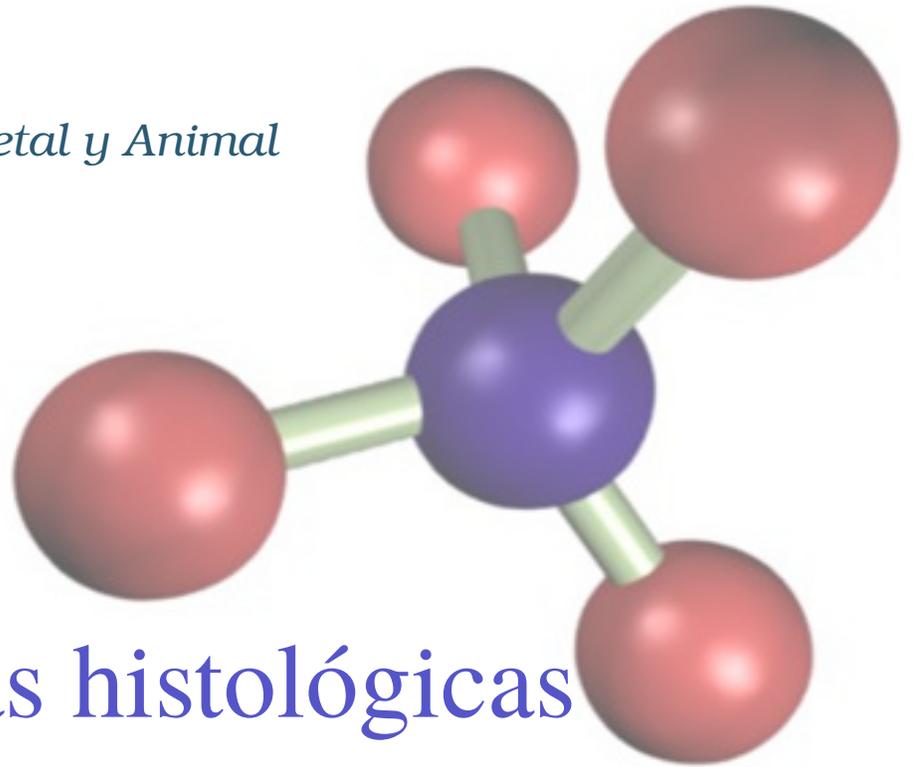
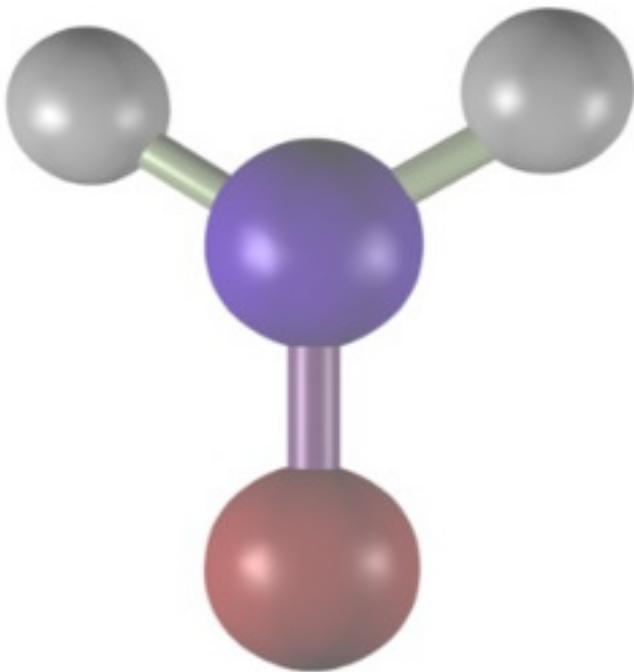


Atlas de Histología Vegetal y Animal



Técnicas histológicas

FIJACIÓN



Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Julio 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 \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1	Introducción	1
2	El proceso histológico	2
3	Fijación	5
4	Métodos de fijación	7
5	Fijadores	11

1 Introducción

En estas páginas dedicadas a las técnicas histológicas vamos a describir los procedimientos experimentales necesarios para obtener secciones teñidas y listas para observar al microscopio partiendo de tejidos vivos extraídos de un animal o de una planta. Por tanto, dedicaremos espacios a la obtención, fijación, inclusión, corte, tinción y observación de los tejidos. Todos estos apartados seguirán el mismo esquema que los capítulos dedicados a los tejidos o a la célula, partir de un esquema básico y ampliar la información sucesivamente en páginas adicionales. No dedicaremos demasiado espacio a los instrumentos desde el punto de vista operativo, pero sí a la conveniencia de su uso y a sus capacidades. Además, se incluye un apartado de protocolos y recetas donde se incorporan los tiempos, productos y manera de proceder para llevar a cabo las tinciones más comunes y cómo preparar sus reactivos. También se han añadido algunos vídeos explicativos

La mayoría de las técnicas histológicas van encaminadas a preparar el tejido para su observación con el microscopio, bien sea éste óptico o electrónico. Ello es debido a dos razones: a) que la composición de los tejidos, salvo contadas ocasiones, no tienen contraste ni colores que permitan diferenciar sus estructuras de una manera clara y b) que la mayoría de las estructuras tisulares y celulares no se pueden discriminar a simple vista sino con la ayuda de los microscopios. Por ello hay que procesar las muestras, primero para que no se deterioren y después para resaltar sus estructuras y poder estudiarlas en detalle.

Existen procedimientos rápidos y simples para la observación de tejidos y células vivas que reciben el nombre de vitales. Los intravitales permiten la observación dentro del cuerpo. Por ejemplo, la observación del flujo sanguíneo en capilares del sistema circulatorio. Otra forma de observar células o tejidos vivos es mediante las técnicas histológicas supravitales, en las que las células y los tejidos se mantienen o se hacen crecer fuera del organismo, como es el caso de los cultivos de células y de tejidos *in vitro*.

Las técnicas histológicas postvitales son aquellas en las que las células mueren durante el proceso, pero las características morfológicas y moleculares que poseían

en estado vivo se conservan lo mejor posible, lo que depende del tipo de técnica empleada. Estas páginas estarán dedicadas a este tipo de técnicas, puesto que son las más comúnmente usadas en los laboratorios de histología.

El objetivo de toda técnica histológica es observar y estudiar la estructura general o detallada de los diferentes componentes tisulares. Estas características observadas deberían ser iguales a las que poseían los tejidos en su estado vivo. Aunque las técnicas histológicas actuales están diseñadas para disminuir al máximo las alteraciones de las características de los tejidos durante su aplicación, todas las técnicas introducen modificaciones más o menos importantes que pueden afectar de manera diferencial a diferentes componentes tisulares. Estas alteraciones se llaman artefactos y tenemos que tenerlos en cuenta a la hora de interpretar lo que observamos en el microscopio.

A lo largo de la historia de la ciencia se ha puesto a punto una gran variedad de técnicas histológicas. Algunas de ellas son generales y se utilizan para una evaluación global de las muestras, mientras que otras son más específicas y permiten la identificación y estudio de estructuras determinadas. Algo a tener en cuenta es que la selección de la técnica y sus variantes depende básicamente del tejido que queramos observar y de lo que queramos estudiar en él. Por ejemplo, no es lo mismo estudiar un tejido animal que uno vegetal, o trabajar con tejido óseo que con tejido nervioso. En las siguientes páginas vamos a presentar las técnicas más generales usadas comúnmente en los laboratorios de histología.

2 El proceso histológico

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. Hay diversos caminos para estudiar los tejidos, es decir, diversas series de técnicas que se utilizarán dependiendo de qué característica deseamos observar. En el siguiente esquema (Figura 1) se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados durante el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "caminos" y su elección dependerá del resultado final que queramos obtener.

El proceso histológico comienza con la obtención del tejido objeto de estudio. En el caso de los tejidos vegetales directamente se toman muestras de los distintos órganos que componen el cuerpo de la planta, mientras que para los tejidos animales podemos optar por dos opciones: coger una porción del tejido u órgano y procesarla o procesar primero el animal completo y luego extraer la muestra que nos interese. En cualquier caso las muestras son habitualmente fijadas. Fijar un tejido es como hacer una fotografía de dicho tejido, se lleva a cabo para mantener las estructuras celulares y moleculares inalterables durante el procesamiento posterior y con una organización lo más parecida posible a como se encontraban en la muestra viva. La fijación más habitual se lleva a cabo con unas soluciones líquidas denominadas fijadores. También podemos fijar las moléculas de los tejidos por congelación rápida. La fijación por congelación se emplea cuando la fijación química o los procesos histológicos posteriores alteran las características de la muestra que queremos estudiar, por ejemplo una molécula sensible a dichos tratamientos.

Tras la fijación es habitual incluir el tejido para posteriormente obtener secciones. Cuanto más delgada queramos que sea nuestra sección más tenemos que endurecer nuestra muestra. Esto se consigue embebiendo el tejido con sustancias líquidas que posteriormente polimerizarán (resinas) o se volverán consistentes (ceras). También se puede conseguir el mismo efecto mediante congelación rápida. Cortes

más gruesos de 40 μm se pueden cortar sin necesidad de inclusión usando el vibratomo o microtomos de congelación. Los medios de inclusión no son normalmente hidrosolubles por lo que tendremos que sustituir el agua de los tejidos por solventes orgánicos liposolubles y posteriormente sustituirlos por el medio de inclusión.

Para el caso de algunas muestras es necesario hacer un tratamiento previo a la fijación. Por ejemplo, el tejido óseo contiene minerales que dificultan su procesamiento. En este caso se suele someter a un proceso de descalcificación, tras el cual se prosigue con la inclusión de las muestras.

Tras la inclusión o la congelación se procede a cortar los tejidos, es decir, obtener secciones. Existen diferentes aparatos de corte que permiten conseguir secciones de distinto grosor: ultrafinas (del orden de nm), semifinas (de 0.5 a 2 μm), finas (entre unas 3 y 10 μm) y gruesas (mayores a 10 μm). Habitualmente las secciones se procesan para poder observarlas y estudiarlas, aunque ciertos tipos de microscopía, por ejemplo con contraste de fase, permiten observar secciones de tejidos sin procesar. Normalmente las secciones se tiñen con colorantes que son hidrosolubles, por lo que hay que eliminar el medio de inclusión para que los colorantes pueden unirse al tejido. Las secciones ultrafinas (observadas con el microscopio electrónico) o semifinas (observadas con el microscopio óptico) se pueden contrastar con metales pesados o con colorantes, respectivamente, sin necesidad de eliminar el medio de inclusión. Las secciones obtenidas a partir de muestras congeladas se puede procesar u observar una vez llevadas a temperatura ambiente.

Los tejidos procesados se observan con los microscopios. Existen dos tipos básicos de microscopios: óptico y electrónico. Los primeros ofrecen una gran versatilidad en cuanto a modos de observar los tejidos: campo claro, contraste de fase, polarización o contraste de interferencia diferencial, mientras que los segundos permiten un gran poder de resolución, pudiéndose observar características ultraestructurales como membranas celulares o incluso complejos moleculares.

Como dijimos al comienzo existen múltiples varia-

ciones sobre este esquema general de procesamiento histológico. Por ejemplo, se pueden observar tejidos con el microscopio electrónico de barrido sin necesidad de incluir ni cortar, pero sólo observaremos superficies. Si queremos cuantificar nuestros resultados, por ejemplo, número de células de una estructura, tendremos que hacer un muestreo sistemático y aleatorio de la muestra, según los principios de la estereología. Ello requerirá unas condiciones previas para que cada célula tenga la misma probabilidad de ser observada. De igual modo, si queremos observar muestras gruesas o muy gruesas puede ser buena idea someter a esas muestras a un proceso de aclarado antes de su observación. En las siguientes páginas veremos con cierto detalle algunas de las técnicas más empleadas para la observación de los tejidos.

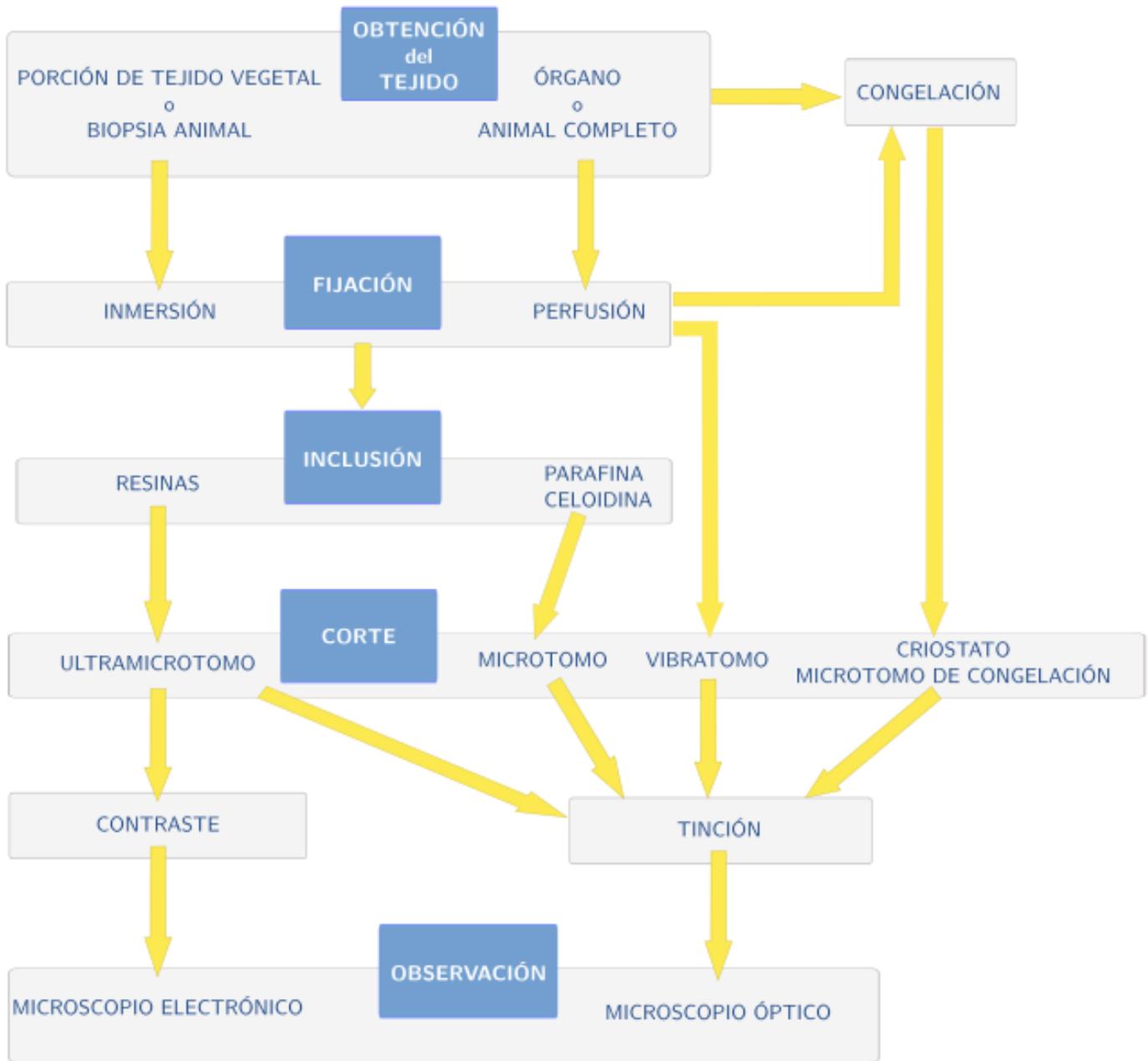


Figura 1: Esquema del proceso histológico.

3 Fijación

Todos los tejidos, bien cuando se extraen de un organismo, o bien cuando muere el organismo en el que están, sufren dos tipos de procesos degradativos: autólisis por acción de enzimas intracelulares, es decir, autodigestión, y putrefacción por acción bacteriana. Además, el procesamiento histológico posterior del tejido para poner de manifiesto y observar determinadas estructuras supone una metodología que puede degradar o alterar las estructuras tisulares. Fijar un tejido es preservar sus características morfológicas y moleculares lo más parecidas posible a las que poseía en su estado vivo. O dicho de otra manera, la fijación disminuyen los cambios en los tejidos desde que se obtienen hasta que se observan, tanto en organización estructural como en composición química. Es como hacer una fotografía del tejido vivo para poder observarla, tras algún tratamiento, con el microscopio. Una buena fijación es importante porque de ello depende una interpretación correcta la observación tisular. Puede ser la diferencia entre un buen y un mal diagnóstico de una patología, basado en diferencias en la organización del tejido o en las características de los núcleos de las células.

La fijación mata a las células y debe evitar la autólisis, proteger a los tejidos frente a ataques bacterianos, insolubilizar elementos solubles que se quieren estudiar, y evitar distorsiones y retracciones tisulares que afecten al volumen o a la morfología. Además, debe preparar al tejido para poder llevar a cabo técnicas específicas posteriores, si es necesario, y mantener las características del tejido en procesos histológicos como las inclusiones. Además, la fijación endurece las muestras, con lo que tejidos muy blandos pueden ser cortados más fácilmente, hace las células resistentes al daño y deformaciones por soluciones hipo e hiperosmóticas, previene la putrefacción de los tejidos, y reduce el riesgo de ataque por patógenos de los tejidos fijados.

Hay fijadores físicos, que son calor o congelación, y químicos, que son aquellos que forman enlaces químicos con moléculas del tejido. Cada uno tiene sus ventajas e inconvenientes. Los más usados hoy en día para microscopía óptica y electrónica son los

fijadores químicos.

El método ideal de fijación química es por perfusión. Para ello se introduce el fijador a través del sistema vascular, asegurando de esta manera que todas las células del órgano perfundido reciben el fijador casi instantáneamente y al mismo tiempo. Obviamente esto se puede hacer en animales de experimentación. Sin embargo, para biopsias o para plantas el método de fijación es la inmersión, es decir, sumergir la muestra en el fijador, el cual llegará a todas las partes de la muestra por difusión.

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. Incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. La elección depende de las características fijadoras que necesitamos, tanto por el tipo de tejido como por la técnica posterior a la fijación que queramos aplicar. Por ejemplo, si queremos estudiar actividades enzimáticas debemos usar un fijador que no nos altere el centro activo de las enzimas en las que estamos interesados, y quizá para ello tengamos que sacrificar en cierta medida la morfología tisular. La mayoría de los fijadores no preservan los lípidos, los cuales permanecerán en el tejido mientras no usemos disolventes. Así, si queremos estudiar la ultraestructura celular debemos usar fijadores que fijen los lípidos y que por tanto protejan a las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, que conlleva el uso de solventes orgánicos. Asimismo, la mayoría de los fijadores no fijan los carbohidratos pero éstos permanecen en el tejido porque están unidos a las proteínas. Por otra parte, si queremos teñir un determinado componente celular con muy poca afinidad por los colorantes quizá debamos usar un fijador que lo modifique para que sea reconocido más fácilmente por los colorantes.

En cualquier caso hay características de los fijadores químicos que tenemos que tener en cuenta antes de su uso:

Velocidad de penetración. El proceso de fijación ha de ser rápido y la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es un factor determinante. En la fijación por inmersión este parámetro condiciona el tamaño de la pieza que queramos fijar, más pequeña cuanto menor sea la velocidad de difusión del fijador

empleado. También determina el tiempo de fijación, mayor cuanto menor tiempo de difusión.

Velocidad de fijación. Esta característica no dependen de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador. Téngase en cuenta que la fijación es una reacción química.

Endurecimiento. Los fijadores generalmente endurecen los tejidos, lo cual depende del tipo de fijador y del tiempo que el tejido haya estado expuesto a él.

Ósmosis y pH. Es indispensable evitar cambios de volumen en la células producidos por una osmolaridad del fijador diferente a la del tejido. Por tanto, en muchas ocasiones hay que equilibrar la osmolaridad de las soluciones fijadoras y la de los tejidos a fijar. No es necesario añadir sustancias complejas. Por ejemplo, para los tejidos de animales terrestres basta con añadir 0.9 % de cloruro sódico. Son sales que no afectan a la capacidad del fijador. Normalmente se suelen usar soluciones amortiguadoras que mantienen un pH semejante al del tejido e isoosmóticas con dicho tejido.

Temperatura. La fijación a temperaturas más altas que la temperatura ambiente suelen incrementar la velocidad de fijación del tejido, pero también acelerar la degradación del tejido que todavía no ha sido fijado.

Efecto mordiente. Algunas estructuras tisulares son difíciles de teñir puesto que tienen poca apetencia por los colorantes. Esta apetencia puede ser incrementada con un tratamiento previo. Algunos fijadores, además de fijar, modifican químicamente a ciertas estructuras celulares para que posteriormente puedan unirse a ellas los colorantes. Este tipo de modificación química se le denomina efecto mordiente.

Artefactos. Un artefacto es cualquier alteración introducida en el tejido consecuencia del proceso histológico. La fijación podría decirse que es el paso que más influye en el procesamiento histológico. Al contrario que la tinción o una pobre inclusión en parafina, la fijación es irreversible. Los procesos de fijación, dependiendo del fijador o del método de fijación, pueden acarrear alteraciones tisulares tales como variaciones morfológicas, cristalización de compuestos, desplaza-

miento de sustancias, etcétera. Estos cambios pueden producirse por las características del fijador o por un mal uso de éste. En cualquier caso deben tenerse en cuenta para no describir como características tisulares lo que es una alteración introducida durante la fijación. Una consecuencia frecuente son las retracciones o encogimientos de la muestra, lo cual se puede comprobar midiendo la muestra antes y después de la fijación. No debe asumirse que las posibles alteraciones afecten a todos los tejidos o estructuras por igual.

4 Métodos de fijación

Existen diferentes formas de fijar los tejidos dependiendo del tipo de fijador, de la estructura a fijar y de lo que queremos observar. Los métodos de fijación se pueden clasificar en dos tipos: físicos y químicos.

Físicos

Los fijadores físicos se basan bien en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de calor elevado. Se utilizan cuando los fijadores químicos alteran la estructuras que queremos observar, cuando necesitamos una fijación muy rápida, o cuando el tipo de tejido y la técnica que usaremos lo requieran.

La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares, puesto que no se verán alteradas por ninguna sustancia química. La congelación es conveniente que sea rápida puesto que así se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destruirían la estructura del tejido. Por ello es conveniente no usar piezas mayores a 2 mm para que no se retarde la congelación de las zonas centrales de la pieza. Una congelación rápida se consigue sumergiendo la pieza en isopentano (-170 °C) enfriado con nitrógeno líquido (-196 °C), o colocando la muestra sobre un metal, el cual se sumerge parcialmente en nitrógeno líquido, en mezclas de hielo seco y acetona (-70 °C) o incluso en helio líquido (-268 °C). Asimismo, cuando sea posible, es conveniente embeber la muestra en anticongelantes, también llamados crioprotectores. La crioprotección es siempre recomendable, aunque no siempre es posible. Normalmente se emplean como agentes crioprotectores al dimetilsulfóxido, el glicerol y la sacarosa, bien solos o mezclados en diferentes concentraciones. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que una vez que el tejido se haya cortado se vuelve a descongelar y hay que protegerlo de los procesos de degradación.

Existen variantes a la técnica de congelación como son la criodesecación o liofilización y la criosustitución. La criodesecación parte de tejido previamente congelado al que posteriormente se le sublima el hielo, es decir, el agua pasa de estado sólido a gaseoso sin pasar por estado líquido. Al eliminar el agua se

impide que se den reacciones químicas, por lo que, además de la fijación, este método preserva el tejido en el tiempo. La criosustitución también parte de tejido congelado pero en este caso se produce una sustitución lenta del hielo por una solución fijadora. Con ello se posibilita una fijación química sobre un material que no ha sufrido deterioro puesto que está congelado.

La fijación por calor no es frecuente en histología, puesto que produce deterioros de los tejidos. Su efecto es la coagulación de proteínas y disolución de lípidos. Sin embargo, se emplea para la observación de microorganismos, ya que preserva la forma de éstos y sirve para su identificación. Hoy en día, sin embargo, se suele emplear el calor como un complemento a la fijación química. Así, las muestras inmersas en un fijador se introducen en un microondas y se llevan hasta temperaturas de unos 55 °C. Esta temperatura no produce artefactos y tiene dos ventajas: incrementa la velocidad de fijación y reduce el tiempo fijación desde varias horas o días a decenas de minutos. El uso del microondas permite que el calor sea homogéneo en toda la muestra de forma inmediata (si se hiciera en un baño caliente habría un gradiente de calor en la muestra desde la parte externa a la más interna). Se cree que el incremento de la velocidad de fijación se debe sólo al calor generado y no al efecto directo de las microondas. Las microondas se pueden usar también para otros pasos del proceso histológico como la tinción.

Químicos

Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas del tejido, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación. Hay que considerar que los fijadores químicos afectan en mayor o menor medida al tejido, tanto física como químicamente. Los efectos físicos suelen ser retracciones o distensiones, y la mayoría endurecen el tejido. Hay dos métodos básicos de fijación con fijadores químicos: inmersión y perfusión. En cualquier caso el fijador debe llegar a todas las partes del tejido lo más rápidamente posible.

Inmersión

En el método de inmersión las piezas de tejido se sumergen en la solución fijadora (Figura 2). En algunos casos se necesitan fijar extensiones de sangre o cortes por congelación sin fijación previa. En estos casos siempre se fijan por inmersión en la sustancia fijadora. Cuando se fija por inmersión hay que tener en cuenta algunas precauciones.

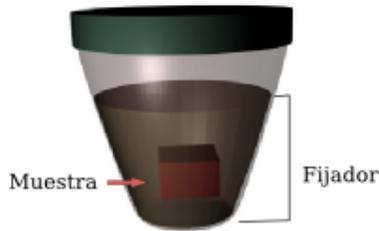


Figura 2: Fijación por inmersión.

1) Las piezas de tejido no deberían superar los 0.5 cm de espesor para que el fijador alcance el interior de la pieza antes de que ésta comience a deteriorarse. La velocidad de penetración del fijador depende de cada fijador y de las características del tejido. Esta velocidad nos condicionará el tamaño de la muestra. Para fijadores lentos se recomiendan piezas de 0.2 cm de tamaño. Esto también se ve afectado por el tipo de tejido. Por ejemplo, si es poroso o con grandes espacios la difusión del fijador será más rápida.

2) El volumen recomendado de fijador es de 10 a 20 veces superior al volumen de la pieza.

3) La osmolaridad del tejido y de la solución fijadora deben estar equilibradas.

4) El pH del fijador debe ser próximo al fisiológico.

5) El tiempo de fijación, para una mismo tipo de muestra, depende de cada tipo de fijador: velocidad de difusión y velocidad de fijación (la rapidez e intensidad con la que establece puentes o coagula proteínas). Debe ser suficiente para que la muestra quede bien fijada pero no excesivo para evitar deterioros o alteraciones del tejido. Una agitación suave durante la fijación ayuda a la penetración del fijador y disminuye el tiempo. En general no se recomiendan fijaciones mayores de 24 horas, excepto en algunos casos como el formaldehído, para el que se puede emplear una semana de fijación.

Perfusión

Por este procedimiento la solución fijadora se introduce a través del sistema circulatorio por el cual accede a todas las células del tejido gracias a la red de capilares (Figura 3). Mediante este método se puede fijar un animal completo introduciendo la solución fijadora a través del ventrículo izquierdo del corazón. El fijador llegará a todas las células irrigadas por el sistema circulatorio (circuito corporal) y bombeado por una bomba peristáltica. Si se quieren fijar los pulmones habría que introducir el fijador por el ventrículo derecho. También podemos fijar un único órgano en el caso de que podamos introducir la solución fijadora en la arteria principal que irriga dicho órgano (Figura 3). La perfusión no siempre es posible como en la mayoría de las biopsias o en los tejidos vegetales.

Antes de introducir el fijador en el sistema de vasos sanguíneos hay que eliminar previamente la sangre con una solución de lavado oxigenada, de otra manera su interacción con el fijador produce trombos que impedirían la fijación de determinadas zonas del animal o del órgano. Respecto a las precauciones mencionadas anteriormente en el método de inmersión debemos cuidar aquí también la osmolaridad, el pH y el tiempo de fijación.

Este método de fijación por perfusión requiere conocer la presión a la que se va a introducir la solución fijadora en el animal o estructura, la cual debe ser similar a la que posee la presión sanguínea normal en estado vivo. La presión que ejercerá la solución fijadora se puede regular mediante bombas peristálticas (ver figura 4) o por gravedad, es decir, variando la altura a la cual se coloca la solución fijadora respecto a la del animal. Esto es importante porque una presión muy baja podría impedir que la solución fijadora alcanzara todas las partes de la estructura y una presión muy alta podría provocar roturas de los vasos sanguíneos y de la propia estructura tisular.

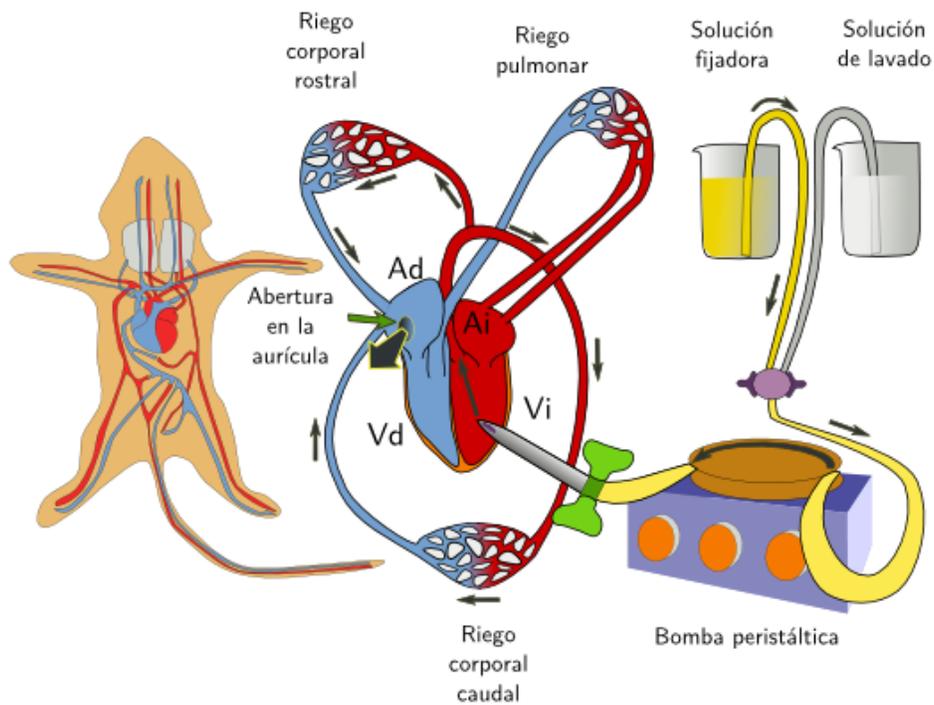


Figura 3: Fijación por perfusión de un organismo completo. Mediante este tipo de perfusión se introduce la solución fijadora en el sistema sanguíneo. La bomba peristáltica aporta la presión suficiente para permitir al fijador entrar a través del ventrículo izquierdo (Vi) y pasar a la aorta, desde la cual se distribuye por todo el cuerpo (excepto por el circuito pulmonar). Tras pasar por la red capilar la solución fijadora pasa a los vasos venosos que terminan por verter su contenido en la aurícula derecha (Ad). A esta cavidad hay que hacerle una abertura para que la solución fijadora, una vez realizada su función, salga del circuito. Ai: aurícula izquierda; Vd: ventrículo derecho.

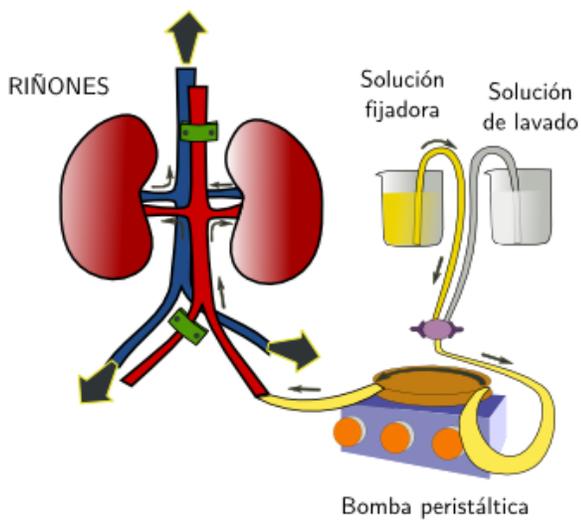


Figura 4: Fijación por perfusión de un órgano. Mediante perfusión se consigue que la solución fijadora llegue a todas las células del órgano a través del sistema sanguíneo. Mediante una bomba peristáltica se introduce la solución fijadora a través de la arteria que irriga el órgano. Se obturan todos aquellos vasos arteriales que no conducen al órgano.

5 Fijadores

Existen multitud de fijadores en los manuales de técnicas histológicas. Aquí sólo trataremos aquellos que consideramos de uso más común para la observación de tejidos al microscopio, es decir, aquellos que mejor preserven la estructura celular. Los fijadores químicos son los más frecuentemente empleados, bien compuestos por un solo tipo de sustancia fijadora o con mezclas de varias de ellas.

Los fijadores se pueden clasificar en dos grandes grupos según su acción sobre el tejido: los coagulantes y los que establecen enlaces cruzados. Los primeros, al extraer agua de los tejidos producen coagulación y desnaturalización de las proteínas, sobre todo las de la matriz extracelular, mientras que los segundos establecen enlaces químicos entre moléculas del tejido. Los fijadores que tienen como base al alcohol son desnaturalizantes, tales como el Bouin o el Carnoy, mientras que el formaldehído o el glutaraldehído establecen enlaces. También se preparan soluciones mixtas de ambos tipos de fijadores.

Otra clasificación de los fijadores es según sean aditivos o no aditivos. Los primeros tienen moléculas o iones que se combinan con las moléculas del tejido y formarán parte de él en los pasos sucesivos del procesamiento. Estos son sobre todo los que establecen enlaces y algunos coaguladores. Los no aditivos son aquellos que tras llevar a cabo su función son eliminados en pasos posteriores, como es el caso del alcohol o el ácido acético.

¡Atención! La mayoría de las sustancias fijadoras son tóxicas por inhalación o por contacto, algunas de ellas cancerígenas. Hay que seguir las indicaciones de seguridad para su manejo y utilización.

Fijadores simples

Etanol, metanol, acetona. El etanol (Figura 5), metanol, acetona fijan por deshidratación y coagulación de las proteínas, sobre todo las citosólicas. Extraen los lípidos de los tejidos, pero no afectan a los carbohidratos. El metanol es mejor fijador que el etanol puesto que no causa tanto endurecimiento del tejido y aporta una mejor preservación. En general, son buenos fijadores de muestras de pequeño

tamaño, y preservan bien algunas proteínas como las enzimas, también glucógeno, y pigmentos. Se usan frecuentemente para para fijar las extensiones citológicas o secciones de criostato obtenidas de tejido no fijado. Debido a que deshidratan, a la vez que fijan, se pueden usar también como un conservante de las muestras. Tienen algunos inconvenientes como producir endurecimiento y la retracción de los tejidos, muy evidentes en bloques de tejido muy grandes. Carecen de efecto mordiente.

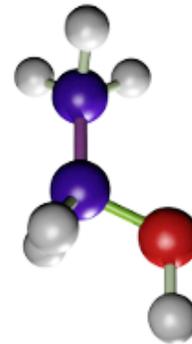
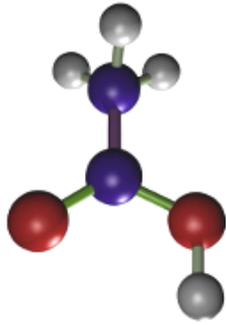


Figura 5: Etanol: CH₃-CH₂-OH

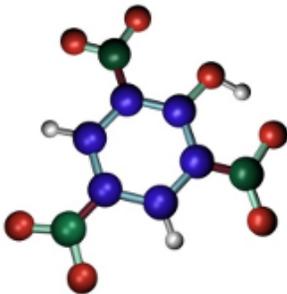
Ácido acético. El ácido acético (Figura 6) no fija directamente a las proteínas sino que su proceso de fijación consiste en cambiar el estado coloidal de las proteínas. Se utiliza a una concentración que varía entre el 1 y el 5 %. Es el fijador ideal para ácidos nucleicos y nucleoproteínas. Como inconvenientes cabe destacar la destrucción de las mitocondrias y mala fijación de membranas y citoplasma. Se suele usar en combinación con otros fijadores. Ejemplos: Bouin, FAA (formol, ácido acético y alcohol). En las mezclas de fijadores también es capaz de contrarrestar los artefactos que pueden introducir el etanol o el ácido pícrico.

Cloruro o sulfato de zinc. El cloruro de zinc se utilizó inicialmente como fijador único, pero más tarde pasó a ser un componente de mezclas fijadoras. Se emplea normalmente en combinación con el paraformaldehído. El cloruro de zinc ayuda a la fijación y preserva la antigenicidad si se necesita el tejido para pruebas inmunocitoquímicas, ya que contrarresta el enmascaramiento de antígenos que se atribuye al paraformaldehído. Las sales de zinc han sustituido progresivamente a las sales de mercurio us-

Figura 6: Ácido acético: CH_3COOH

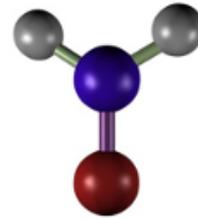
adas tradicionalmente en las mezclas fijadoras. Es importante señalar que el fijador no se prepara en sales de fostato, como es habitual, y tras la fijación ha de eliminarse el zinc mediante lavados en agua destilada.

Ácido pícrico. La fijación por ácido pícrico (Figura 7) se produce gracias a que las sales del tipo picrato coagulan las proteínas de los tejidos. Se suele usar del 2 al 15 % de una solución saturada de ácido pícrico. Preserva bien la estructura celular, no produce retracciones cuando el tiempo de fijación es óptimo, preserva bien glucógeno y lípidos. Es un buen fijador para tinciones generales puesto que tiene efecto mordiente y favorece la unión de algunos colorantes. Hay que eliminarlo completamente antes de proceder a la inclusión en ceras como la parafina puesto que dificulta la penetración de la parafina. Se suele usar combinado con otros fijadores. Ejemplos: Bouin.

Figura 7: Ácido pícrico: $\text{C}_6\text{H}_2\text{OH}(\text{NO}_2)_3$

Formaldehído. El formaldehído (Figura 8) es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es compatible con la mayoría de las técnicas y tinciones histológicas, incluidas las de in-

munocitoquímica e hibridación de ácidos ribonucleicos. El formaldehído se une a grupos funcionales de las proteínas formando grupos hemiacetales (Figura 9). Esta unión hace que muchos enzimas queden inactivas, lo que ayuda a evitar la degradación del tejido por las enzimas hidrolíticas. Los grupos a los que se une son amino, sulfidrilos, guanidilos, grupos hidroxilos alifáticos, etcétera. La unión a uno de estos grupos produce un grupo hidroximetileno. Es el hidroximetileno el que reacciona con grupos de otra, o de la misma proteína para la formación de puentes. El formaldehído preserva bien los lípidos, sobre todo si se añade a la solución fijadora iones de calcio (reducen la solubilidad de los fosfolípidos), y no reacciona con los carbohidratos.

Figura 8: Formaldehído: $\text{CH}_2=\text{O}$

La fijación normalmente es de 24 a 50 h, aunque puede ser de 1 a 2 semanas. Si el tejido va destinado a inmunohistoquímica es suficiente con 12-24 h a 4°C . Fijaciones muy prolongadas endurecen el tejido y pueden provocar inestabilidad de los ácidos nucleicos. Parte del fijador del tejido se puede eliminar mediante lavados prolongados. Normalmente se usa en solución tamponada e isotónica. Se utiliza a concentraciones próximas al 4 %. Actualmente se prepara a partir de paraformaldehído, sustancia sólida. Ejemplos: formaldehído tamponados, Bouin, FAA (formaldehído, ácido acético, alcohol), PLP (paraformaldehído, lisina, ácido peryódico).

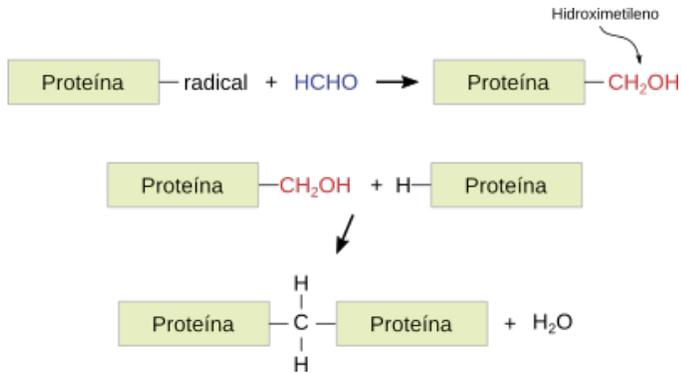


Figura 9: Enlaces entre proteínas formadas por el formaldehído.

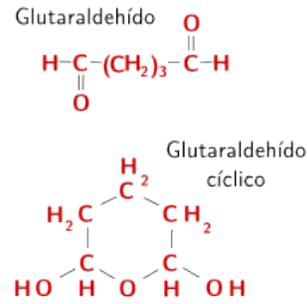


Figura 10: Glutaraldehído

Glutaraldehído. El glutaraldehído (Figura 10) es uno de los fijadores más usados. En solución polimeriza formando dímeros y trímeros. Los grupos aldehídos que quedan dentro en la molécula polimerizada reaccionan con los grupos aminos de los aminoácidos de las proteínas, formando puentes entre las moléculas de los tejidos. Los grupos aldehídos de los extremos, sin embargo, quedan libres, y es importante anularlos para evitar falsos positivos (por ejemplo, evitando que se unan los anticuerpos durante la inmunocitoquímica o que se unan los aldehídos del reactivo de Schiff). Por tanto, es una buena práctica eliminarlos, lo que se puede hacer mediante la incubación en borohidruro de sodio al 1 %. El glutaraldehído tiene poca velocidad de penetración, por lo que la fijación por perfusión vascular es recomendada. Se usa a una proporción de entre el 0,5 y el 3 %. Tiene una alta capacidad para preservar la estructura celular puesto que es capaz de entrelazar el tejido más fuertemente que otros aldehídos, por lo que es el fijador de referencia para observación de ultraestructuras celulares con el microscopio electrónico. Sin embargo, no se recomienda para inclusiones en parafina puesto que dificulta la obtención de secciones. Hay que tener cuidado con su baja penetración tisular y puede producir retracciones. Se usa en soluciones tamponadas isotónicas y normalmente en combinación con el formaldehído.

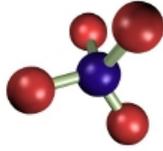
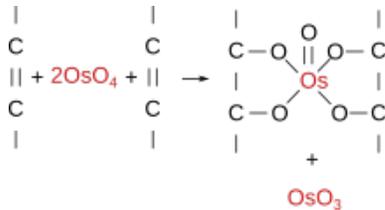
A lo largo de la historia de la histología se han usado otros tipos de aldehídos como fijadores, muchos de los cuales han dejado de usarse. Por ejemplo, el hidrato de cloral para el sistema nervioso, la acroleína,

muy tóxico y usado para microscopía electrónica, o el glioxal.

Tetróxido de osmio. El tetróxido de osmio (Figura 11) es uno de los fijadores más antiguos, se usa desde al menos 1865. En solución penetra poco en los bloques de tejido, y se recomiendan tamaños no mayores de 0.5 o 1 mm. Se puede usar tanto en solución como en vapor. No produce artefactos pero hace a las muestras de tejido frágiles. Forma puentes entre los enlaces insaturados de las cadenas de ácidos grasos de los lípidos de las membranas celulares (Figura 12). Las hace insolubles, oscuras y opaca a los electrones. Por eso se emplea habitualmente para las observaciones con el microscopio electrónico, ya que preserva y oscurece las membranas celulares. Pero también se usa en microscopía óptica para estudiar las grasas insaturadas, para observar los tractos de mielina, y es necesario para las impregnaciones argénticas como el método de Golgi. Por su fuerte carácter oxidante no se usa para tinciones convencionales puesto que impide la unión al tejido de los colorantes aniónicos. Actualmente se usa mucho tras la fijación de las muestras con formaldehído o glutaraldehído, y antes de deshidratar dichas muestras, para su observación al microscopio electrónico.

Mezclas fijadoras

La mayor parte de los procesos de fijación usan varias sustancias fijadoras, bien mezcladas en la solución acuosa inicial o utilizadas sucesivamente en el tiempo. Con ello se aprovechan las ventajas de cada una de ellas y se pueden contrarrestar sus desventajas. Hay multitud de formas de usar los diferentes fi-

Figura 11: Tetróxido de osmio. OsO₄.Figura 12: Enlaces producidos por el OsO₄ en los enlaces insaturados de los ácidos grasos.

jadores, tanto en sus componentes como en las proporciones de éstos, dependiendo de las necesidades posteriores, es decir, qué tipo de tejido queremos fijar y qué queremos ver de dicho tejido. Junto con las sustancias fijadoras también se añaden a las mezclas otros componentes que afectan a otros parámetros como la osmolaridad o el pH de la solución. Por ejemplo, en la mayoría de los casos las sustancias fijadoras se disuelven en soluciones tamponadas para controlar osmolaridad y pH, de manera que no se afecte a la estructura del tejido. Pero también con otros propósitos, como por ejemplo el etilén glicol que se añade a los fijadores para obtener secciones por congelación y además evita la difusión de las enzimas.

A continuación vamos a mencionar algunas combinaciones usadas frecuentemente porque tienen unas propiedades de fijación que las hace apropiadas para las observación de una gran variedad de tejidos y para el uso de diversas de técnicas de tinción.

Líquido de Bouin. La solución de Bouin está formada por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial. Es una solución muy utilizada para el procesamiento de tejidos que se incluirán en parafina (ver capítulo de inclusión) y a cuyas secciones se le pueden aplicar un amplio espectro de tinciones. Es muy útil para tejidos blandos y embriones, y preserva bien el núcleo y el glucógeno. Hay que tener cuidado con el

tiempo de fijación, que no debe exceder de 48 h en el caso de fijaciones por inmersión. Tras la fijación las muestras se pueden conservar en alcohol de 70°. No está recomendado para el riñón ni para el estudio de las mitocondrias. Antes de la inclusión en parafina es conveniente eliminar el ácido pícrico mediante lavados en alcohol de 70° porque impide una buena inclusión y hace que las tinciones no sean óptimas.

Solución de Clarke. Esta solución está compuesta por etanol y ácido acético glacial (3:1). Fue una de las primeras soluciones fijadoras usadas, buena para muestras que se incluirán en parafina.

Carnoy. El Carnoy es un buen fijador para el glucógeno, para los hidratos de carbono simples y para las proteínas fibrosas. Es bueno para visualizar los ácidos nucleicos, aunque no la morfología nuclear, y destaca los grumos de Nissl del sistema nervioso. Puede producir retracciones tisulares. Está formado por etanol absoluto, cloroformo y ácido acético glacial.

Mezclas con formaldehído. El formaldehído es quizá el fijador más usado hoy en día, tanto para técnicas histológicas comunes como para otras como la inmunocitoquímica o la hibridación de ácidos nucleicos. Lo más frecuente es utilizarlo en solución al 4 % junto con otros fijadores. Se suele disolver en soluciones tamponadas que tienen una osmolaridad similar a la del tejido que se pretende fijar. Para fijaciones de tejidos destinados a microscopía electrónica se suelen utilizar soluciones fijadoras que contienen formaldehído y glutaraldehído. La función del formaldehído es iniciar una fijación rápida, por su mayor capacidad de penetración, mientras que el glutaraldehído realizará una fijación más poderosa, pero más lenta que no afectará a la estructura tisular puesto que el formaldehído ya ha realizado una fijación previa. Ejemplos de soluciones con formaldehído son formaldehído tamponado con ácido pícrico, Bouin, FAA (formaldehído, ácido acético, etanol), PLP (paraformaldehído, lisina y ácido peryódico).

Glutaraldehído-tetróxido de osmio. Los fijadores en combinación no tienen necesariamente que usarse al mismo tiempo. Es habitual que los tejidos destinados a microscopía electrónica sean inicialmente fijados en glutaraldehído (1 al 3 %) y paraformaldehído (2 al 4 %), para posteriormente ser postfijados en tetróxido de osmio al 1 % en solución tamponada. Este último es un buen preservador de la ultraestructura celular, sobre todo de las membranas, en cooperación con los aldehídos. Esto es importante porque el proceso para microscopía electrónica supone incubar el tejido en solventes orgánicos y polimerización de resinas a 60 °C, durante las cuales el tejido debe ser preservado.