

PRÁCTICA 1: TÉCNICA HISTOLÓGICA

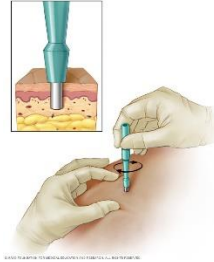
Es un proceso fundamental en el estudio de la microanatomía de tejidos y órganos, consiste en la preparación de muestras biológicas para su observación al microscopio, permitiendo la creación de preparados permanentes como laminillas. Este proceso es esencial para preservar la estructura celular y tisular, proporcionando una base sólida para el estudio de la fisiología y la comprensión de la organización y función celular, facilitando su análisis bajo diferentes tipos de microscopios.



Obtención de la Muestra

No se considera estrictamente parte de la técnica histológica, es un paso preliminar. Existen dos métodos:

- **Biopsia:** Consiste en la extracción de una pequeña muestra de tejido de un organismo vivo para examen.
- **Necropsia:** Implica la obtención de muestras de tejidos y órganos de un organismo fallecido.



PASOS DE LA TÉCNICA HISTOLÓGICA

1) Fijación:

La fijación es el primer paso en la técnica histológica, su objetivo principal es detener los procesos biológicos naturales que ocurren tras la extracción del tejido.

Este paso tiene múltiples efectos beneficiosos:

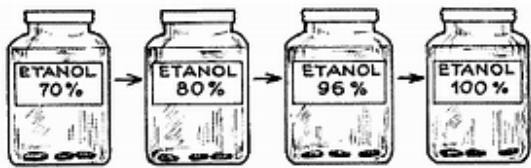
- Detiene el metabolismo celular
- Previene la autólisis
- Inhibe las proteasas
- Elimina microorganismos no deseados
- Aumenta la rigidez del tejido
- Crea las condiciones necesarias para los siguientes pasos

El fijador más comúnmente utilizado es el **formaldehído al 10%**, otras opciones son el glutaraldehído, y alcoholes (etanol/metanol)



2) Deshidratación:

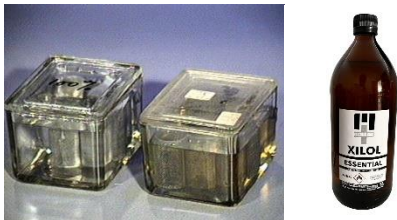
Busca eliminar el agua presente en los tejidos y reemplazarla por compuestos hidrofóbicos; se realiza mediante una serie de baños en soluciones de etanol de concentración creciente, permitiendo que el alcohol reemplace gradualmente el agua en los tejidos.



3) Aclaramiento:

Pretende reemplazar el alcohol con un compuesto hidrofóbico, preparando así las muestras para la inclusión en parafina. Típicamente, se emplea **xileno** o xilol para este proceso.

El aclaramiento asegura que el tejido esté completamente libre de agua y alcohol, creando un ambiente propicio para la infiltración de parafina.



4) Inclusión:

La inclusión es el proceso de transformar la muestra de una consistencia gelatinosa y blanda a una más sólida, lo cual es esencial para obtener cortes finos y precisos en las etapas posteriores. Durante este paso, el tejido se sumerge en parafina líquida calentada a 60°C.

La parafina líquida penetra los espacios intercelulares de la muestra, al enfriarse se solidifica, creando un bloque que encapsula la muestra en su interior, lista para pasar al siguiente paso.



5) Microtomía:

Este paso implica cortar el bloque en secciones extremadamente delgadas utilizando un equipo llamado **microtomo**, utiliza una cuchilla de diamante que se desplaza a través del bloque de parafina, generando cortes finos cuyo grosor puede variar entre 1 y 50 micras; para permitir que la luz del microscopio atraviese la muestra eficientemente, proporcionando una visión nítida y detallada de las estructuras celulares y tisulares.

Estos cortes se sumergen luego en un baño de flotación con agua a 45°C, lo que permite que se extiendan y desplieguen uniformemente.

Antes de proceder al siguiente paso, los cortes deben ser desparafinados y rehidratados, usando Xilol y posteriormente alcohol en concentraciones decrecientes hasta llegar a agua destilada



5.1) Técnica de congelación:

Es una alternativa a la inclusión en parafina. Este método se centra en mantener la muestra en estado congelado para permitir cortes rápidos y finos.

Después de la deshidratación, la muestra se sumerge en una solución crioprotectora que ayuda a preservar la estructura celular durante la congelación.

El corte se realiza en un instrumento llamado criostato, que mantiene la muestra a temperaturas y permite transferirla directamente a portaobjetos y para teñirse inmediatamente.



6) Tinción:

La tinción realza el contraste natural y destaca los distintos componentes celulares, tisulares y materiales extrínsecos presentes en la muestra. Este proceso facilita una visualización

más clara y detallada de las estructuras microscópicas.

Los colorantes utilizados se aplican en forma de soluciones acuosas o alcohólicas; dependiendo de las propiedades de los colorantes y la naturaleza de las muestras.

Los colorantes se clasifican principalmente en dos tipos:

- Ácidos: Como la **eosina**, poseen una carga neta negativa y se unen a componentes con carga positiva. Tiñen principalmente el citoplasma celular.
- Básicos: Como la **hematoxilina**, tienen una carga neta positiva y se unen a componentes con carga negativa. Tiñen principalmente los núcleos celulares.

La tinción de rutina más común es la hematoxilina-eosina (H&E), pero existen tinciones especiales para resaltar estructuras específicas.



7) Montaje:

Antes de proceder al montaje, es necesario volver a deshidratar la muestra con alcohol.

Este proceso asegura la estabilidad de la muestra, previene la deshidratación y facilita la transmisión de la luz. La muestra se coloca sobre un portaobjetos y se cubre con una lámina de vidrio delgada, sellándola para protegerla contra contaminantes.

Dos opciones para el medio de montaje son:

- **Bálsamo del Canadá:** Una oleoresina transparente extraída de ciertas variedades de abeto. Se adhiere firmemente al vidrio y alcanza una consistencia dura.
- **Resina sintética:** Solubilizada al 60% en xileno, ofrece una alternativa práctica. Su solubilidad en xileno facilita la manipulación y asegura una correcta fijación de la muestra al portaobjetos.



Inclusiones y Artefactos:

Durante el proceso de preparación histológica, pueden ocurrir varios tipos de errores que afectan la calidad de la muestra final:

- **Inclusiones:** Pequeños elementos como fibras, pelos, polvo o cristales de colorante que se incorporan

inadvertidamente a la preparación.

- **Pliegues:** Ocurren cuando el tejido se dobla sobre sí mismo durante el procesamiento.
- **Bandeado:** Causado por un ángulo incorrecto de la cuchilla durante el corte, resultando en bandas visibles en el tejido.
- **Mellas:** Producidas por defectos en el filo de la cuchilla, causando rasgaduras lineales en el tejido.
- **Burbujas:** Pequeñas burbujas de aire que quedan atrapadas en el medio de montaje.

REFERENCIAS

- Alquicira R, & Lemus M, & van der Goes T (2017). Técnica histológica. Fortoul van der Goes D.I.(Ed.), Histología y biología celular, 3e. McGraw Hill.
- Métodos de estudio. Paulsen D.F.(Ed.), (2023). Histología y Biología celular. Autoevaluación y repaso, 6e. McGraw Hill.
- Ross: Histología, Texto y Atlas, Correlación con Biología Molecular y Celular. 8ª Edición. Wolters-Kluwer. 2020.