

*Atlas de Histología Vegetal y Animal*

# Técnicas histológicas AMPLIACIONES

**Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal**

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Septiembre 2024)

Este documento es una edición en pdf del sitio  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo  
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA  
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar  
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,  
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre  
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software  $\text{\LaTeX}$   
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio  
([www.texstudio.org/](http://www.texstudio.org/)) como editor.

## Contenidos

1	Artefactos	1
2	Hematoxilina	7
3	Tabla de colorantes	9
4	Desenmascaramiento de antígenos	15
5	Aclarado de tejidos	21
6	Estereología	23

## 1 Artefactos

Un artefacto se define como cualquier alteración indeseada introducida en una muestra de tejido debido a las técnicas de procesamiento que se realizan para su observación. Pueden ser espacios sin tejido, roturas, pliegues, colores anormales, precipitados, burbujas de aire, etcétera. En algunas ocasiones son inevitables, pero en la mayoría de los casos son consecuencia de un mal procesamiento histológico. Reconocer estas alteraciones es esencial para una buena interpretación y diagnóstico de la muestra, especialmente si tratamos con muestras patológicas.

Los artefactos se pueden introducir en cualquier paso del proceso histológico, desde la toma de la muestra hasta el montaje para su observación. Vamos a describir los artefactos cronológicamente según el momento de la técnica histológica donde pueden ser introducidos: obtención de la muestra, fijación, inclusión, corte, tinción y montaje.

### Obtención de la muestra

Numerosos artefactos observados con el microscopio son consecuencia de un proceso de necropsia, es decir, ha transcurrido un tiempo excesivo entre el cese del flujo sanguíneo y la fijación del tejido. Por ejemplo, 3 minutos postmortem son suficientes para producir expansiones de las vellosidades intestinales. Además, se pierde nitidez en los límites de las membranas y descamación en epitelios, sobre todo prismáticos o columnares. Por tanto, hay que procurar que la fijación siga inmediatamente a la extracción del tejido, y que el tamaño de la pieza no sea muy grande. En el caso de muestras grandes o animales pequeños, es recomendable la fijación por perfusión. A nivel celular, los núcleos parecen haber perdido cromatina y tienen un halo azul. Algunos núcleos aparecen picnóticos, consecuencia del comienzo de la autólisis. También hay retracciones, espacios vacíos y disrupción del citoplasma. El retraso en la fijación puede ser porque el tejido no ha entrado en contacto con el fijador, por ejemplo en piezas grandes (un truco es abrir los órganos huecos como el útero, o el digestivo). También que el volumen de fijador respecto a la muestra no sea mayor de 1:20. La solución es fijar lo antes posible, hacer piezas pequeñas y abrir órganos

huecos. Los pulmones se pueden fijar por perfusión por gravedad. También ayuda a incrementar la velocidad de fijación la agitación de las muestras.

Durante la obtención de las muestras de tejidos es recomendable evitar deformarla y/o perforarlas durante su manipulación, puesto que estas alteraciones no pueden ser corregidas durante la fijación (Figura 1). En la extracción de biopsias hay que tener en cuenta a qué tratamiento se ha sometido previamente a la muestra. Así, podemos encontrar restos de sutura, colorantes que han delimitado la región, polvos de talco de los guantes, demasiado anestésico, métodos de obtención que emplean calor, etcétera. Todo ello puede introducir alteraciones que tendrán que ser tenidas en cuenta.

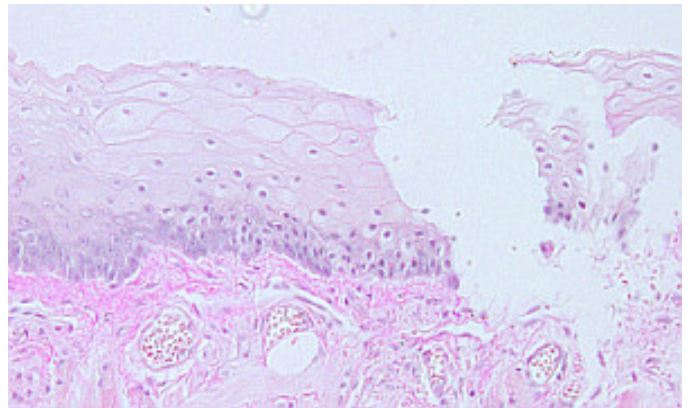


Figura 1. Daños provocados durante el proceso de extracción en la piel.

En algunos casos hay que tener en cuenta la diferente dureza entre partes de la muestra que se quiere obtener. Se pueden producir roturas o espacios sin tejido entre las partes duras y las blandas durante la extracción. Por ejemplo, en las muestras de retina la dureza de la esclerótica facilita que se desprendan los segmentos externos de los fotorreceptores del epitelio pigmentario (algo similar a lo que se produce en los desprendimientos de retina), creando un espacio artefactual.

### Fijación

Durante la fijación se pueden producir diversas alteraciones del tejido consecuencia de una mala elección del fijador, de la formación de pigmentos de hemateína o de formalina ácida, de la adherencia de

las muestras al recipiente de fijación, de una cantidad de fijador o tiempo de fijación inadecuados, muestras muy grandes, etcétera. En un tejido bien fijado los núcleos deben presentar una variedad de patrones de tinción que se corresponden con la distribución de la heterocromatina, no debe haber espacios entre células, el citoplasma se debe teñir bien con la eosina, no debe haber retracciones celulares.

En la fijación por inmersión se recomiendan piezas no superiores a 6 mm, siendo el volumen de fijador unas 20 veces el volumen de la muestra. En histopatología, el fijador usado normalmente es la formalina al 10%. La fijación por inmersión debe durar al menos de 8 a 12 h, aunque se sugiere de 48 a 1 semana de fijación. Una fijación muy prolongada dificulta la obtención de secciones por endurecimiento del tejido, pero además puede producir retracciones del mismo. Es recomendable usar el fijador en soluciones amortiguadoras de pH e iso-osmóticas para evitar posibles retracciones o expansiones del tejido producidas por el uso de soluciones hipertónicas o hipotónicas, respectivamente. Un tiempo de fijación excesivo no sólo altera la consistencia del tejido sino también sus características bioquímicas y reactivas, siendo posible por tanto los falsos positivos y/o negativos. Se puede producir contaminación con herrumbre cuando el frasco usado para la fijación tiene componentes metálicos, como puede suceder con la tapa del frasco. Si la fijación es incompleta aparecen los núcleos difuminados, los componentes de los tejidos se pueden separar fácilmente de la sección durante el estiramiento en el baño de agua, la morfología tisular no se mantiene. Una fijación incompleta puede deberse a que las muestras estuvieron un tiempo insuficiente, volumen de fijador insuficiente (por encima de 1/20), mala penetración (3 mm máximo de grosor), solución de formol agotada (se podría cambiar la solución de fijador durante el proceso de fijación).

Por otro lado, la elección del fijador ha de considerar el medio de inclusión, el método de corte y la técnica de tinción. Por ejemplo, hay fijadores que no son apropiados para inclusiones en parafina, como es una elevada concentración de glutaraldehído, tetróxido de osmio, acroleína y otros. Sin embargo, estos mismos fijadores sí son apropiados para inclusiones en resinas.

## Deshidratación-Inclusión

Si tras la fijación se ha de retallar la muestra para su inclusión hay que evitar que queden restos de tejido no deseado en la muestra a incluir. Las muestras con partes que pueden desprenderse han de procesarse por separado para evitar que un bloque contenga tejidos de muestras diferentes.

La inclusión en parafina siempre tiene un paso previo de deshidratación, puesto que la parafina no es hidrosoluble. Este paso implica sustituir el agua de la muestra por alcohol, éste por la sustancia aclarante (normalmente xileno) y ésta última por la parafina. Si el agua permanece en el tejido, la parafina no penetrará y la inclusión será defectuosa (Figura 2). Los alcoholes pierden gradación por la incorporación de agua de la atmósfera y de las propias muestras. Por ello, siempre que sea posible, se han de usar alcoholes recién preparados o con pocos usos. En caso de encontrarnos defectos que supongamos consecuencia de una mala deshidratación, las muestras pueden volver a la estufa para licuar la parafina, aclarante, e hidratarse de nuevo, y así hacer una nueva inclusión.

Si la deshidratación no es adecuada pueden formarse cristales del fijador que permanecen en el tejido. Además, la presencia de restos de agua en la muestra acarrea problemas de corte, provoca a una mala tinción de esa zona y resulta en una mayor opacidad del tejido. Pero si la deshidratación es excesiva en el tiempo, los tejidos se pueden volver frágiles y duros, lo que puede interferir con el proceso de corte y con los colorantes. Problemas por exceso de deshidratación: aparecen las secciones como persianas causadas por la cuchilla en el borde de la muestra y roturas en las células tipo persiana.

Es muy importante que las muestras no se sequen durante la deshidratación, especialmente en el paso de la sustancia de aclarado. De lo contrario, se pueden crear y retener burbujas de aire en la muestra que luego aparecerán como zonas comprimidas de tejido rodeando a espacios vacíos. Si el tiempo en el líquido aclarante ha sido largo, se producen retracciones del tejido.

Si la inclusión en parafina no fue buena, las secciones se estirarán muy rápidamente cuando se colo-



can en el baño con agua caliente, lo que puede provocar que las estructuras tisulares se separen unas de otras, como ocurre con epitelios, cartílagos, etcétera. También pueden aparecer grietas. La mala infiltración de la parafina puede estar causada por una mala fijación, deshidratación, aclarado o tiempo insuficiente en la propia infiltración.

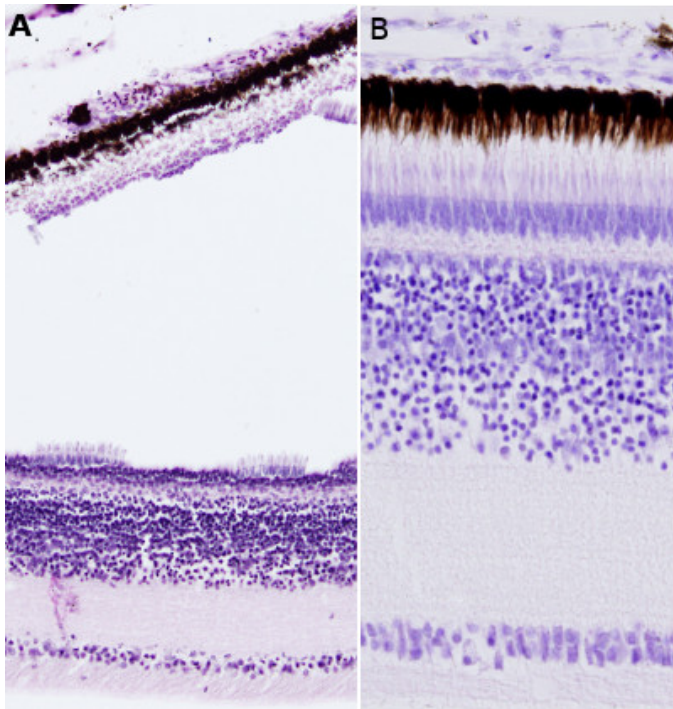


Figura 2. Imágenes de retina. A) Una deficiente deshidratación provoca densidades diferentes que al cortar provoca la separación de los tejidos con diferente consistencia. B) La inclusión fue adecuada y los tejidos permanecen guardando su organización inicial.

Trazas de los líquidos de deshidratación y aclarado en la muestra incluida pueden llevar a secciones con arrugas, que no se estirarán durante el estiramiento con calor, ni cuando se monten en el portaobjetos. Además, esta porción del tejido se teñirá más intensamente puesto que los colorantes tienen acceso al tejido por las dos superficies, y pueden quedar retenidos en el pliegue.

Si el medio de inclusión es más duro que la muestra se producen arrugas y grietas. Hay que tener especial cuidado cuando se manipulan las muestras con pinzas calientes durante el proceso de inclusión, estos instrumentos no deben estar sobrecalentados.

### Corte

Una mala sujeción de la cuchilla o de cualquier otra pieza del microtomo puede llevar a secciones con diferente grosor en diferentes partes de la muestra, o incluso a la pérdida de la muestra. También cuando el ángulo de inclinación de la cuchilla no es adecuado o la cuchilla no está bien afilada. El ángulo de inclinación posible de la cuchilla en los microtomos modernos puede oscilar entre 10 y 15 grados. Si el ángulo es muy agudo la cuchilla comprime el tejido, normalmente donde el tejido es más blando. Igual compresión y arrastre del tejido ocurre en cuchillas mal afiladas.

Cuando se selecciona un grosor de corte muy delgado las secciones pueden salir arrugadas y a veces no es posible estirarlas en el agua. Se pueden producir secciones incompletas por una mala inclusión o porque se ha elegido un grosor de corte muy delgado. Si la cuchilla está mellada se producen roturas estriadas en las secciones (Figura 3). Conviene que la muestra esté completamente rodeada por medio de inclusión para que la cuchilla no “ataque” directamente a la muestra, lo cual podría deformarla o dañarla.

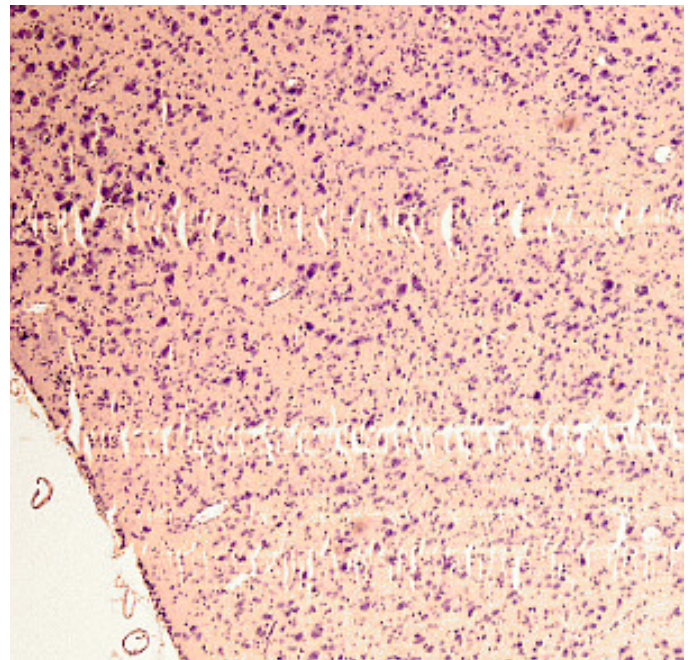


Figura 3. Estrías producidas en el corte por una cuchilla mellada.

### Estiramiento de los cortes

El agua que se emplea para estirar los cortes debe ser destilada, para que al evaporarse no queden cristales, y limpia para que no haya restos extraños. Además, durante el secado de los cortes, deben protegerse del polvo y partículas.

Cuando la temperatura del agua es muy alta o muy baja pueden generarse grietas en las secciones. Si está muy alta se producen expansiones del tejido y pueden aparecer núcleos picnóticos y burbujas nucleares. También hay que tener en cuenta la distribución de las secciones para evitar que se solapen o se aruguen por falta de espacio durante el estiramiento (Figura 4).

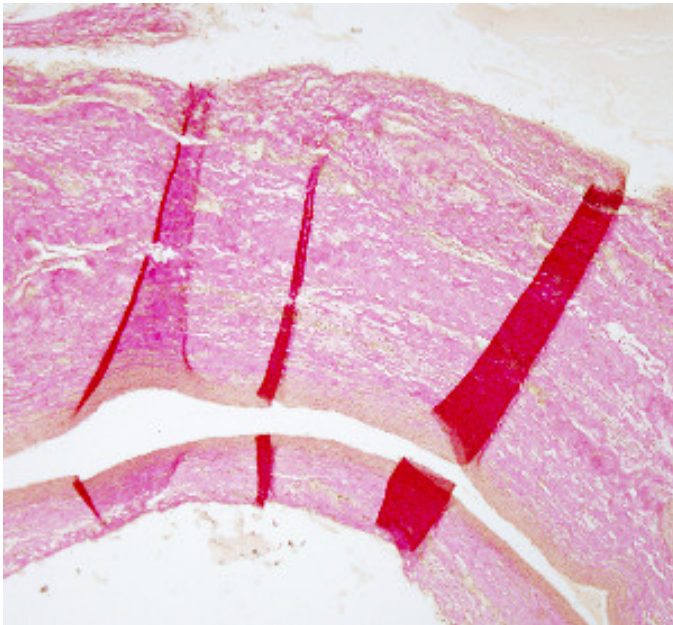


Figura 4. Zona muscular de delfín cercana al páncreas. Pliegues del tejido muscular, que se observan a ambos lados de una arteria, formados por no extender los cortes de manera correcta.

Los portaobjetos tienen que estar completamente limpios y sin restos de ningún tipo. Si los portaobjetos se han cubierto con el adherente en el propio laboratorio (son muy comunes los portaobjetos recubiertos con gelatina y alumbre de cromo y potasio), se ha de tener especial cuidado en que no se produzcan grumos de la solución sobre el portaobjetos cuando se está secando en la estufa. Además, la solución debe ser transparente y, una vez sumergidos los portaob-

jetos, deben escurrirse muy bien. Por otra parte, si la calidad del adherente usado no es buena, los cortes podrían desprenderse total o parcialmente del portaobjetos durante el procesado posterior.

### Tinción

La eliminación de la parafina debe ser completa antes de la tinción porque los restos de parafina producen mala penetración de los colorantes, alterando la calidad de la tinción.

Las soluciones de colorantes han de estar limpias de microorganismos y filtradas para evitar artefactos como cristales o precipitados de colorante (Figura 5). Es una buena práctica filtrar la solución del colorante antes de su uso.

Cuando se tiñen las muestras añadiendo gotas de colorante sobre las secciones, no sumergiendo el portaobjetos en la solución, hay que procurar que todo el corte quede cubierto y que no se seque la solución durante el tiempo de tinción para que la coloración sea homogénea y así evitar precipitados de colorante por evaporación local.

Los artefactos más frecuentes producidos durante la tinción suelen deberse a un aclarado incompleto del colorante y a la precipitación de cristales de colorante en el tejido. En algunos casos es necesario adaptar el tiempo de tinción a las características de la muestra (grosor, dureza, etc.), para que el tejido se tiña adecuadamente.

### Montaje

Una vez teñidas las secciones, la deshidratación ha de ser completa para evitar la aparición de gotitas de agua en el medio de montaje (Figura 6). Si esto ocurre, se puede solucionar sumergiendo otra vez las secciones en el aclarante, alcohol absoluto y en alcoholes de gradación decreciente, hasta su hidratación, y repitiendo la deshidratación en mejores condiciones (soluciones nuevas, alargar tiempos, etc.). Sin embargo, en algunos casos el tiempo en alcohol determina el grado de tinción, por lo que habría que volver a pasar de nuevo por las soluciones de colorantes.

El cubreobjetos tiene que estar limpio y hay que manipularlo cogiéndolo por los bordes. Además, no



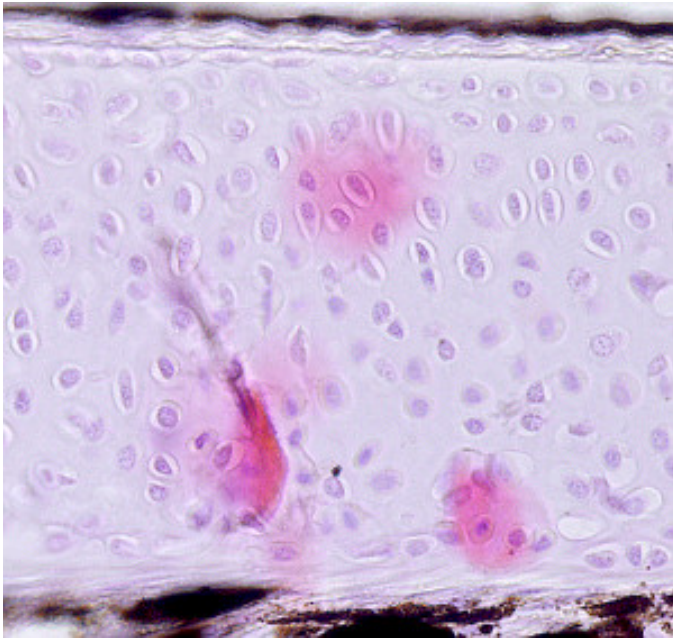


Figura 5. Tejido cartilaginoso con precipitados de eosina. Esto se debe a no haber filtrado el colorante.

deben quedar burbujas de aire durante el montaje y hay que tener cuidado con la cantidad de medio de montaje a utilizar: si es poco podría no cubrir toda la sección cuando se evapora el aclarante. Si se añade un exceso de medio de montaje se generará una capa tan gruesa que no se podrán utilizar objetivos de gran aumento, como el de 100x. Estos objetivos tienen una distancia focal muy corta, es decir, las lentes de estos objetivos deben estar muy próximas a la muestra para poder enfocarla, y el aumento del espesor normal del medio de montaje se lo impedirá. Del mismo modo, debe usarse un medio de montaje lo más parecido a cómo se obtuvo de la casa comercial puesto que con el tiempo los medios de montaje suelen perder el disolvente y se vuelven más viscosos. Esto hace que sea más difícil conseguir una capa delgada y por tanto estamos en el mismo problema mencionado anteriormente.

El corte no se debe secar una vez que sale del aclarante y antes de añadir el medio de montaje puesto que se pueden generar burbujas (Figura 7). Si, tanto el portaobjetos como el cubreobjetos, se ensucian por sus caras exteriores durante este proceso por un exceso de medio de montaje (lo cual dificultaría la visualización de la muestra en el microscopio), éste se puede eliminar lavando cuidadosamente la preparación con aclarante o limpiándolo con una cuchilla afilada.

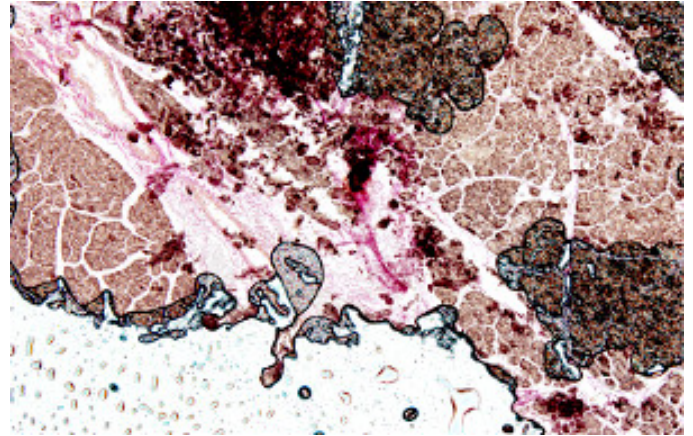


Figura 6. Este artefacto se observa cuando se realiza una mala deshidratación del corte ya teñido. El agua acumulada impide la entrada del medio de montaje.

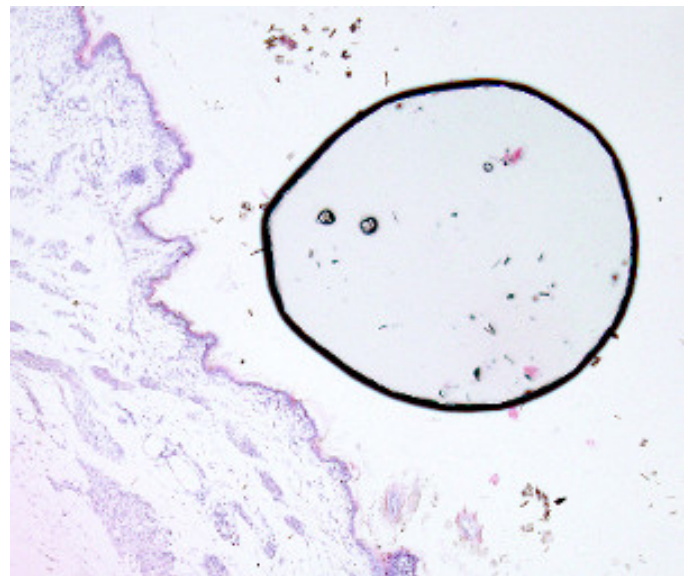


Figura 7. Durante el proceso de montaje final pueden quedar burbujas de aire entre el tejido y el cubre-objetos.



### **Consejo general**

Antes de realizar cualquier técnica histológica se deben hacer pruebas con diferentes tiempos de fijación, deshidratación, inclusión y tinción. Aunque hay establecidos unos tiempos estándar para cada uno de estos procesos hay que considerarlos orientativos porque cada tejido reacciona de diferente manera ante los distintos procedimientos histológicos.

### **Bibliografía**

Jimson S. Malathi L, Kumar GMK, Balachander N. 2016. Artefacts in histological section. *Biomedical and pharmacology journal*. 9: 843-845.

McInnes E. 2005. Artefacts in histopathology. *Comparative clinical pathology*. 13: 100-108.

## 2 Hematoxilina

La hematoxilina es un colorante natural que se obtiene de la madera del árbol *Haematoxylum campechianum*. El nombre deriva del griego: haimatos: sangre y xylon: madera. La hematoxilina que se compra proviene directamente de estos árboles que son originarios de América Central y del Sur. Aunque se ha conseguido sintetizar en el laboratorio, su producción sigue siendo natural. Para su obtención se astilla la madera y se hierve. Se obtiene una solución rojiza que luego se vuelve amarilla, y posteriormente negruzca cuando se vuelve a enfriar. El agua se evapora dejando la hematoxilina cruda con una pureza que puede llegar al 10 %. Es necesario purificar posteriormente con éter, secar y volver a cristalizar en ambiente acuoso.

Como colorante fue introducido independientemente por Böhmer (1865), quien la usó con el añadido de un mordiente, y Fischer (1875). Wossowzky (1876) introdujo la mezcla hematoxilina y eosina en un mismo protocolo de tinción.

El colorante no es realmente la hematoxilina sino la hemateína, la cual se consigue durante la preparación del colorante mediante la oxidación química de la hematoxilina (Figura 8), aunque también se puede obtener por oxidación del oxígeno atmosférico dejándola madurar durante 6 a 8 semanas. El yodato sódico es el agente oxidante más comúnmente usado (0.2 g oxidarán a 1 g de hematoxilina). Otros son la iodina, el peróxido de hidrógeno, óxido de mercurio o el permanganato potásico. Esta oxidación continuará por la acción atmosférica y si el colorante es muy viejo se puede producir una sobreoxidación que resultará en malas tinciones. Esta tasa de oxidación elevada se puede reducir añadiendo glicerol o un alcohol a la solución. Durante la preparación habitual del colorante se añade la mitad del oxidante necesario para oxidar toda la hematoxilina de la solución, por lo que con el tiempo se irá produciendo más hemateína sin riesgo de sobreoxidación, y el colorante se podrá usar durante mucho tiempo. La hemateína no se vende directamente en soluciones de hemateína porque es muy inestable.

Tras añadir yodato sódico, el oxidante más empleado, se puede hervir y acelerar la oxidación, tanto

que se pueden usar en cuanto se enfríe a solución. La ebullición no es necesaria puesto que se puede conseguir el mismo resultado a temperatura ambiente durante unos pocos días.

La hemateína en solución tiene un color rojo a pH menor que 1, amarilla a un pH entre 1 y 5, y violeta a un pH por encima de 6. La hemateína no tiñe por sí sola, sino que necesita iones metálicos cargados negativamente, y que actúan como mordiente. Normalmente estas sales son de aluminio (como el alumbre de amonio o de potasio) o de hierro (cloruro férrico o alumbre de hierro). Las soluciones que contienen aluminio y hemateína se llama hemalumbre. Otros mordientes menos frecuentes son el alumbre de cromo, y sólo en casos especiales se añade iones de plomo, cobre, zirconio, ácido fosfotúngstico o ácido fosfomolibdico. La cantidad de iones ha de ser mayor que la de hemateína y debe ser una solución acidificada. La hematoxilina con mordiente de aluminio se usa para resalta núcleos, los mordientes de hierro permiten teñir núcleos en ambientes ácidos y para resaltar las estrías musculares. Con ácido fosfotúngstico se usa para destacar las estrías musculares, fibrina y fibras gliales. El color de la tinción con hematoxilina se puede cambiar mediante su combinación con los mordientes. Así, cuando se mezcla con alumbre de aluminio se consigue un color azul, el alumbre de hierro da un color negro y las sales de estaño dan un color rojo. Las soluciones de hematoxilina de hierro no necesitan la adición de agentes oxidantes puesto que las sales de hierro funcionan tanto como mordiente como agente oxidante.

La tinción con hematoxilina puede ser progresiva o regresiva. Se prefiere normalmente una tinción progresiva, pero si se ha sobreteñido se puede corregir con alcohol de 70° o 95°, con un poco de ácido clorídrico. También se puede usar una solución acuosa acidificada, pero el proceso es más lento. La sobretinción se puede prevenir añadiendo a la solución de colorante más aluminio o acidificándola más. El hemalumbre cambia de color marrón a azul a pH 6, esa es la razón por la que las secciones se ponen en agua del grifo tras el paso por la solución de tinción.

La hemateína-hierro da un color mucho más oscuro. En la hematoxilina de Heidenhain la hemateína

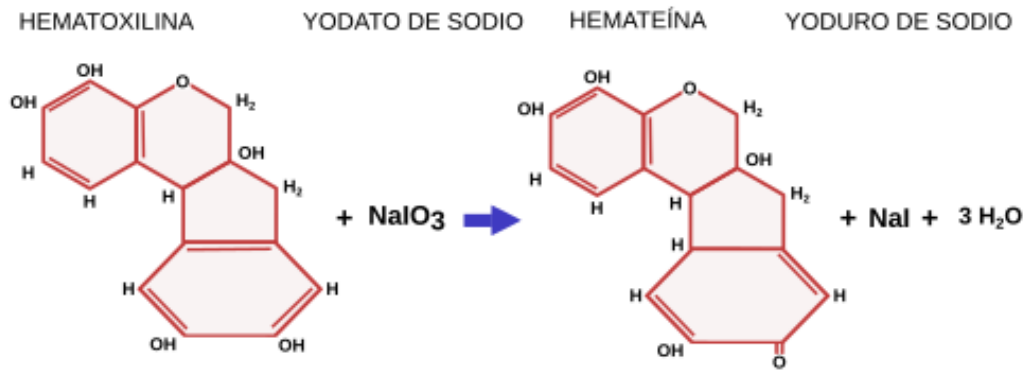


Figura 8. Conversión de hematoxilina en hemateína

y el hierro se aplican secuencialmente obteniendo una gran variedad de estructuras teñidas por diferenciación. Esta hematoxilina es recomendada cuando se aplican soluciones ácidas posteriores puesto que la tinción del núcleo es muy fuerte. Además, es una tinción progresiva.

### Bibliografía

Kiernan JA. 2008. Histological and histochemical methods. Theory and Practice. Scio Publishing limited 4th Edition. Oxfordshire.UK. ISBN: 9781904842422.

Llewellyn BD. 2013. Hematoxylin formulae. Stain files. <http://www.stainfile.info>.

### 3 Tabla de colorantes

Los colorantes son sustancias que se emplean para dar color a las estructuras que componen los tejidos animales y vegetales, es decir, para teñir las células, y sus compartimentos, y la matriz extracelular. Hay un número muy elevado de colorantes que se emplean en los laboratorios de histología con usos diversos, lo que depende de lo que queramos observar en nuestra preparación. Los colorantes se eligen en función de su color, forma y peso molecular, solubilidad y su capacidad para reaccionar con moléculas del tejido.

Los colorantes pueden ser previsibles en cuanto a qué estructuras van a teñir y con qué color lo van a hacer si consideramos su naturaleza química. Así, si tenemos en cuenta su carga eléctrica, que se puede deducir de su estructura molecular, podemos clasificarlos en catiónicos o básicos que teñirán el núcleo

(el ácido desoxirribonucleico) y carbohidratos ácidos, aniónicos o ácidos que teñirán el citoplasma y matriz extracelular. Mientras que los colorantes no cargados pueden ser reactivos que tiñen una gran variedad de estructuras, los liposolubles que tiñen depósitos lipídicos y los mordientes que tiñen principalmente mielina y núcleos. El tamaño de la molécula y su capacidad para formar agregados es a veces importante por la diferente capacidad de penetración en el tejido. Por ejemplo, se pueden usar dos colorantes aniónicos con diferente tamaño para teñir estructuras diferentes.

#### Bibliografía

Kiernan JA. 2008. *Histological and histochemical methods. Theory and Practice.* Scio Publishing limited 4th Edition. Oxfordshire.UK. ISBN: 9781904842422.



Tabla de colorantes (modificado de Kiernann 2009).

Nombre	Molécula	Tipo	Color	Tiñe	Protocolo
Iodina	Inorgánico		Azul	Cromosomas y depósitos de almidón y glucógeno. Bacterias Gram. Protozoos.	Solución de Lugol
Tetróxido de osmio	Inorgánico		Gris oscuro, negro	Es una reacción histoquímica: lípidos, proteínas, aparato de Golgi, nervios, neuronas, glía.	Método de Golgi, método de Marchi.
Sales de plata y de oro	Inorgánico		marrón oscuro, negro, amarillo.	Citoesqueleto, núcleos. Sistema nervioso. Tejido conectivo reticular.	Impregnaciones y virados. Impregnación de Cajal, Bodian, Gallyas, Bielchowsky, Campbell-Switzer, Gomory y técnicas de piridina de plata
Azul Prusia	Pigmento inorgánico		Azul	Hierro citoplasmático no unido a grupos hemo. Cisteína y cistina.	Método histoquímico.

Figura 9

Verde naftol	Nitroso	Complejo metal-colorante	Verde	Colágeno	Mezclas de colorantes aniónicos.
Ácido pícrico	Nitro	Aniónico	Amarillo	Citoplasma	Tricrómicos, actúa como mordiente.
Amarillo Martius	Nitro	Aniónico	Amarillo-naranja	Citoplasma	En conjunción con colorantes aniónicos.
Naranja G	Azo	Aniónico	Naranja	Citoplasma	Papanicolaou, Tricómico de Mallory, tricómico de Heidenhain.
Amarillo metanilo	Azo	Aniónico	Amarillo	Citoplasma, tejido conectivo	Contrastes aniónicos
Escarlata de Biebrich	Azo	Aniónico	Escarlata	Colágeno, proteínas básicas	Tricómico de Masson (sustituye a fucsina ácida)
Amaranto	Azo	Aniónico	Rojo	Citoplasma, núcleos	Tricómico de Gabe
Marrón Bisckmarck	Azo	Catiónico	Marrón, metacromático	Extensiones celulares, cartílago, tejidos vegetales, mastocitos, células vivas	Papanicolau, Feulgen, colorante vital
Verde Jano B	Azo / azino	Catiónico	Verde	Mitocondrias (in vivo), bacterias, hongos, levaduras.	Disuelto para vitales
Amarillo alción	Azo /tiazol	Catiónico	Amarillo / fluorescente	Bacterias ( <i>Helicobacter Pylori</i> en azul), mucus en amarillo.	En combinación con azul de toluidina
Rojo brillante proción M2B	Azo	Reactivo	Rojo	Tinción vital para dientes y hueso. Detección de amilasa. en suero.	Se usa en tejido vivo
Sudán IV	Azo	Solvente	Rojo	Gotas de lípidos	En combinación con tinciones generales como la hematoxilina. Secciones en congelación u otra técnica que preserve las grasas.

Figura 10

Rojo aceite O	Azo	Solvente	Rojo	Gotas de lípidos	
Sudán negro B	Azo	Solvente / catiónico	Negro	Gotas de lípidos	
Rojo Congo	Azo	Directo	Rojo	Depósitos amiloides / indicador de pH	
Azul benzo BB	Azo	Directo	Azul	Fibras de colágeno (birrefringencia)	
Clorazol negro E	Azo	Directo	Negro	Para plantas, hongos y microorganismos	
Rojo sirio F3B	Azo	Directo	Rojo	Fibras de colágeno (birrefringencia)	
Auromina O	Arilmetano	Diarilmetano	Amarillo	Bacilo de la tuberculosis	
Pararosanilina	Arilmetano	Aminotriarilmetano			Para reactivo de Schiff
Fucsina básica	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Rojo	Núcleo	Para reactivo de Schiff
Rosanilina	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Magenta		No comercial
Magenta II	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Magenta		No comercial
Cristal violeta	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Violeta	Bacterias Gram +	
Verde metilo	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Verde azulado		
Verde etilo	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Verde azulado	Núcleo, ADN, ARN	

Figura 11

Fucsina ácida	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Rojo		
Verde rápido FCF	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Verde-azulado	Conectivo	
Azul de anilina (azul de metileno)	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Azul	Conectivo	
Azul brillante de Comassie	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Azul	Proteínas en geles	
Fluoresceína de sodio	Xanteno	Aniónico	Fluorescente	Proteínas	
Eosinas	Xanteno	Aniónico	Rosa	Conectivo, citoplasma	
Pironina Y	Xanteno	Catiónico	Rojo	ADN	
Rodamina B	Xanteno	Catiónico	Fluorescente		
Verde oregón	Xanteno	Catiónico	Fluorescente		
Acriflavina	Acridina	Catiónico	Amarillo, Fluorescente	ADN	
Naranja de acridina	Acridina		Fluorescente	ADN, carbohidratos, vital	
Rojo neutro	Azina	Catiónico	Rojo	Núcleos, lisosomas, vacuolas, colorante vital	
Safranina O	Azina	Catiónico	Rojo	Lignina de plantas y núcleos	
Azocarmín G y B	Azina	Aniónico	Rojo	Citoplasma.	

Figura 12



Violeta de cresilo	Oxacina	Catiónico	Violeta	Núcleos	
Galocianina	Oxacina	Catiónico	Verde-azulado	ADN	
Azul Nilo	Oxacina	Aniónico	Azul	Colorante vital	
Orceína	Oxacina	Catiónico	Rojo	Elastina, cromosomas	
Tionina	Tiazino	Catiónico	Azul		
Azur A, B y C	Tiazino	Catiónico	Azul	Sangre	
Azul de metileno	Tiazino	Catiónico	Azul		
Verde metileno	Tiazino	Catiónico	Verde-azulado	Núcleos	
Azul de toluidina	Tiazino	Catiónico	Azul, metacromático		
Violeta de metileno de Bernthsen	Tiazino	Catiónico	Azul	Extensiones de sangre	
Calcofluor blanco	Polieno		Fluorescente	Celulosa	
Indigo	Carbonil	Antroquinona			
Rojo alzian	Carbonil	Antroquinona			
Rojo rápido nuclear	Carbonil	Antroquinona			
Azul turquesa sirio pálido	Phtalocianina				
Azul alcian 86	Phtalocianina				

Figura 13

Azul cuprolínico	Phtalocianina				
Azul rápido Luxol	Phtalocianina				

Figura 14

## 4 Desenmascaramiento de antígenos

Éste un resumen del trabajo fin de grado de Clara Leboreiro Babé, defendido en 2017 en la Universidad de Vigo.

Numerosas enfermedades son detectadas y evaluadas mediante técnicas inmunohistoquímicas. La calidad de los resultados de estas pruebas es a menudo esencial para tomar una decisión sobre el tratamiento o el estadio en el que se encuentra dicha enfermedad. Una de las precauciones a la hora de emplear técnicas inmunohistoquímicas es tener en cuenta la posible alteración de los antígenos debido a la fijación y procesamiento de los tejidos.

En la mayoría de los laboratorios de patología clínica se procesan los tejidos mediante la fijación en formol y posterior inclusión de los mismos en parafina. Este fijador es una disolución acuosa de formaldehído, normalmente a una concentración del 4 %. Se ha demostrado que el formaldehído provoca numerosas y complejas reacciones entre las proteínas del tejido, principalmente enlaces cruzados entre dichas proteínas (Figura 15). La fijación excesiva en paraformaldehído daña muchos antígenos. El fijador crea enlaces entre proteínas que cambian la organización tridimensional por lo que puede ocurrir que los epitopos, zonas de unión del anticuerpo, queden ocultos o enmascarados. Normalmente se considera que un tejido está sobrefijado cuando se mantiene en fijador más de 24 horas. En soluciones acuosas el formaldehído forma metileno hidratado que reacciona con una gran cantidad de cadenas laterales de las proteínas para formar grupos reactivos hidroximetilo, los cuales se unen a otras proteínas presentes en el tejido formando puentes de metileno. Las cadenas laterales de las proteínas que presentan mayor reactividad con este compuesto contienen los aminoácidos cisteína, lisina, histidina y tirosina.

Las proteínas entre las que se producen los enlaces cruzados incluyen algunas que actúan Las proteínas entre las que se producen los enlaces cruzados incluyen algunas que actúan como antígenos y que se emplean en la detección de numerosas patologías mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos enlaces

impiden en ocasiones que el anticuerpo pueda reconocer a la proteína porque los sitios de unión o epitopos quedan enmascarados. Como consecuencia se pueden generar falsos negativos en los resultados, es decir, se dan casos en los que el antígeno se encuentra en el tejido y debido a este enmascaramiento antigénico no se detecta inmunohistoquímicamente.

Además de las modificaciones descritas, la formación de complejos de calcio, la modificación de la conformación de las proteínas y la variación de la carga electrostática de las mismas se consideran fenómenos causantes de enmascaramiento de antígenos por efecto del formol. Se cree que las modificaciones proteicas se producen en la cadena aminoacídica, o estructura primaria de la proteína, siendo menos relevante las alteraciones en las estructuras secundarias y terciarias, aunque en ocasiones también se pueden modificar estas últimas alterándose de este modo los epitopos conformacionales. La unión antígeno-anticuerpo depende sobre todo de fuerzas electrostáticas y la fijación con formaldehído modifica también la carga electrostática superficial del antígeno completo y del epitopo específico a detectar, impidiendo la interacción antígeno-anticuerpo.

Los enlaces cruzados formados por el formaldehído son estables a ciertos niveles de pH, temperatura y según el medio en el que se encuentre el tejido. Sin embargo, tienen la particularidad de ser reversibles y si estos factores son modificados se podrían romper dichos enlaces y los epitopos de interés quedarían expuestos. El proceso por el que se consigue desenmascarar los epitopos para ser reconocidos por anticuerpos se conoce como recuperación de antígenos o recuperación antigénica. La recuperación de antígenos se podría llevar a cabo mediante la eliminación de barreras moleculares que impiden el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo; de este modo la técnica de recuperación antigénica revertiría la mayoría de las modificaciones generadas por la fijación, restableciéndose una conformación proteica casi idéntica a la original, restaurando la carga electrostática de las proteínas y recuperando su inmunoreactividad previa a la fijación con formol.

La recuperación antigénica ha mejorado la técnica inmunohistoquímica para su uso en el diagnóstico de

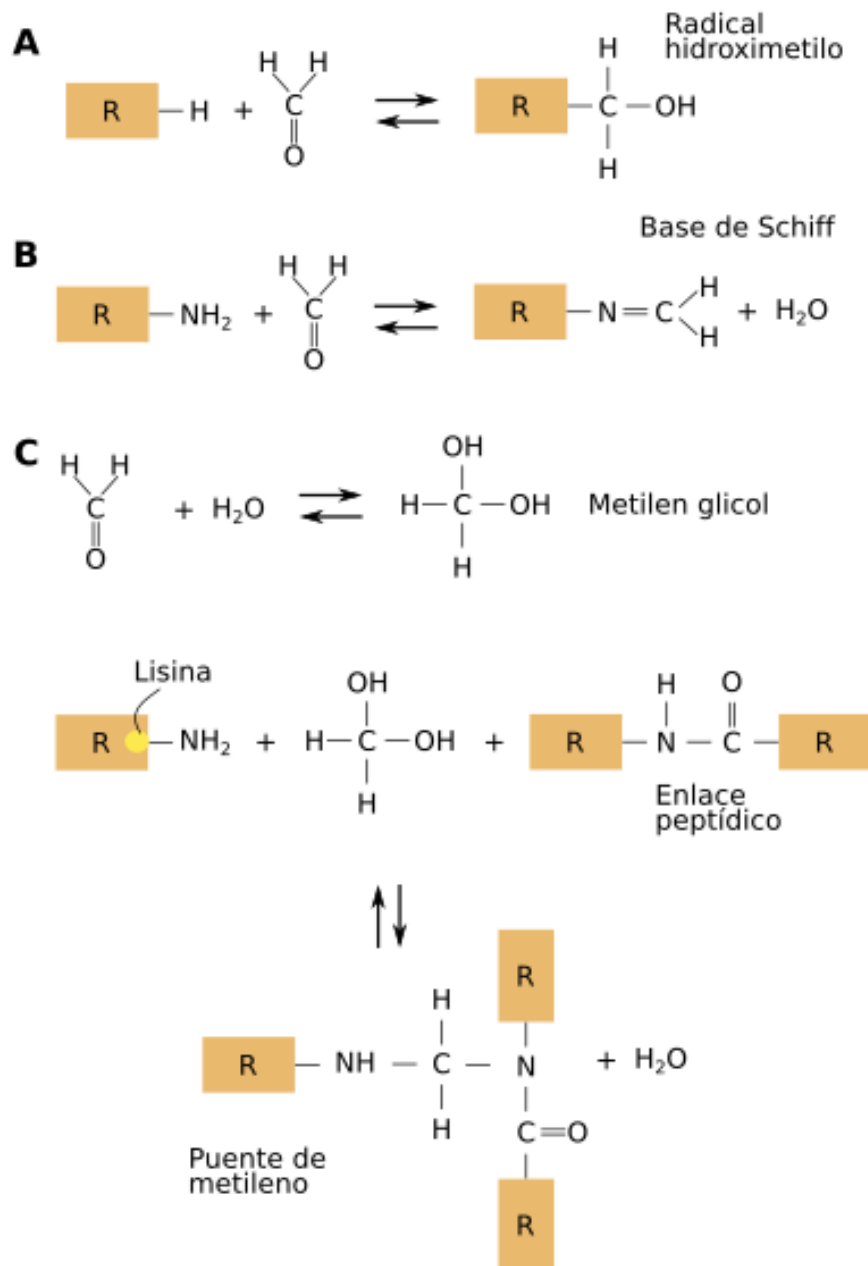


Figura 15. Esquema de las reacciones del formaldehído durante su proceso de fijación. A: Formación de radicales de hidroximetilo. B) Formación de grupos imina (base de Schiff). C) Formación de un puente de dimetilo entre dos proteínas.

patologías. Se definen dos etapas en la historia del empleo de la inmunohistoquímica en histología, pre-antígeno-epitope retrieval y post-antígeno-epitope retrieval, debido a la importancia que supuso su introducción en los laboratorios. El formol es el fijador más común en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica, así como en los bancos de teji-

dos, y en ambos casos es habitual realizar el proceso de desenmascaramiento antigénico antes de emplear inmunohistoquímica en los tejidos. Una ventaja adicional que conlleva el uso de esta técnica es que consigue un menor umbral de detección del antígeno, permitiendo emplear diluciones mayores de anticuerpo; esto, además de suponer una ventaja económica, re-

duce el ruido de fondo y se aumenta la señal del marcaje. Los tejidos que se encuentran en los denominados bancos de tejidos han adquirido un enorme valor gracias al uso de esta técnica, ya que se posibilita que tejidos fijados décadas atrás y en diferentes laboratorios se empleen para investigaciones clínicas. Además, es posible la combinación de la técnica de recuperación de antígenos junto con la proteómica para la búsqueda y uso de biomarcadores en medicina personalizada.

Debido a que la formación de puentes cruzados por el formol depende en gran medida de la estructura primaria de las proteínas, la recuperación antigénica va a estar determinada por la secuencia de aminoácidos de cada antígeno. Se ha demostrado que determinados antígenos necesitan de unas condiciones específicas para su recuperación. Algunos antígenos precisan ser recuperados para poder detectarse en una tinción inmunohistoquímica, mientras que para otros antígenos la técnica de recuperación antigénica no es esencial para su detección pero su aplicación aumenta la señal de marcaje. En algunos casos la recuperación antigénica ha dado lugar a falsos positivos, pero también a falsos negativos, por lo que el correcto ajuste de las condiciones de recuperación es de vital importancia. Esto significa que una aproximación incorrecta a la técnica de recuperación de antígenos puede no mejorar la señal de marcaje, e incluso disminuir la misma. Por tanto, es recomendable elaborar un protocolo de recuperación de antígenos particular para el antígeno en el que se esté interesado.

### 1. Métodos de recuperación

El origen de la técnica de recuperación de antígenos consistió en hervir secciones de tejido en agua. Posteriormente se comenzaron a emplear tampones en sustitución del agua con el fin de mantener la conformación de las proteínas. A día de hoy, hay una gran diversidad en cuanto a métodos de recuperación antigénica que combinan el uso de diversas fuentes de calor, tampones y actividad enzimática. El desenmascaramiento por calor es el método más usado. La actividad enzimática se emplea como un método alternativo cuando hay que desenmascarar antígenos que puedan perder antigenicidad si son expuestos al calor, como las citoqueratinas. Las proteasas más usadas

son tripsina, proteinasa K, pepsina, pronasa, ficina, y otras.

Los métodos de recuperación de antígenos se dividen según se aplique calor, en cuyo caso se emplean las siglas HIER (*Heat-Induced Epitope Retrieval*), o si se basa en el uso de enzimas proteolíticas, conocido como PIER (*Proteolytic-Induced Epitope Retrieval*).

#### *Método por calor*

El método HIER es el más común, con variaciones en cuanto a las fuentes de calor utilizadas. HIER ha revolucionado la inmunocitoquímica en los laboratorios de patología porque ha permitido detectar un número asombroso de antígenos que antes no se podían estudiar. Teóricamente el calor rompe los enlaces creídos por el formaldehído, aunque todavía no está claro cómo funciona. La mayoría de los investigadores utilizan el microondas o un recuperador de antígenos de funcionamiento similar a un autoclave. Como alternativa, se puede emplear un baño caliente o una estufa. Cada fuente de calor presenta una serie de ventajas y desventajas (Tabla 1). Es curioso que las fijaciones por alcohol, que en teoría no van a formar enlaces, también parecen beneficiarse por el desenmascaramiento por calor.

El aparato más usado para desenmascarar antígenos por calor son los autoclaves o las ollas a presión. En estos aparatos se pueden conseguir temperaturas mayores a los 100 grados sin que ebulle el líquido, y así el tiempo de calentamiento es más corto. Un tiempo de unos 8 a 10 minutos a máxima temperatura (110-120 °C) suele ser óptima. Variaciones de 1 a 2 minutos, así como el tiempo de enfriamiento, pueden afectar a los resultados. Hay que tener en cuenta que el uso de ollas a presión parece aumentar la reactividad de la biotina endógena. Esto puede dar lugar a falsos positivos. Por ejemplo, la piruvato carboxilasa de las mitocondrias tiene 4 moléculas de biotina, luego artefactos se pueden dar en células metabólicamente activas. Por eso es importante siempre hacer un control negativo quitando el primer anticuerpo. Parece que las soluciones urea potencian estos artefactos, mientras que son menos evidentes con el tampón Tris.

El microondas es otro aparato que se emplea para



	Baño caliente Microondas Olla a presión		
Rango de temperatura	25 a 100 °C	85 a 95 °C	25 a 125 °C
Regulación de la temperatura	Buena	Buena	Óptima
Evaporación potencial de la solución tampón	Significativa	Significativa	Mínima
Desbordamiento potencial por ebullición	Nulo	Significativo	Nulo

Figura 16. Resumen de las características más importantes de las fuentes de calor comúnmente empleadas en el método HIER.

producir calor puesto que es rápido y el calor se produce incluso dentro del tejido, útil para muestras grandes. El problema del uso de los microondas es que cada aparato tiene su "personalidad" y estandarizar resultados debe hacerse en cada laboratorio de forma individual. Otro aspecto a tener en cuenta es que la cantidad de volumen introducido afecta a la velocidad de calentamiento por lo que es bueno colocar siempre el mismo volumen, independientemente del número de muestras. Los microondas tienen la desventaja de que puede producirse un calentamiento irregular y que una base giratoria es imprescindible. Además, hay que realizar un control visual para evitar ebulliciones violentas del líquido, lo que lleva a que tengamos que rellenar los medios de incubación, con la consiguiente alteración del mantenimiento de la temperatura.

Los principales factores que afectan a la recuperación de antígenos en el método HIER son la temperatura y el pH de la solución tampón en la cual se sumerge el tejido durante el proceso de recuperación antigénica. El efecto de la temperatura depende de dos variables, la temperatura alcanzada y el tiempo de exposición al calor. A medida que aumenta la temperatura alcanzada se debe disminuir el tiempo de exposición, y viceversa. Por otra parte, la composición del tampón no parece tener tanta importancia como su pH. Así, determinados antígenos se recuperan con mayor facilidad a pH básicos mientras que otros precisan de pH ácidos. El tampón que se suele usar en pH ácidos es el tampón citrato, mientras que a pH básicos es más común el tampón Tris. Ejemplos de soluciones empleadas son: tampón citrato pH 6, EDTA 0.1 M pH 8, Tris 0,5 M pH 10, tampón clorídrico-glicina 0.05 M, 01 % de ácido peryódico, varias concentraciones de urea, soluciones de tiocianato de plomo, etcétera.

Se ha estudiado el efecto que podría tener el calcio en la recuperación antigénica ya que su presencia en los tejidos parece promover el enmascaramiento antigénico, mediante la formación de complejos moleculares en los que participa el calcio endógeno durante el procesamiento del tejido. Para tratar de solucionar este problema son numerosos los estudios que emplean EDTA como componente de los tampones en la recuperación antigénica. El EDTA es un compuesto que se emplea como quelante de calcio con el fin de eliminar el calcio presente en el tejido. Sin embargo, hay controversia respecto al papel que podría tener este elemento pues algunos resultados sugieren que el EDTA no afecta a la recuperación antigénica de determinados antígenos.

### *Método por enzimas*

En el método PIER las enzimas más comunes son la proteinasa K y la tripsina, las cuales degradan los puentes metileno. La duración de la aplicación enzimática debe ajustarse en función del tiempo de fijación al que ha estado sometido el tejido. Debido a que un tiempo inadecuado de exposición a la actividad enzimática puede dañar el tejido no es un método empleado en muchos laboratorios. Se ha sugerido la utilización combinada de ambos métodos, PIER y HIER, en aquellos casos en los que no se obtienen buenos resultados empleando uno de estos dos métodos por separado.

## **2. Evaluación**

La evaluación de una tinción inmunohistoquímica mediante métodos cuantitativos no está muy extendida a día de hoy, pues todavía se siguen evaluando las tinciones por observación directa al microscopio,

es decir, cualitativamente. El análisis de imagen permite una evaluación cuantitativa de una imagen digital. Depende de dos factores: los equipos para la adquisición de imágenes digitales y los programas de análisis de imagen. A continuación se describen los aspectos a tener en cuenta:

**Adquisición de imágenes.** Éstas pueden ser tomadas en escala de grises o en formato RGB. Se deben tener en cuenta los efectos que compensan las cámaras digitales como la compensación de color, iluminación, balance de blancos y óptica del microscopio. Por tanto, las condiciones de captura de imágenes han de ser exactamente iguales para todas las muestras.

**Tipo de sensor de la cámara.** Existen dos tipos de sensores, los CCD (*Charge Coupled Device*) y los CMOS (*Complementary Metal Oxide Semiconductor*). La tecnología de los CCD es más avanzada, se considera superior y más adecuada para el análisis científico de imagen ya que los píxeles son más grandes. Además, los equipos con tecnología CMOS normalmente generan imágenes con más ruido, especialmente cuando se trabaja con fluorescencia. Formato de imagen. Determinados formatos de imagen comprimen las fotografías perdiendo calidad y, por lo tanto, información. La calidad de la imagen depende también de su resolución. Por tanto, hay que encontrar el balance entre el grado de compresión y el tamaño de la imagen.

**Análisis de imagen.** Para analizar una imagen digital tomada de un tejido procesado inmunohistoquímicamente se presupone que hay una relación directa entre la señal y la cantidad de antígeno, y que por lo tanto una mayor intensidad de tinción corresponde con una mayor concentración antigénica. A pesar de que el análisis de imagen reduce el error a la hora de evaluar una tinción inmunohistoquímica, es necesario que las muestras a comparar sigan exactamente el mismo protocolo antes de tomar la imagen digital: recolección, fijación, inclusión, tratamiento de recuperación de antígenos, e inmunotinción. De otra manera se pueden obtener resultados erróneos.

### Bibliografía

Alelú-Paz, R., Haroutunian, V., Iturrieta-Zuazo,

I., Byne, W., García-Villanueva, M., Rábano, A., García-Amado, M., Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M. (2008). A new antigen retrieval technique for human brain tissue. *PLOS ONE*. 3: e3378.

Balgley, B.M., Guo, T., Zhao, K., Fang, X., Tavasoli, F.A., Lee, C.S. (2009). Evaluation of archival time on shotgun proteomics of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Proteome. Res.* 8: 917-925.

Battifora, H. (1991). Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am. J. Clin. Pathol.* 96: 669-671.

Boenisch, T. (2006). Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J. Histochem. Cytochem.* 54: 961-964.

Bogen, S., Vani, K., Sompuram, S. (2009). Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced crosslinks. *Biotech. Histochem.* 84: 207-215.

D'Amico, F., Skarmoutsou, E., Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J. Immunol. Methods.* 341: 1-18.

Elias, J.M., Rosenberg, B., Margiotta, M., Kutcher, C. (1999). Antigen restoration of MIB-1 immunoreactivity in breast cancer: combined use of enzyme predigestion low temperature for improved measurement of proliferation indexes. *J. Histotechnology.* 22: 103-106.

Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., Grizzle, W.E. (2001). Introduction to the theory practice of fixation of tissues. *J. Histotechnology.* 24: 173-190.

Ezaki, T. (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks optimization for double immunostaining. *Micron.* 31: 639-649.

Floyd, A.D. (2010) Image analysis in immunohistochemistry. En: Shi, S-R., Taylor, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry based research diagnostics. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, pp. 165-185.

Fowler, C.B., Evers, D.L., O'Leary, T.J., Mason, J.T. (2011). Antigen retrieval causes protein unfold-

ing. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 366-381.

Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P. (1985). Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 845-853.

Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., Olcott, H.S. (1945). The reaction of formaldehyde with proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 67: 950-954.

Frost, A.R., Sparks, D., Grizzle, W.E. (2000). Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8: 236-243.

Gown, A.M., Willingham, M.C. (2002). Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 449-454.

Gown, A.M. (2004). Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval formalin fixation. *Am. J. Clin. Pathol.* 121: 172-174.

Kahveci, Z., Minbay, F., Noyan, S., Çavusoglu, I. (2003). A comparison of microwave heating proteolytic pretreatment antigen retrieval techniques in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Biotech. Histochem.* 78: 119-128.

Long, D.J., Buggs, C. (2008). Microwave oven-based technique for immunofluorescent staining of paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Histol.* 39: 1-4.

Namimatsu, S., Ghazizadeh, M., Sugisaki, Y. (2005). Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride heat: a universal antigen retrieval method. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 3-11.

Rait, V.K., O'Leary, T.J., Mason, J.T. (2004). Modeling formalin fixation antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I-Structural functional alterations. *Lab. Invest.* 84: 292-299.

Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E. (2000). Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 307-311.

Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R. (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, future. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 327-343.

Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R. (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 931-937.

Shi, S.R., Cote, R.J., Yang, C., Chen, C., Xu, H.J., Benedict, W.F., Taylor, C.R. (1996). Development of an optimal protocol for antigen retrieval: a "test battery" approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 179: 347-352.

Shi, S.R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 193-201.

Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748.

Shi, S.R., Shi, Y., Taylor, C.R. (2011). Antigen retrieval immunohistochemistry: review future prospects in research diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 13-32.

Taylor, C.R., Shi, S.R., Chen, C., Young, L., Yang, C., Cote, R.J. (1996). Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave pressure cooker, autoclave, steamer. *Biotech. Histochem.* 71: 263-270.

Yamashita S., Okada Y. (2005) Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: analyses in vitro employing SDS-PAGE immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 12-21.

## 5 Aclarado de tejidos

En histología y organografía es necesario observar estructuras tisulares en su contexto para obtener una información que es difícil de obtener a partir de secciones. Por ejemplo, la morfología de una red capilar, el patrón de ramificación de un axón de una neurona, la organización de la nefronas en un riñón o la expresión de un gen durante el desarrollo embrionario. La observación microscópica de muestras grandes se enfrenta a varios problemas. La calidad de la observación histológica con microscopios ópticos está limitada en gran manera por la pobre penetración de la luz a través de los tejidos, lo que hace que éstos sean en su mayoría opacos, o al menos translúcidos. Además, los tejidos están compuestos por diversas estructuras y moléculas que tienen diferente índice de refracción, es decir, que tienen propiedades ópticas diferentes. Cuando la luz tiene que atravesar estructuras con diferentes índices de refracción se produce dispersión de la luz. Por último, en los tejidos hay sustancias que absorben la luz como son los grupos hemo, la melanina y otros pigmentos.

Hay dos maneras de reducir los problemas de absorción y dispersión de la luz por las muestras biológicas, sobre todo cuando queremos estudiar detalles a nivel celular: hacer secciones histológicas de poco grosor o cambiar las propiedades ópticas de los tejidos mediante su aclarado.

Las secciones histológicas proporcionan una información bidimensional de una estructura que es tridimensional. Hay una regla en histología que nos dice que cuanto a más aumentos queremos observar una preparación, más delgada ha de ser la sección. La nitidez aumenta en las secciones delgadas porque la luz ha de atravesar menor cantidad de tejido. Así, hay aparatos para hacer cortes gruesos ( $\geq 30\text{-}50\ \mu\text{m}$ ), cortes finos ( $2\text{-}10\ \mu\text{m}$ ) y semifinos ( $\leq 1\ \mu\text{m}$ ). Actualmente existen las técnicas y programas informáticos que son capaces de reconstruir estructuras tridimensionales a partir de secciones. Este proceso es tedioso y consume mucho tiempo, pero se ha aplicado con éxito en diversos estudios. Sin embargo, se necesita de una infraestructura cara y compleja que impide su adopción por laboratorios no especializados. También

se pueden observar muestras relativamente gruesas con los microscopios multifotón, los cuales pueden conseguir imágenes nítidas a cientos de micras de profundidad. Aún así, a veces es necesario estudiar tridimensionalmente muestras más gruesas.

El aclarado de los tejidos es un procedimiento para cambiar las propiedades ópticas del tejido que nos permite observar nítidamente estructuras en zonas profundas de muestras gruesas. Su principal efecto es reducir la dispersión y la absorción de la luz por el tejido. En general el proceso consiste en eliminar lípidos, pigmentos y otras sustancias que dificulten el paso de la luz, y sustituir el agua por un medio con un índice de refracción homogéneo en toda la muestra, de modo que haya menos dispersión luminosa. Con técnicas de aclarado es posible observar estructuras tisulares en muestras muy gruesas. Estas técnicas se usan cuando se necesitan observar muestras de varios mm o incluso cm de grosor.

El proceso general que ha de seguir el tejido es fijación, permeabilización, decoloración de estructuras pigmentadas, homogeneizar el índice de refracción. La fijación es esencial y debe ser más fuerte puesto que el tejido será sometido a un estrés químico mayor. Se pueden usar los fijadores paraformaldehído, glutaraldehído y derivados de la acrilamida. La permeabilización es necesaria para que penetren en la muestra las moléculas o sustancias con las que queremos tratar la muestra, por ejemplo anticuerpos, y también para que difundan aquellas sustancias que homogeneizarán el índice de refracción. Permeabilizantes pueden ser solventes orgánicos, sustancias que eliminan los lípidos o sustancias hiperhidratadas. La decoloración se lleva a cabo con sustancias específicas según nuestro tejido. La homogeneización del índice de refracción es el último paso que conlleva el uso de solventes aromáticos, reactivos hidrofílicos o de contraste.

De todas formas es inevitable que cualquier tratamiento incluirá modificaciones, como retracciones o expansiones del tejido. Es interesante eliminar todo aquello que no necesitamos de la muestra para hacer la muestra lo más pequeña posible. Además, el aclarado debe eliminar la autofluorescencia en el caso de que necesitamos estudiar señales flu-



orescentes.

Los protocolos de aclarado se pueden dividir según las sustancias que empleen: solventes orgánicos, hidro-gel y hidrofílicos. Dentro de estas categorías hay una gran variedad de protocolos, cada uno con sus ventajas e inconvenientes. Hay que seleccionar aquel que mejor se adapte a las necesidades del experimento.

**Solventes orgánicos.** Para usar esta técnica es necesaria una buena fijación, los aldehídos suelen ser buenos fijadores. Con los solventes orgánicos se alcanza una excelente transparencia. Una ventaja adicional es que, tras la observación, pueden ser eliminados y realizar otros protocolos sobre las muestras. Sin embargo, no hay protocolos de aclarado que sean universales y hay que adaptarlos para cada tipo de tejido. Tienen también inconvenientes. Así, pueden afectar a propiedades moleculares tales como la antigenicidad, eliminan la fluorescencia, y cambian la morfología celular etc. También pueden producir fuertes retracciones de los tejidos que afectan a la organización tridimensional de la muestra. Además, las sustancias usadas pueden dañar los objetivos del microscopio si no están adaptados.

**Hidrogeles.** Se utilizan en protocolos que tratan de evitar la pérdida de moléculas de los tejidos mediante la unión de estas moléculas a estructuras mixtas de gel y tejido. Estos geles suelen contener monómeros de acrilamida disueltos a 4°C. La solución puede contener glutaraldehído y formaldehído, se puede decolorar, polimerizar la acrilamida y eliminar los lípidos.

**Hidrofílicos.** Son protocolos que usan sustancias disueltas en agua. Estas técnicas se pueden dividir en 2 grupos, aquellas que siguen una simple inmersión, y aquellas que requieren de eliminación de lípidos y/o una hidratación. En las inmersiones simples las muestras se sumergen en soluciones con un alto índice de refracción y se convierten en transparentes gradualmente. Sin embargo, los lípidos son la principal fuente de refracción de la luz, por lo que es interesante eliminarlos. Así, los métodos que incluyen eliminación de lípidos dan mejores resultados del aclarado.

Existen otros métodos para estudiar muestras de gran tamaño, incluso organismos completos, como son la tomografía computacional, la resonancia magnética, y la tomografía de emisión de positrones. Estas técnicas no son invasivas, incluso pueden hacerse con el individuo vivo, pero carecen de la resolución suficiente para hacer estudios a nivel de células individuales.

#### Bibliografía

Tian T, Yang Z, Li X. 2021. Tissue clearing technique: Recent progress and biomedical applications. *Journal of anatomy*. 238: 489 - 507.

Weiss KR, Voigt FF, Shepherd DP, Huisken J. 2021. Tutorial: practical considerations for tissue clearing and imaging. *Nature protocols*. 16: 2732-2748.

## 6 Estereología

En biología, y en otras ciencias, es importante obtener datos cuantitativos, y que esos datos sean fiables. Los datos cuantitativos no sesgados son fundamentales en ciencia. El sesgo es la alteración de los valores reales debido a la experimentación: muestreo, procesamiento de muestras, detección, método de cálculo, etcétera. La estereología es un conjunto de métodos experimentales que permiten estimar el área, el volumen, la superficie, la longitud y el número de elementos de estructuras biológicas tridimensionales mediante el estudio de secciones obtenidas de dichas estructuras, y todo ello sin introducir ningún sesgo en los resultados. Por ejemplo, se puede estimar el número de neuronas del cerebro o de una región del cerebro, el volumen de un tumor, la superficie de los conductos respiratorios, o la longitud de la red capilar en un órgano. Siguiendo el procedimiento estereológico se evita el sesgo en los resultados numéricos finales.

La metodología estereológica se basa en un diseño a priori del procedimiento a emplear para realizar la cuantificación, sin hacer ninguna asunción sobre las características del objeto sobre el que se realizará dicha cuantificación. Es decir, se puede aplicar a cualquier objeto tridimensional sin necesidad de saber cómo es con antelación. De manera que el método es independiente del tamaño del objeto o de su forma. Si el diseño del experimento es correcto se obtienen datos no sesgados, lo que significa que no hay variaciones en el resultado introducidas por el experimentador o por el propio método. Es una metodología eficiente, y con poco esfuerzo de muestreo se consiguen datos más precisos. El proceso de muestreo de la estructura es sistemático y aleatorio, es decir, todos los elementos de interés tendrán la misma probabilidad de ser contados.

Un concepto importante en estereología son las sondas ("probes"). Éstas son plantillas con formas geométricas virtuales que interaccionan con nuestros elementos de interés presentes en las secciones. Cada evento, o interacción de una forma geométrica con un elemento de interés, se transforma en un valor de número, longitud, área o volumen.

### Volumen

Vamos a ver un ejemplo: estimación del volumen de un objeto.

Tradicionalmente el volumen de un objeto irregular se ha estimado por inmersión en agua, y el volumen de agua desplazado es el volumen del objeto. Sin embargo, no sirve para objetos con cavidades internas o para objetos que están dentro de otros objetos. También se han estimado volúmenes por aproximación a una forma geométrica como una esfera, una elipse, un cuadrado, etcétera. De nuevo, el valor obtenido será cierto dependiendo de lo que se parezca el objeto a una forma geométrica determinada. El método empleado en estereología para estimar el volumen de cualquier objeto, independientemente de su forma y a partir de secciones obtenidas de dicho objeto, fue descrito por Cavalieri en 1635. Este método consiste en la obtención de secciones uniformes, paralelas, y aleatorias a lo largo del objeto. Se basa en la idea de que cualquier objeto puede estar representado por infinitas secciones consecutivas y no hay que hacer ninguna asunción previa, es decir, se puede aplicar a cualquier objeto tridimensional independientemente de su forma o de si tiene oquedades.

Supongamos que queremos estimar el volumen de un órgano con superficie irregular como el que se aparece en la figura 17, y que tiene dos oquedades internas (no mostradas en la figura 17). Lo vamos a hacer a partir de secciones de parafina de unas 10 micrómetros de grosor. Tenemos que tener en cuenta que las técnicas usadas, por ejemplo, la inclusión en parafina, pueden introducir retracciones en los tejidos que disminuyan el volumen real del órgano. Esto es muy importante a la hora de dar el resultado final y tendremos que saber el grado de retracción. Pero, supongamos que en este caso no hay retracción introducida por la técnica.

Lo primero que hay que hacer es conseguir un plano de corte, la orientación de nuestras secciones, sea al azar, por lo que rotaremos nuestro objeto de forma aleatoria antes de hacer el primer corte. Una vez establecida la orientación del plano de corte podemos establecer un eje imaginario perpendicular a nuestro plano de corte y que atravesase al objeto completamente (Figura 18). Dividimos la longitud del objeto

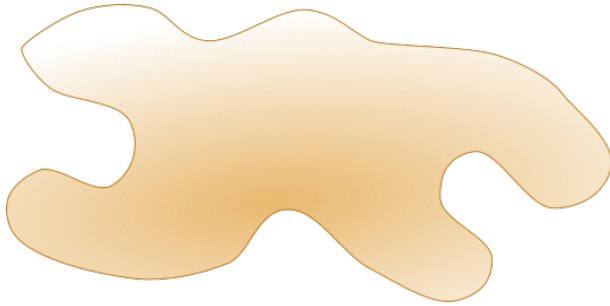


Figura 17. Objeto al que se le estimará el volumen.

a lo largo de dicho eje en 8 segmentos de igual longitud que vamos a llamar intervalos (T).

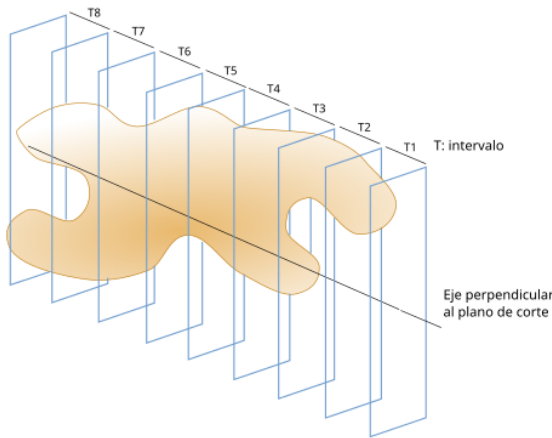


Figura 18. Eje de corte y establecimiento de los intervalos.

A continuación, en el intervalo T1, elegimos un número al azar. Por ejemplo, si T1 mide 100 micrómetros, un número aleatorio entre 1 y 100, y cortamos con una cuchilla por ese punto perpendicularmente al eje. Pero si hemos cortado completamente el objeto en secciones de parafina pues elegimos una de las secciones que componen el intervalo T1 al azar. Por ejemplo, si T1 está formado por 10 secciones de 10 micrómetros de grosor, nos puede salir como aleatoria, entre la 1 y la 10, la sección número 6 (Figura 19). En T2, escogeríamos el plano de corte o la sección que estuviera a una distancia T de la escogida en T1. Es decir a 100 micrómetros de distancia, o la sección número 16, que está a 10 secciones de distancia.

Por tanto, una vez elegida la primera sección al azar seleccionamos la segunda sección que se encuentra a una distancia T (en este caso 100 micrómetros), y

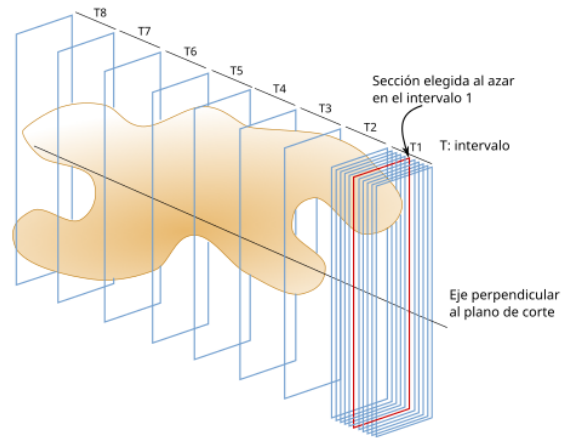


Figura 19. Selección de una sección al azar en el intervalo T1.

luego una tercera que se encuentra a una distancia  $2 \cdot T$  de la primera, y así sucesivamente (Figuras 20 y 21).

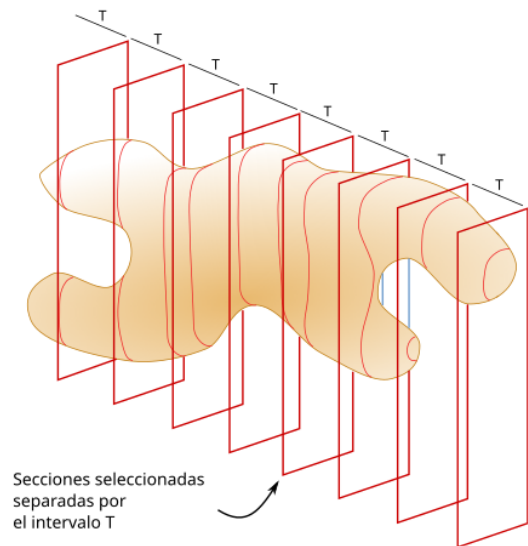


Figura 20. Secciones seleccionadas a partir de la primera selección al azar en T1 (ver Figura 3) y separadas por el intervalo T.

Una vez que tenemos nuestras secciones, con sus perfiles respectivos (Figura 5), hay que calcular la superficie de cada sección. Para calcular una superficie se puede usar el método de recuento de puntos. Este método consiste en usar una rejilla virtual con puntos, en la que cada punto lleva asociada la misma área (Figura 22). Dicha rejilla se superpone rotada

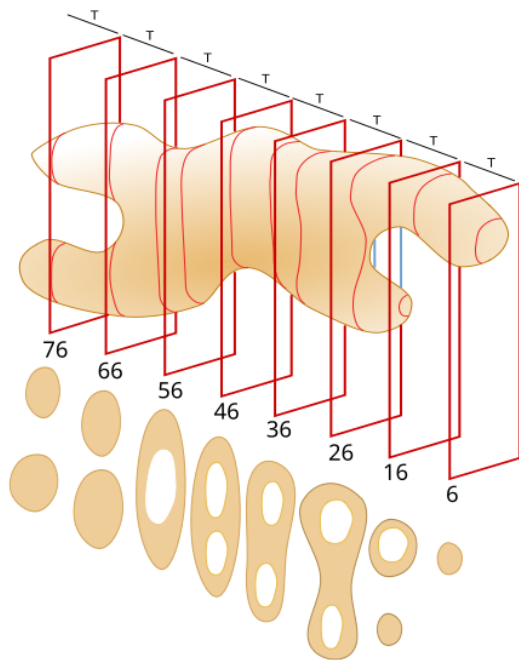


Figura 21. Perfiles de las secciones ya cortadas. Los espacios blancos son huecos.

al azar sobre el perfil de cada sección y se cuenta el número de puntos que se solapan con la superficie de la sección. La densidad de la rejilla se adapta para que se cuenten unos 100 a 200 puntos totales, es decir, cuando se suman los puntos contados en todas las secciones.

El área de una sección sería el sumatorio de todos los puntos ( $\Sigma p$ ) que se solapan con dicha sección multiplicado por el área asociada a cada punto ( $a(p)$ ). En el ejemplo de la figura 6 sería  $\text{Área}_{56} = 13p \cdot a(p)$ .

Para cualquier sección:  $A_i = \Sigma p \cdot a(p)$

$A_i$  = área de la sección  $i$ ;  $\Sigma p$  = número de puntos que se cuentan;  $a(p)$  = área asociada a cada punto.

La estimación del volumen de nuestro objeto que hay entre las dos primeras secciones consecutivas (secciones 6 y 16) sería el área de la sección 6 multiplicada por el intervalo  $T_1$ .

$$V_1 = A_6 \cdot T_1$$

$V_1$  = volumen entre la sección 6 y 16;  $A_6$  = área de la sección 6;  $T_1$  = intervalo entre las secciones 6 y 16.

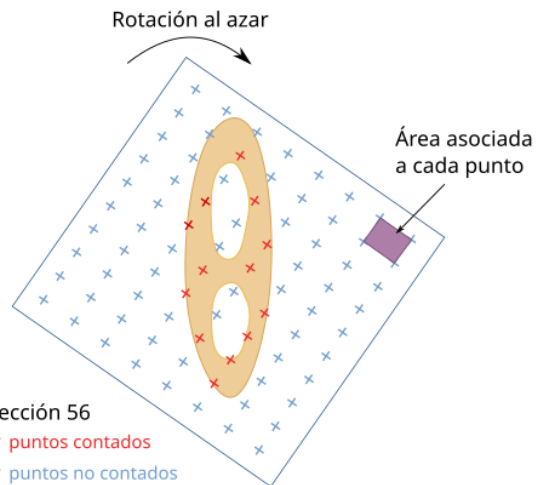


Figura 22. Superposición entre la plantilla virtual de puntos (un punto es la intersección de los dos brazos de cada cruz. ) y la sección 56 (Figura 5). La plantilla se ha girado al azar y se cuentan los puntos que se solapan con nuestra estructura. Nótese que nuestro objeto está hueco y que dicho espacio vacío no se cuenta. Cada punto lleva un área asociada que depende de nuestra plantilla, y que debe ser un valor real en nuestra sección. Así que hay que tener cuidado con las escalas, los objetivos usados y los aumentos del microscopio.

El volumen total estimado de nuestro objeto o volumen de referencia ( $V_{ref}$ ) sería la suma de los volúmenes que hay entre cada par de secciones, multiplicado por el intervalo  $T$ .  $V_{ref} = A_6 \cdot T_1 + A_{16} \cdot T_2 + A_{26} \cdot T_3 + \dots$  Como todos los intervalos son iguales:

$$V_{ref} = \Sigma A_i \cdot T$$

$V_{ref}$  = volumen de referencia o volumen estimado de nuestro objeto;  $\Sigma A_i$  = sumatorio de todas las áreas de nuestras secciones;  $T$  = intervalo entre secciones.

En cuanto a las unidades, el área asociada a cada punto se mide en micrómetros cuadrados, el número de puntos no tiene unidad y el intervalo  $T$  se mide en micrómetros de distancia, por lo que al multiplicarlos nos da micrómetros cúbicos, que sería la unidad de volumen.

### Bibliografía

Mouton PR. (2002). Principles and practice of un-

biased stereology. An introduction for bioscientists.  
The John Hopkins University Press. London.

Stereology Information Center.  
<https://www.stereology.info/>