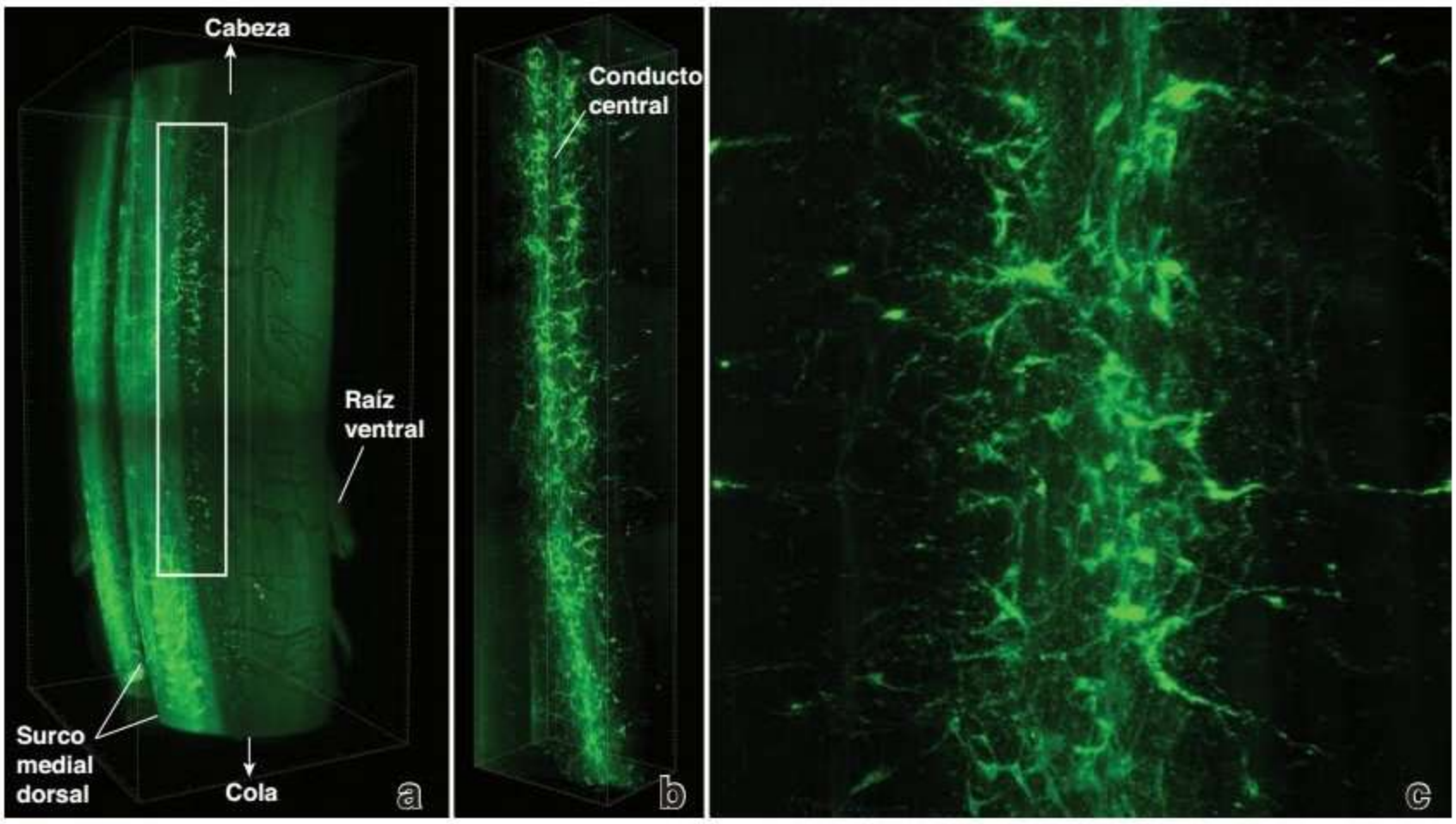


FIGURA 1-13. Imágenes con microscopía de fluorescencia de lámina de luz (MFLL) de células que expresan el neuropéptido galanina en la médula espinal de una rata macho adulta. a. En esta microfotografía se muestra una representación tridimensional (3D) de una imagen de MFLL de la médula espinal de rata en los niveles vertebrales L3 y L4. Dentro del *rectángulo* puede observarse el marcado inmunofluorescente del neuropéptido galanina expresado en las células espinotalámicas. Este neuropéptido se detectó mediante el método de inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos policlonales de conejo antigalanina y después se visualizó con anticuerpos secundarios de cabra anticonejo conjugados con fluoresceína (Alexa Fluor 647). Después de la inmunotinción, la muestra se lavó con dibencil éter (DBE) y el tejido transparente se observó en el plano horizontal utilizando MFLL bidireccional. Los conjuntos de imágenes TIFF se obtuvieron a intervalos ópticos de 4 µm y se unieron mediante un programa de imágenes especializado. La imagen reconstruida fue coloreada artificialmente en *verde*. La representación 3D permite girar y examinar la imagen desde todas las direcciones posibles. 10×. **b.** En esta imagen se representa un mayor aumento de las células espinotalámicas positivas para galanina y el fondo de la médula espinal que se muestra en el *rectángulo*. Obsérvese que las células positivas para galanina están muy cerca del conducto central. 22×. **c.** Vista de gran aumento de células espinotalámicas que expresan galanina y muestran su patrón de interconexión. 110× (cortesía de los Dres. Aleisha M. Moore, Michael N. Lehman y Lique M. Coolen).

booksmedicos.org

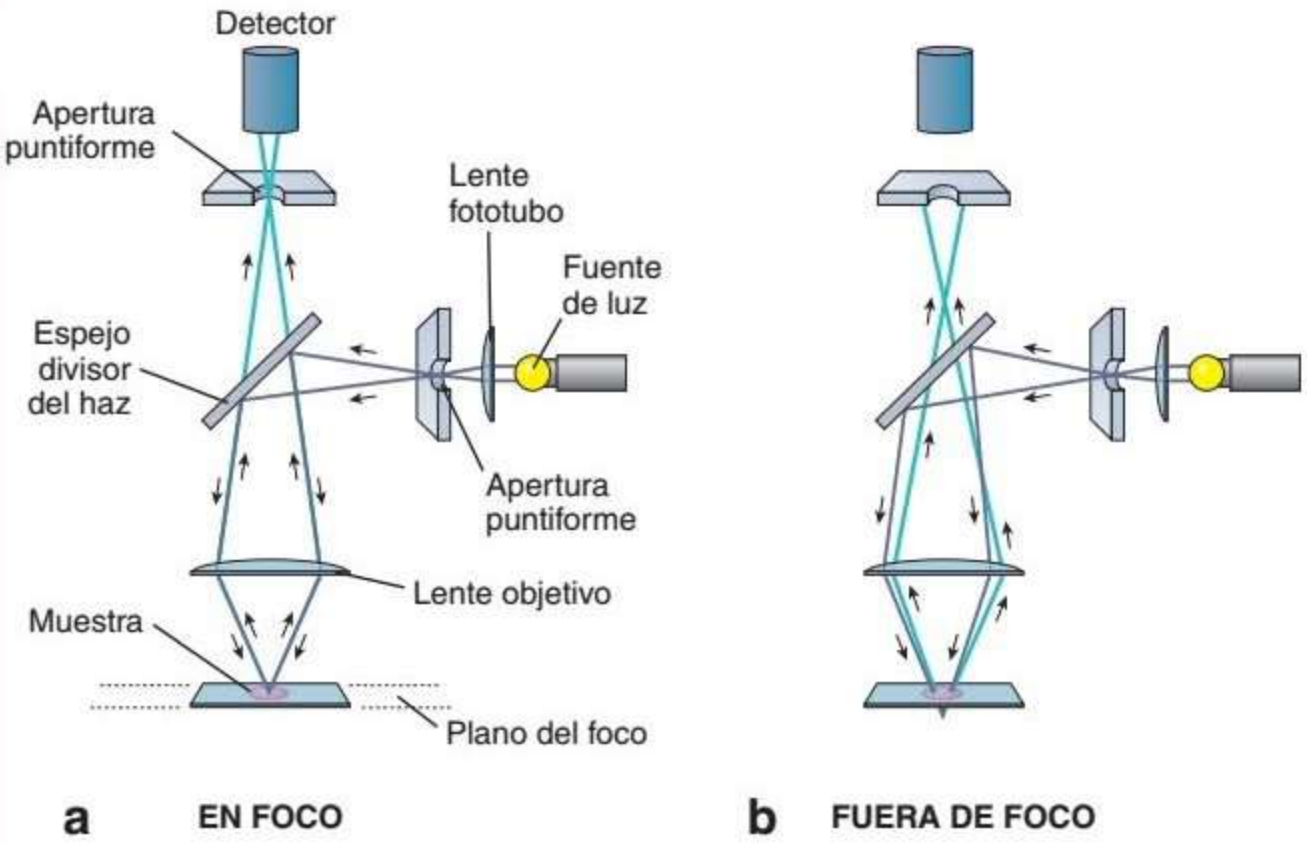


FIGURA 1-14. Diagrama de la luz emitida en foco y fuera de foco en el microscopio confocal. a. En este diagrama se muestra la trayectoria del rayo láser y la luz emitida cuando la estructura está directamente en el foco de la lente. La pantalla con un orificio puntiforme en el otro lado del sistema óptico del microscopio confocal permite que la luz de la estructura enfocada pase a través del orificio. La luz es transformada en una imagen mediante un sistema informático. Como el punto focal de la lente objetivo del microscopio forma una imagen nítida en el nivel en el que se encuentra el orificio, estos dos puntos se denominan *puntos confocales*. **b.** Este diagrama muestra la trayectoria del rayo láser y la luz emitida, que está fuera de foco en relación con el orificio. Así, la luz de la muestra bloqueada por el orificio nunca se detecta.

espectrofotómetro; los resultados se registran de forma fotográfica. La muestra no se puede inspeccionar de manera directa a través de una lente ocular, ya que la luz UV no es visible y puede lastimar el ojo.

La microscopía UV es útil para la detección de ácidos nucleicos, específicamente las bases de purina y pirimidina de los nucleótidos. También es útil para la detección de proteínas que contienen ciertos aminoácidos. Las mediciones espectrofotométricas UV de longitudes de onda específicas permiten al microscopio UV determinar de forma cuantitativa la cantidad de ADN y ARN en las células. Como se describe en el cuadro 1-2 de la página 7, la **microespectrofotometria de Feulgen** se emplea en la clínica para evaluar el grado de ploidía (múltiplos de la cantidad de ADN normal) en muestras tumorales.

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

El **microscopio confocal de barrido** permite la visualización de una muestra biológica en tres dimensiones. Las dos lentes del microscopio confocal (objetivo y fototubo) están perfectamente alineadas para enfocar la luz proveniente del punto focal de una lente hasta el punto focal de la otra. La diferencia principal entre un microscopio convencional y uno confocal es la adición de un **detector de apertura** (orificio puntiforme), que está en *con*junción con el punto *focal* de la lente; por ello es **confocal**. Este orificio de posición precisa solamente permite que pase la luz "en foco" hacia el dispositivo fotomultiplicador (detector), mientras que la luz "fuera de foco" tiene bloqueada la entrada al detector (fig. 1-14). Este sistema genera una capacidad de resolución (0.2-0.5 µm) y una claridad excepcionales para un corte fino en una muestra biológica simplemente por eliminar la luz fuera de foco.

La fuente de luz en un microscopio confocal proviene de un sistema de iluminación láser que es fuertemente convergente y, por lo tanto, produce una luz excitadora de alta intensidad en la forma de un punto de exploración superficial. Se utiliza un sistema de espejos para mover el láser a través de la muestra, de manera que se ilumina un solo punto a la vez (fig. 1-15). Se exploran numerosos 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 microscopía confocal se asemeja a la tomografía computarizada (TC).

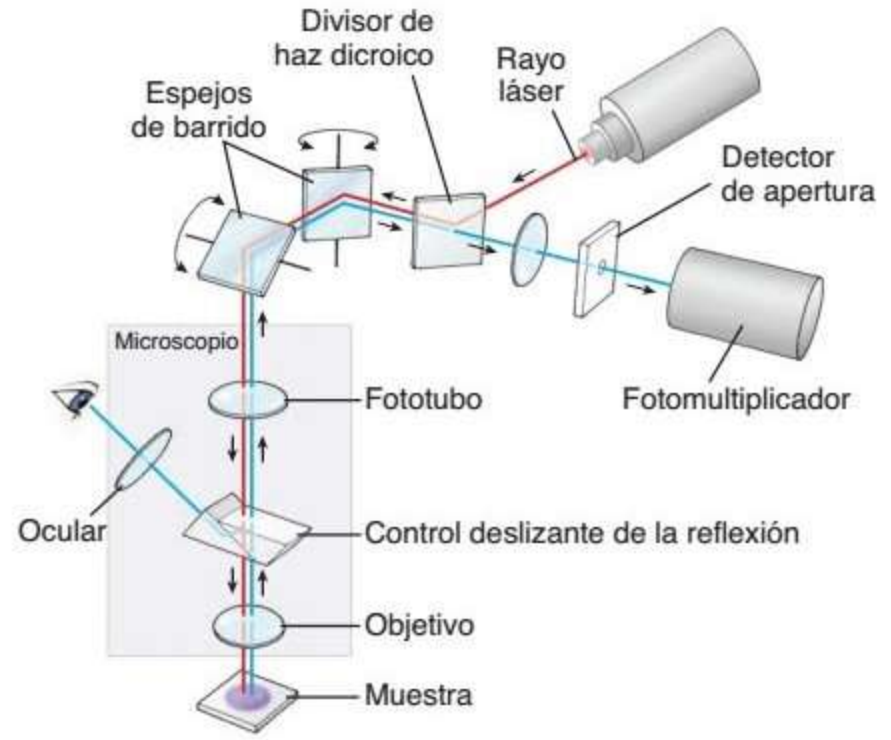


FIGURA 1-15. Estructura del microscopio confocal y diagrama de la trayectoria del haz. La fuente de luz para el microscopio confocal proviene de un láser. El rayo láser (*línea roja*) viaja a la muestra de tejido mediante un divisor de haz dicroico y luego a dos espejos de exploración móviles; estos espejos barren el rayo láser a través de la muestra en las direcciones *x* e *y*. Por último, el láser ingresa en el microscopio de fluorescencia y viaja por medio de su sistema óptico para iluminar una muestra de tejido. La luz emitida por la muestra de tejido iluminada (*línea azul*) regresa por el sistema óptico del microscopio, a través de ambos espejos de exploración, pasa a través del divisor de haz y es enfocada en el orificio. La luz que atraviesa el orificio es recibida y registrada por el detector conectado a un sistema informático que construye la imagen de un píxel a la vez.

booksmedicos.org

Por otra parte, al emplear solo la profundidad estrecha de la imagen enfocada, se pueden crear múltiples imágenes de diferentes profundidades dentro de la muestra. Así, es posible diseccionar, literalmente, capa por capa todo el espesor de la muestra. También puede utilizarse un sistema informático para realizar reconstrucciones tridimensionales de una serie de estas imágenes. Como cada imagen situada a una profundidad específica dentro de la muestra es muy precisa, la imagen tridimensional resultante tiene las mismas características de nitidez. Además, una vez que el equipo ha ensamblado cada imagen seccionada, la imagen tridimensional reconstruida puede rotarse para su visualización en el sistema informático o a través de Internet desde cualquier ángulo deseado (*véase* fig. 1-4).

El microscopio de polarización se basa en el hecho de que las moléculas o los conjuntos de moléculas bien ordenados pueden rotar el ángulo del plano de la luz polarizada.

El **microscopio de polarización** es una simple modificación del microscopio óptico de campo claro en el cual se coloca un filtro de polarización, llamado ***polarizador***, entre la fuente de luz y la muestra, y un segundo filtro, denominado ***analizador***, se instala 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 una matriz de cristal o sustancias paracristalinas para rotar el plano de luz polarizada se conoce como ***birrefringencia*** (refracción doble). El músculo estriado y las inclusiones cristaloides en las células intersticiales testiculares (células de Leydig), entre otras estructuras frecuentes, presentan birrefringencia.

Microscopía de superresolución

Los microscopios ópticos convencionales tienen una limitación inherente en la potencia de resolución debido a la longitud de onda de la luz. La *resolución*, que se define como la distancia mínima de punto a punto entre dos detalles distinguibles, está restringida por el límite de difracción de la luz. La difracción hace que la señal luminosa de la muestra se propague a medida que se desplaza al ojo del observador u otros dispositivos detectores de luz. Como se vio antes, la resolución de un microscopio óptico con una alineación óptima del objetivo y las lentes del condensador se limita a 0.2 µm; por lo tanto, es incapaz de mostrar con detalle muchas estructuras celulares.

Las nuevas técnicas de microscopía de superresolución son capaces de superar el límite de resolución de la microscopía de luz convencional.

Durante décadas, los investigadores han estado en busca de técnicas que permitan exceder el límite de resolución del microscopio óptico. Los recientes avances conceptuales y la innovación técnica dieron origen a aumentos en la resolución óptica de 0.2 µm a ~10 nm. Cualquier técnica de microscopía que incremente la resolución de un microscopio óptico convencional dictada por la barrera de difracción en al menos un factor de 2 se denomina ***microscopía de superresolución***.

Se han desarrollado varias técnicas de microscopía de superresolución para estudiar células vivas bajo microscopía de luz fluorescente. En general, en la microscopía de superresolución se emplean tres métodos:

- **Métodos de localización de una sola molécula**, que incluyen microscopía de localización fotoactivada (PALM, *photoactivated localization microscopy*), microscopía de localización fotoactivada por fluorescencia (FPALM, *fluorescence photoactivated localization microscopy*) y microscopía de reconstrucción óptica estocástica (STORM, *stochastic optical reconstruction microscopy*). Estos métodos implican el empleo de moléculas fluorescentes fotoactivables y fotoconmutables que pueden cambiar el estado de emisión oscura a brillante cuando son expuestas a longitudes de onda lumínicas específicas. El análisis computarizado de los datos combinados obtenidos de miles de perfiles de intensidad de moléculas individuales y el perfil de difracción del microscopio se convierten en una imagen con una resolución de entre 10 y 20 nm.
- **Métodos de microscopía de iluminación estructurada (SIM, *structured illumination microscopy*)**, que se basan en extraer detalles estructurales finos de la interferencia de una estructura con patrones de iluminación predeterminados. Como este método utiliza frecuencias espaciales, que también están limitadas por la difracción, la microscopía SIM solo puede mejorar la resolución por un factor de 2 (resolución ~100 nm).
- **Métodos de barrido puntual**, que incluyen la microscopía de agotamiento de la emisión estimulada (STED, *stimulated emission depletion*) y la microscopía de agotamiento isotrópico de la emisión estimulada (isoSTED, *isotropic stimulated emission depletion*). Estos métodos se basan en la microscopía confocal de barrido láser, pero se agrega un agotamiento láser, que estimula las moléculas excitadas para volver a su estado fundamental. Con la microscopía STED se puede obtener una resolución de imagen de 30-80 nm.

Los métodos de microscopía de superresolución ofrecen nuevas oportunidades para observar detalles de estructuras celulares en células vivas a una resolución más alta que resultaba inalcanzable con la microscopía de fluorescencia convencional.

Microscopía electrónica

Hay dos tipos de microscopios electrónicos que proporcionan datos morfológicos y analíticos de las células y los tejidos: el **MET** y el **MEB**. La ventaja principal del ME sobre el microscopio óptico es que la longitud de onda del haz del ME es unas 2 000 veces menor que la del haz de luz del microscopio óptico, lo que aumenta la resolución por un factor de 10^3.

El MET utiliza la interacción entre un haz de electrones y una muestra para producir una imagen.

El concepto óptico del microscopio electrónico de transmisión es, en principio, similar al del microscopio óptico (*véase* fig. 1-11), pero el MET utiliza un haz de electrones en lugar de un haz de luz. El principio del microscopio es el siguiente:

- Una fuente de electrones (**cátodo**, **cañón de electrones**), como un filamento de tungsteno calentado, emite electrones.
- Los electrones son atraídos hacia un **ánodo**.
- Una diferencia de potencial entre el cátodo y el ánodo proporciona a los electrones un voltaje de entre 20 000 y 200 000 V, de manera que genera el **haz de electrones**.
- El haz pasa a través de una serie de lentes **electromagnéticas** que cumplen la misma función que las lentes de cristal de un microscopio óptico.

La **lente condensadora** le da forma y cambia el diámetro del **haz de electrones** que alcanza el plano de la muestra. Luego, el haz que ha pasado a través de la muestra es enfocado y aumentado por una **lente objetivo** para después volver a ser aumentado por una o más **lentes proyectoras**. La imagen final se observa en una **pantalla fluorescente** recubierta de fósforo o se captura en una **placa**

booksmedicos.org

fotográfica. Las partes de las muestras que han sido atravesadas por los electrones aparecen claras; las zonas oscuras de la muestra han absorbido o dispersado los electrones debido a su densidad inherente o a la adición de metales pesados durante la preparación. A menudo se coloca un detector de electrones con un sensor de luz, como un **sensor tipo CCD**, por encima o por debajo de la pantalla de visualización para observar la imagen en tiempo real en un monitor. Esto permite archivar sin complicaciones imágenes o videos en formato digital en sistemas informáticos.

La preparación de las muestras para la microscopía electrónica de transmisión es similar a la de la microscopía óptica, aunque se requieren métodos más refinados.

Los principios empleados para la preparación de los cortes para su visualización con el MET son, en esencia, los mismos que se utilizan en la microscopía óptica, con la restricción adicional de que en cada paso hay que trabajar con muestras de tres a cuatro órdenes de magnitud más pequeñas o más finas que en las de la microscopía óptica. El MET, cuyo haz de electrones tiene una longitud de onda de alrededor de 0.1 nm, cuenta con una resolución teórica de 0.05 nm.

Debido a la excepcional resolución del MET, la calidad de la fijación, es decir, el grado de conservación de la estructura subcelular, debe ser la mejor que se pueda lograr.

La preparación de rutina de muestras para microscopía electrónica de transmisión comienza con la fijación en glutaraldehído seguida de un enjuague en una solución amortiguadora y la fijación con tetróxido de osmio.

El **glutaraldehído**, un dialdehído, preserva constituyentes proteínicos mediante enlaces cruzados; el **tetróxido de osmio** reacciona con los lípidos, en particular los fosfolípidos. El osmio también proporciona densidad electrónica a las estructuras celulares y tisulares, ya que es un metal pesado, por lo que mejora la formación ulterior de la imagen en el MET.

Lo ideal es que los tejidos sean perfundidos con glutaraldehído equilibrado con un amortiguador antes de extirparse. En general, las piezas tisulares fijadas para el MET no miden más de 1 mm^3 (muy pequeñas si se comparan con las piezas para el microscopio óptico, que pueden medirse en centímetros). El proceso de deshidratación es idéntico al que se utiliza en la microscopía óptica, y el tejido se infiltra con una resina monomérica, en general una **resina epóxica**, que después se polimeriza.

El tejido incluido en plástico se corta en microtomos de diseño especial con hojas de diamante.

Dada la limitada capacidad de penetración de los electrones, los cortes para la microscopía electrónica de transmisión de rutina oscilan entre 50 y 150 nm. Además, como ya se dijo, debido a que los abrasivos que se emplean para afilar las cuchillas de acero dejan rayas inaceptables en los cortes para el MET, se utilizan **hojas de diamante** con un afilado casi perfecto. Los cortes obtenidos por las hojas de diamante son demasiado finos para ser manipulados; se hacen flotar desde el borde de la hoja hacia la superficie de una cubeta llena de líquido y se recogen de la superficie sobre rejillas de cobre revestido en plástico. Las rejillas tienen 50-400 orificios por pulgada cuadrada o ranuras especiales para ver cortes seriados. El haz atraviesa la muestra y después los orificios de la rejilla de cobre, y la imagen es enfocada en la pantalla, en el CCD o en la película fotográfica.

En la MET, para aumentar el contraste inherente de modo que los detalles de la estructura celular sean fáciles de ver y fotografiar, también se requiere una tinción.

En general, los cortes para el MET se tiñen mediante la adición a la muestra de materiales de gran densidad, como iones de metales pesados. Los **iones de metales pesados** pueden unirse a los tejidos durante la fijación o la deshidratación, o durante la inmersión de los cortes, una vez realizados, en soluciones de estos iones. El **tetróxido de osmio**, que se utiliza de manera rutinaria en el fijador, se une a los fosfolípidos de las membranas, lo que les da una densidad adicional.

A las soluciones de alcohol utilizadas en la deshidratación suele añadirse **nitrato de uranilo** 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 emplea para teñir los cortes antes de verlos con el MET, lo cual proporciona a las micrografías electrónicas alto contraste y mayor resolución.

En ocasiones, se requiere una tinción especial para visualizar los resultados de las reacciones histocitoquímicas o inmunocitoquímicas con el MET. Los procedimientos de la fosfatasa y la esterasa se usan con este propósito (*véase* fig. 1-3). La sustitución de un **compuesto que contiene un metal pesado** por el colorante fluorescente que se ha conjugado con un anticuerpo permite la adaptación de las técnicas inmunocitoquímicas al MET. Del mismo modo, se han refinado las **técnicas de autorradiografía** para su uso con el MET (*véase* fig. 1-8b). Estos métodos han sido particularmente útiles para determinar las fuentes celulares y las vías intracelulares de ciertos productos de secreción, la localización en la superficie celular de receptores específicos y la ubicación intracelular de fármacos y sustratos ingeridos.

La criofractura es una técnica especial de preparación de muestras para MET; es especialmente importante en el estudio de las membranas.

La **criofractura** rompe físicamente (fractura) una muestra congelada para revelar sus estructuras internas. El tejido que se examinará puede estar fijado o no; si se ha fijado, entonces el fijador se retira de la muestra antes. Se deja que un crioprotector, como el glicerol, infiltre el tejido y a continuación este se congela rápidamente a unos −160 °C. La formación de cristales de hielo se evita usando crioprotectores, mediante la congelación rápida y gracias a lo diminuto de las muestras. El tejido congelado se coloca en el aparato de criofractura, que tiene una cámara de vacío, y se incide con el borde de una hoja.

El plano de fractura pasa preferentemente a través de la parte hidrófoba de la membrana plasmática, de manera que queda expuesto en su interior.

La fractura de la membrana plasmática produce dos superficies nuevas. La superficie de la membrana que atrás tiene el espacio extracelular se llama ***cara E***; la superficie que tiene atrás el protoplasma (citoplasma) se denomina ***cara P***. Después, la muestra se recubre, en general con platino evaporado, para crear una réplica de la su-

booksmedicos.org

perficie de fractura. Después, el tejido se descarta y la réplica de la superficie, no el tejido en sí, se coloca sobre la rejilla para examinarse con el MET. Esta réplica muestra vistas planas de la organización interna de las membranas con detalles a nivel macromolecular (*véase* fig. 2-5, p. 34). Uno de los usos más frecuentes de la técnica de fractura por congelación es examinar la zónula ocluyente, donde las proteínas integrales de la membrana se unen a las células (*véase* fig. 5-15c, p. 135).

En la microscopía electrónica de barrido (MEB), el haz de electrones no atraviesa la muestra, sino que explora (barre) su superficie.

En muchos sentidos, las imágenes obtenidas con la MEB se parecen más a las que se observan en una pantalla de televisión que a las del monitor del MET. Parecen tridimensionales y muestran la estructura superficial de la muestra examinada. Para el análisis 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 evaporado, se monta en un soporte de aluminio y se coloca en la cámara para muestras del MEB. En los tejidos mineralizados, se pueden eliminar todas las partes blandas con un removedor y examinar las características estructurales del mineral.

El barrido se consigue con el mismo tipo de ráster que hace recorrer el haz de electrones sobre la superficie de un tubo de televisión. Los electrones reflejados desde la superficie (**electrones retrodispersados**) y los electrones que son expulsados de la superficie (**electrones secundarios**) son recogidos por uno o más detectores y reprocesados para formar una imagen de alta resolución tridimensional de la superficie de la muestra. En los primeros modelos de microscopios, las imágenes se capturaban en un tubo de rayos catódicos (TRC) de alta resolución o en placas fotográficas; sin embargo, los instrumentos modernos capturan imágenes digitales utilizando detectores sensibles y CCD para su observación en un monitor de alta resolución.

Se pueden utilizar 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 (METB) combina características del MET y del MEB para permitir el microanálisis de rayos X por sondas electrónicas.

La configuración del MEB puede usarse para producir una imagen de transmisión mediante la inserción en un portarrejillas a la altura de la muestra, de manera que se recogen los electrones de transmisión con un detector y se reconstruye la imagen en un TRC. Esta última configuración del MEB o **microscopio electrónico de transmisión-barrido** (**METB**) facilita el empleo del instrumento para **microanálisis de rayos X con sonda electrónica**.

Se puede equipar el microscopio con detectores para recoger los rayos X emitidos cuando el haz bombardea el corte; con analizadores adecuados, se puede confeccionar un mapa que muestra la distribución de los elementos con un número atómico superior a 12 y con una concentración suficiente para producir una cantidad adecuada de rayos X para analizar. Pueden deducirse datos semicuantitativos de elementos que tengan una concentración suficiente. De esta manera, tanto el MET como el MEB pueden convertirse en instrumentos analíticos sofisticados, además de ser instrumentos "ópticos".

Microscopía de fuerza atómica

El microscopio de fuerza atómica se ha convertido en una de las herramientas más poderosas para el estudio de la topografía superficial con resolución molecular y atómica.

Un microscopio más nuevo que ha demostrado ser de gran utilidad para los estudios biológicos es el **microscopio de fuerza atómica** (**MFA**). Se trata de un **microscopio no óptico** que funciona de la misma manera que las puntas del dedo, que tocan y sienten la piel de nuestra cara cuando no podemos verla. La sensación captada por las puntas del dedo es procesada por nuestro cerebro, que es capaz de deducir la topografía superficial de la cara mientras los dedos la tocan.

En el MFA, una sonda puntiaguda muy fina (púa), cuyo extremo tiene casi el tamaño de un solo átomo, explora la muestra mientras sigue líneas paralelas a lo largo del *eje x*, repitiendo la exploración en breves intervalos a lo largo del *eje y*. La púa fina está montada en el extremo de un **soporte voladizo** extremadamente flexible, de manera que mueve el soporte a medida que encuentra la "fuerza atómica" en la superficie de la muestra (fig. 1-16). La superficie superior del soporte es reflectora, y un haz láser es dirigido desde allí hacia a un diodo. Esta distribución funciona como una "palanca óptica" porque desviaciones diminutas del soporte se magnifican de manera considerable en el diodo. El MFA puede funcionar con la punta del soporte tocando la muestra (**modo de contacto**) o con la púa dando golpecitos a través de la superficie (**modo de percusión**) de forma muy parecida a como lo haría el bastón de una persona ciega (*véase* fig. 1-16, *recuadros*).

Cuando la púa sube o baja en el eje *z* a medida que atraviesa la muestra, los movimientos se registran en el diodo como movimientos del haz láser reflejado. Un dispositivo piezoeléctrico debajo de la muestra se activa en un circuito de retroalimentación sensible con el diodo para subir y bajar, de modo que el haz láser se enfoque en el diodo. Cuando la púa se hunde en una depresión, el dispositivo piezoeléctrico eleva la muestra para compensar, y cuando la púa se eleva sobre una prominencia, 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*, representan la topografía de la muestra con una resolución molecular y, a veces, atómica (fig. 1-17).

Una ventaja importante del MFA para el estudio de muestras biológicas es que, a diferencia de los instrumentos ópticos de alta resolución (MET o MEB), la muestra no tiene que estar en el vacío; incluso puede estar sumergida en agua. Así pueden obtenerse imágenes de las células vivas y de su medio circundante.

Microscopía virtual

La microscopía virtual es un procedimiento digital que representa una alternativa a la observación de portaobjetos de vidrio en un microscopio óptico.

La **microscopía virtual** integra la microscopía óptica convencional con la tecnología digital. Los preparados histológicos se exploran utilizando sistemas de adquisición de imágenes ópticas con enfoque automático, para crear archivos digitales de dos dimensiones que generalmente se almacenan en los servidores virtuales dedicados a microscopía (fig. 1-18). El proceso de exploración implica la obtención de imágenes a partir de un preparado histológico. Los diferentes sistemas adquieren imágenes ya sea como mosaicos o como tiras

booksmedicos.org

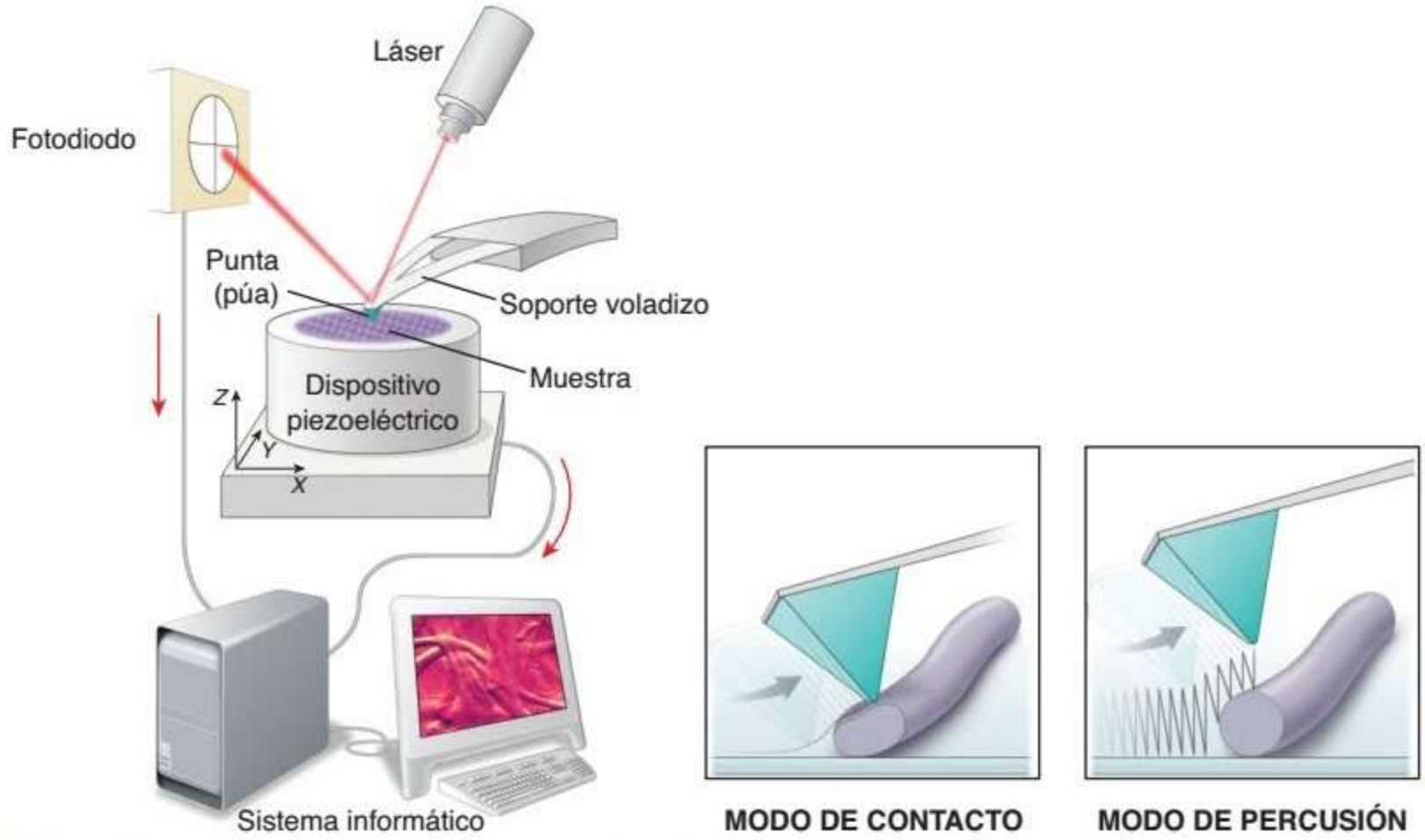


FIGURA 1-16. Diagrama de un microscopio de fuerza atómica (MFA). Una punta extremadamente aguda (púa) en un soporte voladizo se mueve sobre la superficie de una muestra biológica. El mecanismo de retroalimentación provisto por los dispositivos piezoeléctricos permite mantener la punta con una fuerza constante sobre la superficie de la muestra. La punta se extiende hacia abajo desde el extremo de un soporte voladizo láser reflejante. El rayo láser se enfoca en el soporte voladizo. A medida que la púa barre la superficie de la muestra, moviéndose hacia arriba y hacia abajo con el contorno de la superficie, el rayo láser se mueve del puente voladizo hacia un fotodiodo. El fotodiodo mide los cambios en las intensidades del haz láser y después convierte esta información en una corriente eléctrica. La retroalimentación del fotodiodo es procesada por un sistema informático como una imagen de superficie y también regula el dispositivo piezoeléctrico. En el modo de contacto (*recuadro izquierdo*), las fuerzas electrostáticas o de tensión superficial arrastran la púa de barrido sobre la superficie de la muestra. En el modo de percusión (*recuadro derecho*), la punta del soporte voladizo oscila. El último modo permite visualizar muestras blandas y frágiles mientras logra una alta resolución.

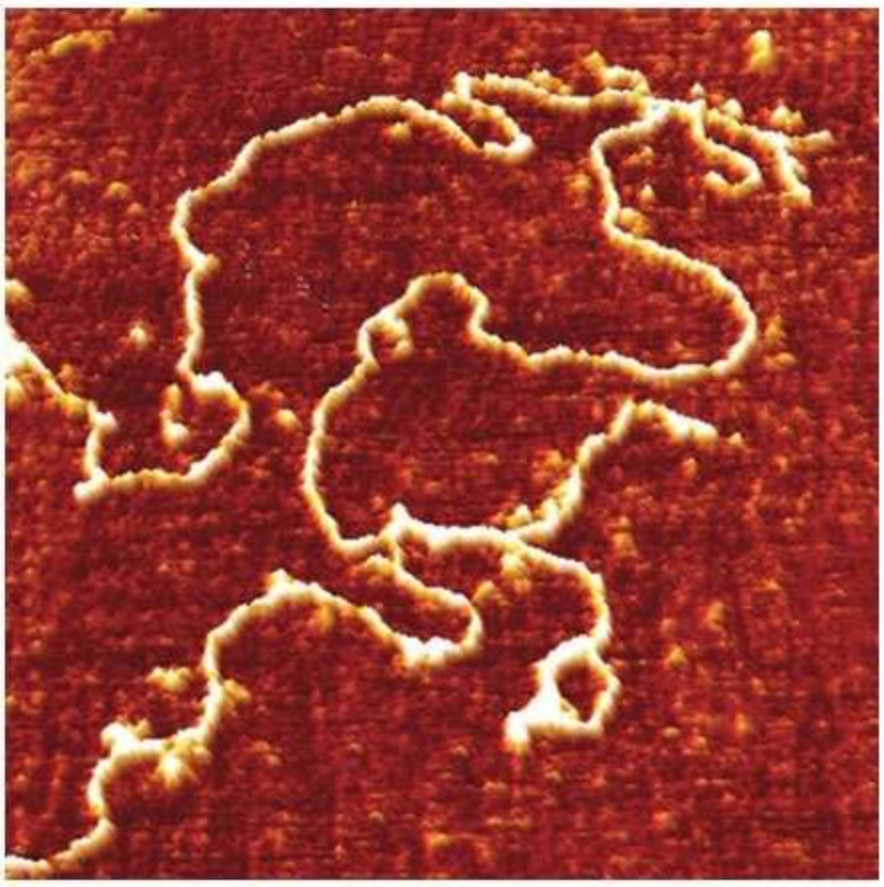


FIGURA 1-17. Microscopía de fuerza atómica de una sola molécula de ADN. Esta imagen se obtuvo en el modo de contacto, en el que la púa de exploración "golpea" hacia arriba y hacia abajo a medida que se mueve hacia adelante y hacia atrás sobre la superficie de la muestra. La muestra se encuentra en una superficie de mica ultrasuave. Una molécula de ADN produce con facilidad una protrusión que puede detectarse. Los abultamientos a lo largo de la molécula de ADN son causados por proteínas unidas a la molécula, y estos producen un movimiento aún mayor de la púa de barrido. El campo de barrido mide 540 × 540 nm. La longitud de la molécula de ADN varía de 0 a –40 nm. 185000× (cortesía de la Dra. Gabriela Bagordo, JPK Instruments AG, Berlín, Alemania).

lineales que se unen para crear una diapositiva virtual. La **muestra virtual** es una representación digital de un preparado, que se puede ver de forma remota sin un microscopio óptico. En general, los preparados histológicos se digitalizan en un solo plano focal (p. ej., 40× lente objetivo), pero pueden capturarse en planos multifocales.

Hay numerosos programas llamados ***microscopios virtuales*** que proporcionan acceso a Internet para explorar preparados digitales en cualquier dispositivo de una manera similar a la microscopía óptica. Los microscopios virtuales ofrecen nuevas posibilidades para la visualización y manipulación de muestras que no están disponibles en un microscopio óptico estándar. Estas incluyen:

- Visualización remota de cualquier muestra digitalizada en cualquier dispositivo de red (p. ej., ordenadores, tabletas, teléfonos inteligentes, etc.) que contengan un visor de microscopía virtual.
- Acercamiento o alejamiento progresivo de la imagen sin problemas (en general, van desde 0.06 hasta 40×).
- Facilidad para cambiar entre aumentos muy bajos y de alta potencia sin alterar el campo de visión o el plano de enfoque.
- Una imagen de orientación (de navegación) en miniatura de toda la muestra que exhibe la ubicación de la imagen de la pantalla principal en la diapositiva en tiempo real (esta orientación de imagen permanece en la pantalla, incluso cuando se acerca o aleja).
- Una imagen aumentada en miniatura que muestra la ampliación digital adicional de la región correlacionada con la posición del puntero en la pantalla.
- Características adicionales, como arrastre, giro y herramientas de medición, matrices de ajuste de color y una función de enfoque para elegir entre diferentes planos en las imágenes capturadas en planos multifocales.

booksmedicos.org



FIGURA 1-18. Microscopía virtual. Los preparados se registran mediante un escáner automático de diapositivas de alta resolución para crear archivos digitales que se almacenan en servidores dedicados a la microscopía virtual. El preparado virtual es una representación digital de un portaobjetos y se puede visualizar con un programa especializado llamado *microscopio virtual*. Los preparados virtuales se distribuyen a través de una red informática o Internet para su visualización remota. Los preparados virtuales se pueden ver individualmente o en grupos en cualquier dispositivo móvil, como tabletas o teléfonos inteligentes, con aplicaciones de microscopía virtual.

Desde el punto de vista educativo, los estudiantes que utilizan microscopios virtuales pueden comparar imágenes de diferentes tejidos o de los mismos tejidos teñidos con diferentes colorantes. Una característica importante que no tienen los microscopios ópticos es que los estudiantes o profesores pueden hacer anotaciones personalizadas en cada preparación virtual, que incluyen desde dibujos a mano alzada hasta textos escritos. Estas anotaciones pueden guardarse fácilmente como archivos superpuestos en los preparados de microscopía virtual. Además, la microscopía virtual facilita los métodos de aprendizaje colaborativos y en equipo entre varios estudiantes que comparten un microscopio virtual en un entorno de laboratorio (*véase* fig. 1-18).

La microscopía virtual también se utiliza en la enseñanza y práctica de la patología (**telepatología**). De igual forma, puede emplearse en un entorno virtual, compartiendo preparados virtuales en línea entre los especialistas en la materia.

booksmedicos.org



TÉCNICAS

FUNDAMENTOS DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN HISTOLOGÍA

- La **histología** (*gr., histos, tejido; logia, ciencia*), también llamada *anatomía microscópica*, es el estudio científico de las estructuras microscópicas de los tejidos y órganos del cuerpo.
- La **microscopía óptica** (observar los preparados histológicos) y la **microscopía virtual** (observar muestras histológicas digitalizadas en la pantalla de un sistema informático o un dispositivo móvil) son los métodos utilizados con mayor frecuencia para examinar células, tejidos y órganos en los cursos de histología.

PREPARACIÓN DEL TEJIDO

- Los preparados de rutina de cortes histológicos fijados en **formalina** y teñidos con **hematoxilina-eosina** (**H&E**) son las muestras utilizadas con mayor frecuencia para los estudios histológicos con el **microscopio óptico**.
- El primer paso en la preparación de una muestra histológica es la **fijación**, que conserva la estructura y previene la degradación enzimática.
- En el segundo paso, la **muestra se deshidrata**, se lava y se **incluye en parafina** o resinas epóxicas para permitir su corte.
- En el tercer paso, la **muestra se monta** en un portaobjetos de vidrio y se **tiñe** para poder examinarla con el microscopio óptico.
- Para la **microscopía de expansión** (**MEx**) se requieren preparaciones específicas, en las que las muestras se infiltran con hidrogeles que provocan su expansión física.
- Los pasos en la preparación de las muestras para el **microscopio electrónico de transmisión** (**MET**) son similares a los de la microscopía óptica, excepto que requieren diferentes fijadores (glutaraldehído y tetróxido de osmio), métodos de inclusión (resinas plásticas y epóxicas) y tinciones (metales pesados).

TÉCNICAS DE TINCIÓN

- La **eosina** es un **colorante ácido** (rosado) y tiene una **carga neta negativa**. Reacciona con grupos catiónicos cargados positivamente en células y tejidos, en particular con los grupos amino de las proteínas (estructuras eosinófilas).
- La **hematoxilina** actúa como un **colorante básico** (azul) y tiene una **carga neta positiva**. Reacciona con grupos fosfato ionizados cargados negativamente en los ácidos nucleicos (estructuras basófilas).
- El **ácido peryódico de Schiff** (**PAS**) tiñe hidratos de carbono y moléculas ricas en hidratos de carbono de un color púrpura característico. Se utiliza para mostrar el glucógeno en las células y moco en las células y tejidos, así como la membrana basal y las fibras reticulares en el tejido conjuntivo.
- La **inmunocitoquímica** se basa en la especificidad de una reacción entre un antígeno y un anticuerpo que está conjugado ya sea con un colorante fluorescente (para la microscopía óptica) o con partículas de oro (para la microscopía electrónica). Tanto el **método inmunocitoquímico directo** como el **indirecto** se utilizan para localizar un antígeno diana en células y tejidos.
- La **histoquímica** y la **citoquímica** se basan en la **unión específica** de un colorante con un componente celular en particular que muestra **actividad enzimática inherente**.
- La **hibridación** es un método de localización de ARN mensajero (ARNm) o ADN mediante la hibridación de la secuencia de interés a una hebra complementaria de una sonda de nucleótidos.
- La **técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia** (**FISH**) emplea colorantes fluorescentes combinados con sondas de nucleótidos para visualizar múltiples sondas al mismo tiempo. Esta técnica es muy utilizada en pruebas genéticas.
- La **autorradiografía** emplea una emulsión fotográfica que se coloca sobre un corte histológico para localizar material radioactivo en los tejidos.

booksmedicos.org

MICROSCOPÍA

- La interpretación correcta de las imágenes microscópicas es muy importante, ya que los órganos son tridimensionales, en tanto que los cortes histológicos son bidimensionales.
- El **poder de resolución** es la capacidad de una lente de microscopio o un sistema óptico para obtener imágenes separadas de objetos que están muy cerca unos de otros. El poder de resolución de un **microscopio óptico de campo claro** (de uso frecuente entre estudiantes e investigadores) es de alrededor de 0.2 µm.
- Además de la microscopía de campo claro, otros sistemas ópticos incluyen la **microscopía de contraste de fase**, **microscopía de campo oscuro**, **microscopía de fluorescencia**, **microscopía de barrido confocal**, **microscopía ultravioleta** y **microscopía de luz ultravioleta**.
- Los **microscopios electrónicos de transmisión** (MET; potencia teórica de resolución de 0.05 nm) emplean la interacción de un haz de electrones con una muestra para producir una imagen.
- Los **microscopios electrónicos de barrido** (MEB; poder de resolución de 2.5 nm) utilizan electrones reflejados o forzados a salir de la superficie de la muestra que son recolectados por los detectores y reprocesados para formar una imagen de la superficie.
- Los **microscopios de fuerza atómica** (MFA; poder de resolución de 50 pm) son microscopios no ópticos que utilizan una púa ultrafina (**soporte voladizo**) que se barre a través de la superficie de una muestra. Los movimientos hacia arriba y hacia abajo del soporte voladizo se registran y transforman en una imagen gráfica.