

Atlas de Histología Vegetal y Animal

Técnicas histológicas PROTOCOLOS

Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.
Fcaultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Diciembre 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	Portas adhesivos con gelatina	1
2	Limpieza de portaobjetos	2
3	Decalcificación	4
4	Inclusión en parafina	6
5	Azán de Heidenhain	8
6	Azul de toluidina (vegetal)	11
7	Azul de toluidina (animal)	14
8	Hematoxilina de Heidenhain	17
9	Hematoxilina y eosina	21
10	Hematoxilina, eosina, azul alción	24
11	Naranja de acridina	28
12	PAS - azul alción	30
13	PAS - hematoxilina	33
14	Safranina - azul alción o verde rápido	36
15	Safranina de Johansen - verde rápido	39
16	Tinción de Nissl	43
17	Tinción de Woelcke	46
18	Tricrómico de Gomori	48
19	Tricrómico de Masson	52

20 Tricrómico de van Gieson	55
21 Impregnación de Golgi en corte	58
22 Nitrato de plata	62
23 Gomori-argéntica	66
24 NADPH diaforasa	71

1 Portas adhesivos con gelatina

En experimentos largos, con numerosos pasos de incubación en diversas soluciones, es posible pérdida de la muestra. Para evitarlo se recubren los portaobjetos con sustancias adhesivas que mantienen las secciones adheridas. Entre las más baratas y fáciles de preparar está el recubrimiento de los portaobjetos con una solución de gelatina y alumbre de cromo y potasio.

Procedimiento

- 1) Añadir 200 ml de agua destilada en un vaso de precipitado y calentar hasta 60 °C en un agitador-calefactor. Agitar con un agitador magnético.
- 2) Añadir 1 g de gelatina y dejar disolver.
- 3) Añadir 0.1 g de alumbre de cromo y potasio y dejar disolver. La solución se tornará de un color azul pálido.
El alumbre de cromo y potasio recubrirá los portaobjetos con cargas positivas y atraerá a las secciones, las cuales tienen carga neta negativa.
- 4) Verter la solución en una cubeta previamente calentada a 60 °C.
- 5) Sumergir los portaobjetos de 3 a 5 veces durante 5 a 10 segundos cada vez.
- 6) Sacar los portaobjetos y dejar escurrir durante unos minutos sobre un papel de filtro. Se pueden dar unos pequeños golpes sobre el papel de filtro para que escurran mejor.
- 7) Colocar los portaobjetos en una estufa a 37 °C durante toda la noche para su secado.
- 8) Guardar los portaobjetos en una caja seca y libre de polvo hasta su uso.

Consejos

Los portaobjetos han de ser desengrasados previamente

La solución de gelatina/alumbre de cromo y potasio se puede almacenar a 4-8 °C durante varios días y usarse cuando se precise. Antes de cada uso, la solución ha de estar transparente, llevarse a temperatura ambiente y filtrarse. Tras ello se lleva a 60 °C y se sumergen los portaobjetos.

Se pueden añadir unas gotas de timol durante la preparación de la solución de la solución de gelatina/alumbre de cromo y potasio para preservarla durante más tiempo.

Cuando se van a tratar numerosos portaobjetos es recomendable calentarlos previamente para que la temperatura de la solución no disminuya durante el proceso.

Productos

Gelatina

Alumbre de cromo y potasio ($\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)

Agua destilada

Material

Portaobjetos

Agitador-calentador

Agitador magnético

Termómetro

Cestas para portaobjetos

Cubeta de cristal

Estufa

2 Limpieza de portaobjetos

Los portaobjetos son el soporte de las secciones y ambos, secciones y portaobjetos, pasarán por todas las soluciones y tratamientos de la técnica, cualquiera que ésta sea. Por tanto, antes de usar los portaobjetos, procuraremos que estén lo más limpios posible. En caso contrario podría darse una mala adhesión de los cortes o aparecer artefactos durante la técnica, tales como tinciones de fondo o precipitados causados por suciedad o por restos de materia orgánica que contengan dichos portaobjetos.

Normalmente los portaobjetos nuevos no necesitan tratamientos previos antes de ser usados, aunque hay que asegurarse de su limpieza. Los que tengan restos de suciedad o aquellos que sean reciclados de otras técnicas han de limpiarse. Procedimientos sencillos para conseguir portaobjetos limpios, y en general cualquier material de vidrio de laboratorio, son los siguientes:

Procedimiento

A) Tratamiento suave.

1) Sumergir los portaobjetos en etanol, acetona, o una mezcla de etanol-éter, durante más de 15 minutos.

2) Antes de usar, sacar los portaobjetos de la solución alcohólica y dejarlos secar al aire en un lugar libre de polvo y seco.

3) Una vez secos los portaobjetos se pueden usar o almacenar en cajas protegidas del polvo y la humedad.

B) Tratamiento medio.

1) Lavar los portaobjetos con agua y jabón o lavavajillas.

2) Aclarar en agua hasta que no haya restos de jabón.

3) Sumergir en ácido acético durante 15 minutos.

4) Enjuagar en agua destilada al menos 10 veces.

5) Comprobar que el pH final está próximo a 6-7, si no es así, seguir lavando.

6) Secar los portaobjetos en una estufa a 60 °C toda la noche.

7) Almacenar los portaobjetos en una caja libre de polvo y humedad hasta su uso.

C) Tratamiento agresivo (mezcla sulfo-crómica)

1) Preparar la mezcla sulfo-crómica. (1 parte de dicromato potásico, 2 partes de ácido sulfúrico, 7 partes de agua destilada).

2) Sumergir los portaobjetos al menos durante 24 horas.

3) Enjuagar los portaobjetos repetidas veces con agua destilada.

4) Dejar secar y usar, o almacenar en una caja seca y sin polvo.

Consejos

Los portaobjetos comerciales suelen venir suficientemente limpios y desengrasados para usarlos directamente. Una limpieza suave es suficiente. El criterio para asegurarse de su limpieza es que se mojen uniformemente en toda su superficie con agua destilada. La grasa y otros contaminantes impiden esta uniformidad.

Limpiar los portaobjetos lo más rápido posible tras su uso para evitar que las sustancias se desequen sobre el cristal y sean mucho más difícil de eliminar. Si no es posible la limpieza inmediata, mantener los portaobjetos en agua hasta su procesamiento.

Hay que evitar portaobjetos con las superficies dañadas o rayadas. Estas rayaduras se pueden evitar usando instrumentos de manipulación de madera o pinceles durante la técnica histológica y esponjas suaves para eliminar los restos sólidos de la superficie de los portaobjetos durante el proceso de lavado.

Si lo que se quiere reciclar son portaobjetos montados con medio de montaje y cubreobjetos, entonces hay que hacer un paso previo en xileno (puede ser xileno reciclado) durante toda la noche o varios días. De esta manera se disuelve el medio de montaje y se puede desprender el cubreobjetos.

No es buena idea que los ácidos entren en contacto con el portaobjetos antes de haber eliminado meticulosamente todo el jabón o detergente de su superficie. De otra manera se puede formar una fina película de grasa.

La grasa de los portaobjetos se elimina bien mediante la ebullición en una solución débil de carbonato

sódico.

Es importante que el aclarado elimine cualquier resto de detergente o agente usado en la limpieza puesto que podría interferir en las técnicas posteriores. Este aclarado se puede hacer con agua corriente o, si es necesario con agua destilada.

En el tratamiento con mezcla sulfo-crómica, la preparación de la mezcla se ha de hacer en campana de extracción de gases y preferiblemente en una bandeja con hielo, puesto que la reacción es exotérmica. Una vez terminado el tratamiento la mezcla se guarda en un recipiente de cristal bien cerrado para usos posteriores. El dicromato es muy corrosivo y cancerígeno.

En el tratamiento con mezcla sulfo-crómica, la mezcla se puede usar siempre que conserve el color rojizo, y desecharla cuando adquiera un color verdoso.

En el tratamiento con mezcla sulfo-crómica no desechar la solución por el fregadero. Hay que inactivarla químicamente.

Productos

a) Tratamiento suave

Etanol, acetona, éter

Agua destilada

b) Tratamiento medio

Jabón, lavavajillas

Ácido acético

Agua destilada

b) Tratamiento agresivo

Dicromático potásico

Ácido sulfúrico

Agua destilada

Material

Portaobjetos

Recipientes de vidrio herméticos

Cestillas de vidrio para portaobjetos

Cubetas de vidrio

Estufa a 60 °C

Campana extractora de gases

Caja para almacenar portaobjetos

3 Decalcificación

Cuando hay minerales en los tejidos, como por ejemplo en el hueso, en la dentina, o se producen en procesos patológicos calcificantes en tejidos blandos, es muy difícil obtener buenas secciones finas, bien sea de material incluido en parafina o de material en congelación. En estos casos el proceso histológico debe incluir un paso en el que se eliminan tales minerales denominado generalmente como descalcificación, puesto que en la mayoría de los casos se eliminan minerales de calcio. Hay, sin embargo, ocasiones en que esto no es posible o deseable, y a veces se requiere estudiar el tejido óseo en su estado original, por lo que es necesario obtener secciones de tejido mineralizado sin descalcificar (ver más abajo).

El principal mineral duro de los tejidos animales es la hidroxiapatita, mineral de fosfato cálcico, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$, que se encuentra en los huesos distribuido entre las fibras de colágeno. Estos minerales se encuentran en equilibrio con su solución saturada según las siguiente reacción:



Si eliminamos alguno de los componentes a la derecha de la reacción, el mineral (a la izquierda) se disolverá para equilibrar de nuevo la solución. Este es el principio de los descalcificantes. A la hora de elegir los tiempos y sustancias descalcificantes hay que tener en cuenta si estamos interesados en el hueso compacto o en el esponjoso. Por ejemplo, las sales minerales tardan más en disolverse en el hueso compacto.

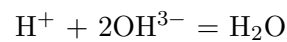
La descalcificación se realiza normalmente después de la fijación, aunque a veces se hace tras la inclusión en parafina eliminando la sales de calcio sólo de las micras más superficiales del plano de corte de la muestra. Es importante realizar una buena fijación del tejido puesto que será incubado en soluciones ácidas relativamente agresivas. Además, es bueno eliminar bien los restos de fijador con lavados abundantes para evitar reacciones química con los agentes descalcificadores. Los tiempos de fijación del hueso que se va a descalcificar suelen ser mucho mayores que para otros tejidos. El mejor método de fijación es la perfusión, pero si no es posible es conveniente hacer piezas

pequeñas con sierras de dientes muy finos y eliminar los tejidos que rodean al hueso antes de sumergirlo en fijador. Los mejores fijadores son Bouin, mezclas de formalina con zinc, o FAA (formol, acético, alcohol).

Hay dos grupos principales de agentes descalcificantes: los ácidos y los quelantes de calcio. A continuación veremos los descalcificantes más comunes.

Basados en ácidos

Los ácidos aportan hidrógenos y eliminan iones hidroxilos del medio por lo que la reacción antes mencionada tiende hacia la solubilización del mineral.



Hay dos grupos de ácidos: los fuertes (inorgánicos) y los débiles (orgánicos). Los ácidos fuertes suelen ser rápidos pero son muy agresivos por lo que el tiempo debe ser el mínimo posible, ya que si es excesivo producen daños en los núcleos y maceran el tejido. Los ácidos débiles son más lentos pero preservan mejor al tejido. Los ácidos fuertes más usados son el ácido clorhídrico, el ácido nítrico, mientras que como débil se suele emplear el ácido fórmico. Cuanto más agresivos son los ácidos más se deterioran las enzimas y los antígenos para realizar pruebas enzimáticas o inmunocitoquímicas. Los ácidos también deterioran los ARN citosólicos por lo que las hibridaciones *in situ* se ven comprometidas.

El ácido clorhídrico y el ácido nítrico se suelen usar al 5-10 % en agua. Descalcifican rápidamente y su acción no debería prolongarse más de 24-48 horas. No se recomiendan para inmunocitoquímica ni ensayos enzimáticos. Se emplean para muestras pequeñas y diagnósticos rápidos.

El ácido fórmico es el ácido débil más usado como descalcificante. Se puede usar en solución acuosa (5-10 %), tamponado (con ácido cítrico) o combinado con formalina. En este último caso la descalcificación va acompañada de fijación. El tiempo de tratamiento con ácidos débiles es más prolongada (1 a 10 días), dependiendo del tamaño y tipo de hueso, y de la concentración de ácido. La solución debería cambiarse cada 24 o 48 horas.

Otros ácidos débiles como en el acético o el

ascórbico se usan cuando se van a realizar pruebas inmunocitoquímicas. La descalcificación se realiza en estos casos con pH por encima de 2.5.

Agentes quelantes

Los agentes quelantes son aquellas sustancias orgánicas que pueden unirse covalentemente a iones metálicos formándose un compuesto soluble llamado quelato de metal. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) secuestra iones de calcio, presentes en la superficie de los cristales de hidroxiapatita, por lo que progresivamente irá disminuyendo el tamaño del cristal. Se usa entre el 10 y el 14

En cualquiera de los dos métodos, ácidos o quelantes, hay variables que pueden disminuir el tiempo de descalcificación, como son el aumento de la temperatura o una agitación suave del tejido. Hay otros más agresivos como sonicación o microondas, pero hay que controlar los daños al tejido.

Averiguar el grado de descalcificación es importante para determinar el tiempo necesario que tienen que incubarse las muestras en las soluciones descalcificadoras. Ya se comentó que incrementos de tiempo innecesarios puede repercutir en la calidad del tejido, pero si el tiempo es corto pueden quedar cristales en el tejido que dificulten el corte y procesamiento del hueso. El calcio del mineral termina en solución y si la solución descalcificante se cambia periódicamente se podrá averiguar cuándo se ha producido la descalcificación completa mediante la medición de la concentración de calcio en el medio. Cuando se emplean ácidos como descalcificantes se puede realizar una comprobación química: se añade oxalato de amonio a la solución descalcificante, que ha sido neutralizada con hidróxido amonio. Si hay calcio en la solución se forman precipitados de oxalato de calcio, lo que indica que aún quedan minerales en el hueso.

A veces, sin embargo, es necesario mantener el contenido mineral del hueso y la descalcificación no se lleva a cabo. En estos casos es posible obtener secciones mediante procedimientos no convencionales. Por ejemplo, se puede serrar el hueso en lonchas más a menos finas y luego limar las superficies hasta llegar a un grosor óptimo para su observación con el microscopio. También se puede infiltrar el hueso con

resinas que al polimerizar alcanzan una dureza similar a la del hueso, y posteriormente cortar la muestra incluida con microtomos especiales como el ultramicrotomo cuando se usan cuchillas de diamante. Otra posibilidad es realizar cortes por congelación.

La detección de antígenos mediante anticuerpos, o inmunocitoquímica, se puede ver afectada por tratamientos previos como la descalcificación. En general la descalcificación parece afectar selectivamente a según qué antígenos y qué método de descalcificación se use. En cualquier caso, los ácidos fuertes deben ser evitados.

4 Inclusión en parafina

La obtención de secciones finas, entre 5 y 15 μm , sólo se puede conseguir a partir de tejido endurecido, pero no frágil. Esto es posible mediante la congelación de las muestras o mediante su inclusión en determinados medios. Incluir significa infiltrar el tejido con un medio líquido que posteriormente se solidificará y endurecerá sin afectar, o afectando mínimamente, a las características de la muestra.

El medio de inclusión más usado para obtener secciones finas es la parafina. La parafina es una mezcla de hidrocarburos que cuando solidifica tiene aspecto de cera de vela. Hay distintos tipos de parafinas que se diferencian en la longitud de las cadenas de las sustancias carbonadas, lo cual determina sus puntos de fusión. Éstos suelen oscilar entre los 45 $^{\circ}\text{C}$ y los 60 $^{\circ}\text{C}$.

Procedimiento

Fijación (recomendados formol, Bouin o FAA: formaldehído/acético/alcohol).

Selección de la muestra: 0.5 cm de tamaño aproximadamente.

Deshidratación de las muestras: etanol.

Este paso es necesario puesto que la parafina no es miscible con el agua y por tanto la muestra ha de estar libre de agua.

3x10 min H₂O destilada

4x10 min etanol 70^o

4x10 min etanol 80^o

4x10 min etanol 90^o

4x10 min etanol 96^o

5x10 min etanol 100^o

Solvente orgánico: xileno

La parafina tampoco es miscible con el alcohol por lo que se requiere este paso puente con un solvente orgánico. El xileno es miscible con el etanol de 100^o y con la parafina.

4x5 min xileno

Parafina líquida (en estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$).

60 min parafina I

60 min parafina II

60 min parafina III

Encastrar en parafina y hacer el bloque.

Colocar parafina líquida en un molde metálico, fuera de la estufa, e introducir la muestra en él con la orientación deseada.

Consejos

Fijación: el tejido ha de estar fijado antes de empezar el proceso de inclusión. Se pueden usar muchos tipos de fijadores, pero los más comunes son aquellos basados en formaldehído, como el propio formol, el BOUIN, o para plantas el Carnoy, Karnovsky o FAA. No suelen ser buenos los fijadores que contienen glutaraldehído.

Selección de la muestra: no se recomienda la inclusión de piezas con dimensiones superiores a 1 cm puesto la difusión de los líquidos será más lenta. Los tiempos de deshidratación, xileno y embebimiento en parafina se adaptarán al tamaño de la muestra. Más tamaño más tiempo.

Selección de la muestra: en el caso de muestras duras hay que hacer tratamientos previos. Por ejemplo, los huesos requieren un tratamiento de descalcificación antes de comenzar las deshidratación.

Deshidratación: en caso de fijadores con ácido pícrico es importante que los primeros pasos entre el H₂O destilada y el etanol de 96^o se extiendan hasta que el color amarillo haya desaparecido prácticamente.

Deshidratación: si es posible, los pasos de deshidratación y también el de xileno han de hacerse con el recipiente en agitación. El movimiento de la muestra dentro de cada líquido favorece los procesos de difusión entre el interior y el exterior de la muestra.

Encastramiento: dependiendo del tipo de microtomo que vayamos a usar es necesario colocar nuestro bloque de parafina solidificada en soportes especiales que se adapten a la pieza del microtomo que sostendrá el bloque de parafina.

Productos

Etanol de 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Xileno

Parafina

H₂O destilada

Material

Vasos de precipitado

Pinzas

Estufa a 60°C

Molde para hacer bloques de parafina

Casetes de inclusión

5 Azán de Heidenhain

Este método es una modificación de la tinción tricrómica de Mallory. Su ventaja es que diferencia una mayor diversidad de estructuras histológicas, sobre todo por la obtención de imágenes nucleares con diferente coloración. El protocolo debe adaptarse a cada tipo de material, siendo necesarios ensayos previos.

Procedimiento

Partimos de muestras que se ha fijado y se han incluido en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y se han adherido a portaobjetos recubiertos con gelatina. Cuando los cortes provienen de material que ha sido fijado con un fijador que contiene ácido pícrico hay que eliminarlo mediante incubación en alcohol con anilina (1% de anilina en etanol de 96^o) durante 30 minutos.

- 1.- Xileno para desparafinar, 2x10 min.
 - 2.- Etanol 100^o, 2x10 min.
 - 3.- Etanol 96^o, 10 min.
 - 4.- Etanol 80^o, 10 min.
 - 5.- Etanol 50^o, 10 min.
 - 6.- H₂O destilada, 5 min.
 - 7.- Azocarmin previamente calentado a 60 °C durante, 1 h a 60°C.
- Azocarmin G:
- 0.1 g de azocarmín G (C.I. 50085)
 - 200 ml H₂O destilada
 - 2 ml de ácido acético
- 8.- H₂O destilada, varios lavados.
 - 9.- Diferenciar bajo el microscopio mediante inmersiones sucesivas en alcohol-anilina (anilina al 0.1 % en etanol 96^o).

La velocidad de diferenciación es proporcional a la cantidad de anilina y a la concentración del alcohol. Según el resultado deseado, puede modificarse la composición de la mezcla alcohol-anilina, desde alcohol de

70^o con un 1% de anilina, hasta el alcohol de 96^o con un 0,1% de anilina.

10.- Detener la diferenciación con etanol-acético (ácido acético 1% en etanol 96^o).

11.- H₂O destilada, varios lavados.

12.- Ácido fosfotúngstico al 5%, 1 hora.

Este ácido actuará como mordiente y favorece la tinción con el azul de Heidenhain, al mismo tiempo que continúa la diferenciando el azocarmín.

13.- H₂O destilada, varios lavados.

14.- Azul de Heidenhain, 2 h.

Azul de Heidenhain:

0.2 g de azul de anilina (C.I. 42755)

0.5 g de naranja G (C.I. 16230)

100 ml de H₂O destilada

1 ml de ácido acético

15.- Etanol 96^o, una inmersión rápida.

16.- Etanol 100^o, varias inmersiones rápidas.

17.- Xileno, 2x10 min.

Resultados

Núcleos: distinta coloración, desde naranja a rojo

Citoplasma: coloración diversa

Músculo: naranja a rojo

Colágeno: azul

Consejos

Hay que modificar el protocolo según la muestra con el que se esté trabajando.

Son críticos los pasos de diferenciación.

La deshidratación final ha de ser muy rápida para no perder la coloración azul.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Azocarmín G (C.I. 50085)
Anilina (C.I. 76000)
Azul de anilina (C.I. 42755)
Naranja G (C.I. 16230)
Ácido fosfotúngstico
Ácido acético
H₂O destilada
Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción
Estufa a 60 °C
Cesta para portas
Cubreobjetos

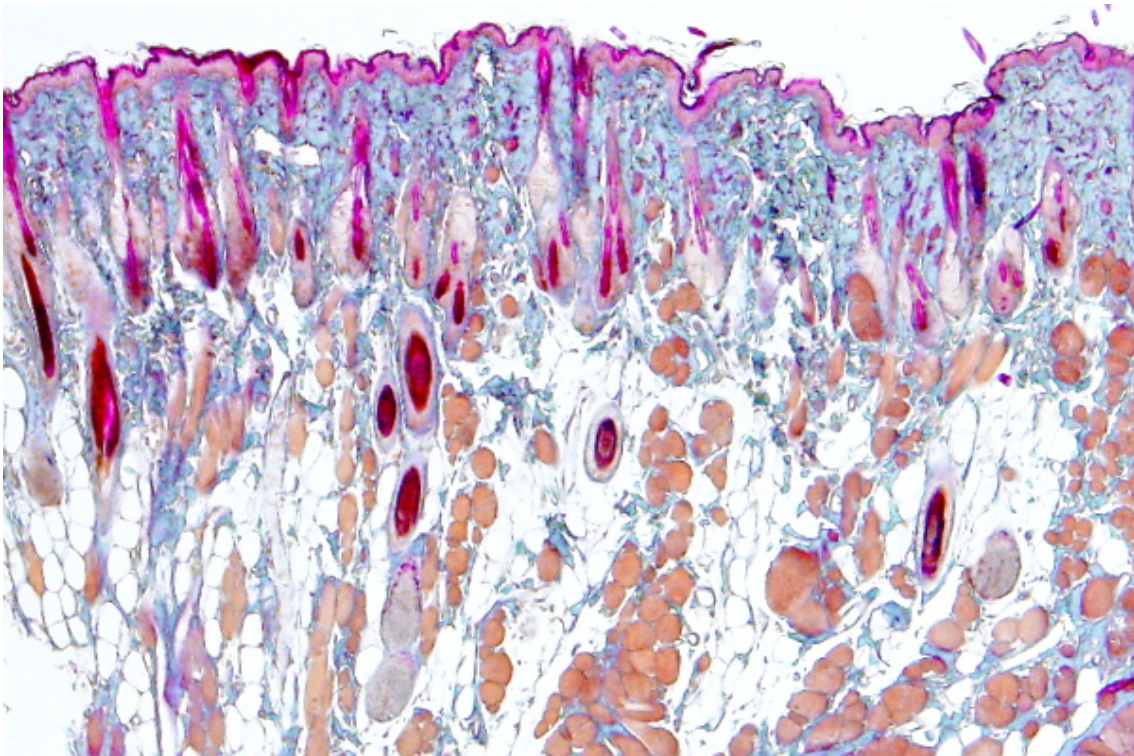


Figura 1: Sección de piel teñida con azán de Heidenhain.

6 Azul de toluidina (vegetal)

El azul de toluidina es un colorante que se usa para tinciones rápidas en histología vegetal. Es muy fácil de preparar y el tiempo de tinción es muy corto. Además, produce una reacción metacromática, es decir, es capaz de dar color diferente a diferentes estructuras. El color va desde verde brillante hasta púrpura, pasando por una gama de azules.

Las tinciones generales para tejidos vegetales se usan habitualmente en los laboratorios de histología para ver la calidad de las muestras de tejido y de las estructuras que contienen. Aunque en el caso de la tinción con azul de toluidina se usa un solo colorante, otras tinciones generales combinan más de uno, como la tinción de safranina y azul alción.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2x10 min en etanol 100^o
- 10 min en etanol 96^o
- 10 min en etanol 80^o
- 10 min en etanol 50^o
- 5 min en H₂O destilada
- 30 s en azul de toluidina 0,5 % en H₂O destilada
- 3x10 s en H₂O destilada con agitación
- 10 s en etanol 96^o con agitación
- 2 x 10 s en etanol 100^o con agitación
- 2 min + 5 min en xileno
- Montado con medio de montaje

Resultados

Paredes celulares primarias delgadas: azul a púrpura.

Paredes celulares secundarias: verde brillante.

Cutícula madura: verde brillante.

Consejos

Quizá lo más destacable de esta tinción es la rapidez con se hacen los pasos que van tras el colorante y hasta el segundo paso de xileno. El tiempo en el colorante y los segundos en cada uno de los pasos posteriores determinarán la intensidad de la tinción. Es conveniente procesar los portaobjetos uno a uno, puesto que hay que agitarlo lentamente con la mano como si se estuviera removiendo un líquido con una cucharilla en la que el portaobjetos hace de cuchara, o sumergiendo y sacando el portaobjetos de la solución.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Azul de toluidina al 0.5 % en H₂O destilada

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

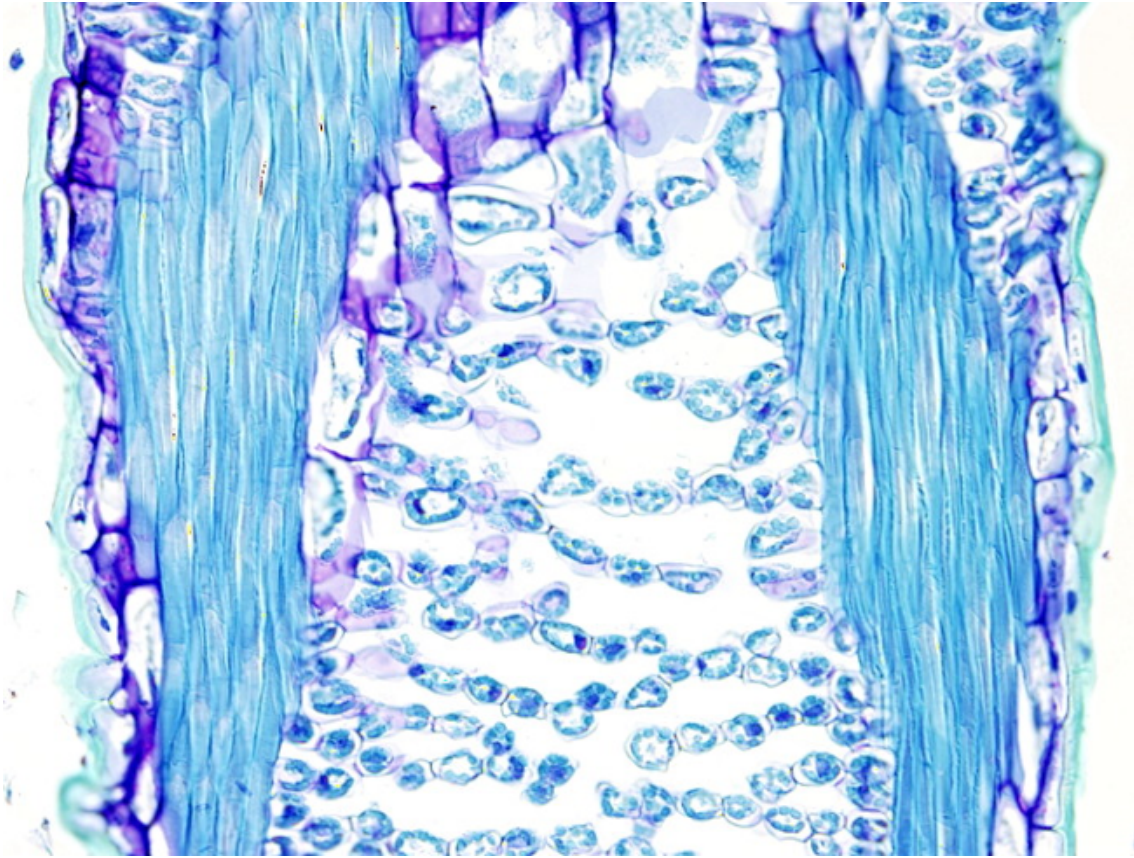


Figura 2: Sección de una espina de un tojo. Nótese el color verde brillante en la cutícula y el azul claro de las fibras de esclerénquima, mientras que las paredes de las células parenquimáticas aparecen de color púrpura-violeta.

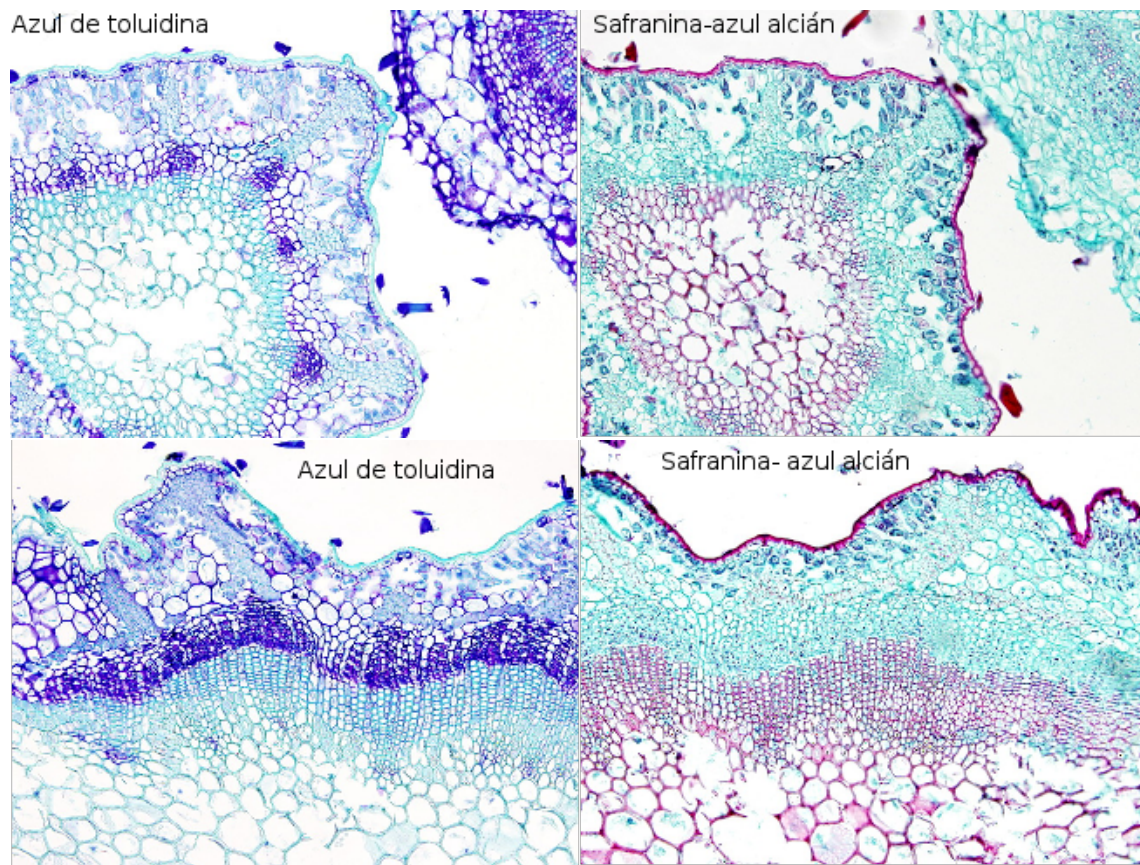


Figura 3: Secciones de azul de toluidina, izquierda, y safranina-azul alcian, derecha. Planta: tojo.

7 Azul de toluidina (animal)

La tinción con el colorante azul de toluidina se puede usar para conseguir tinciones rápidas de tejidos animales. Es muy fácil de preparar y el tiempo de tinción es muy corto. Además, produce una reacción metacromática, es decir, es capaz de dar color diferente a diferentes estructuras. El color va desde verde brillante hasta púrpura, pasando por una gama de azules.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en H₂O destilada
7. 30 s en azul de toluidina (C.I. 52040) 0.5 % en H₂O destilada + 1 % de ácido acético glacial.
8. 10 s en etanol 96^o con agitación
9. 2 x 10 s en etanol 100^o con agitación
10. 2 min + 5 min en xileno
11. Montado con medio de montaje

Resultados

Núcleos: azules.

Carbohidratos: azul o púrpura.

Citoplasma, ADN: azul o verde brillante.

Consejos

La intensidad de la tinción depende sobre todo de los tiempos de deshidratación, que han de ser muy rápidos y con agitación suave para acelerar el intercambio de líquidos en el tejido.

Se puede añadir un paso de molibdato amónico al 0.5 % en H₂O destilada durante 5 min antes de los alcoholes de deshidratación. El molibdato hace que el colorante no se pierda con tanta facilidad durante la deshidratación.

Productos

Xileno Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Azul de toluidina (C.I. 52040)

Ácido acético glacial

Molibdato amónico

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

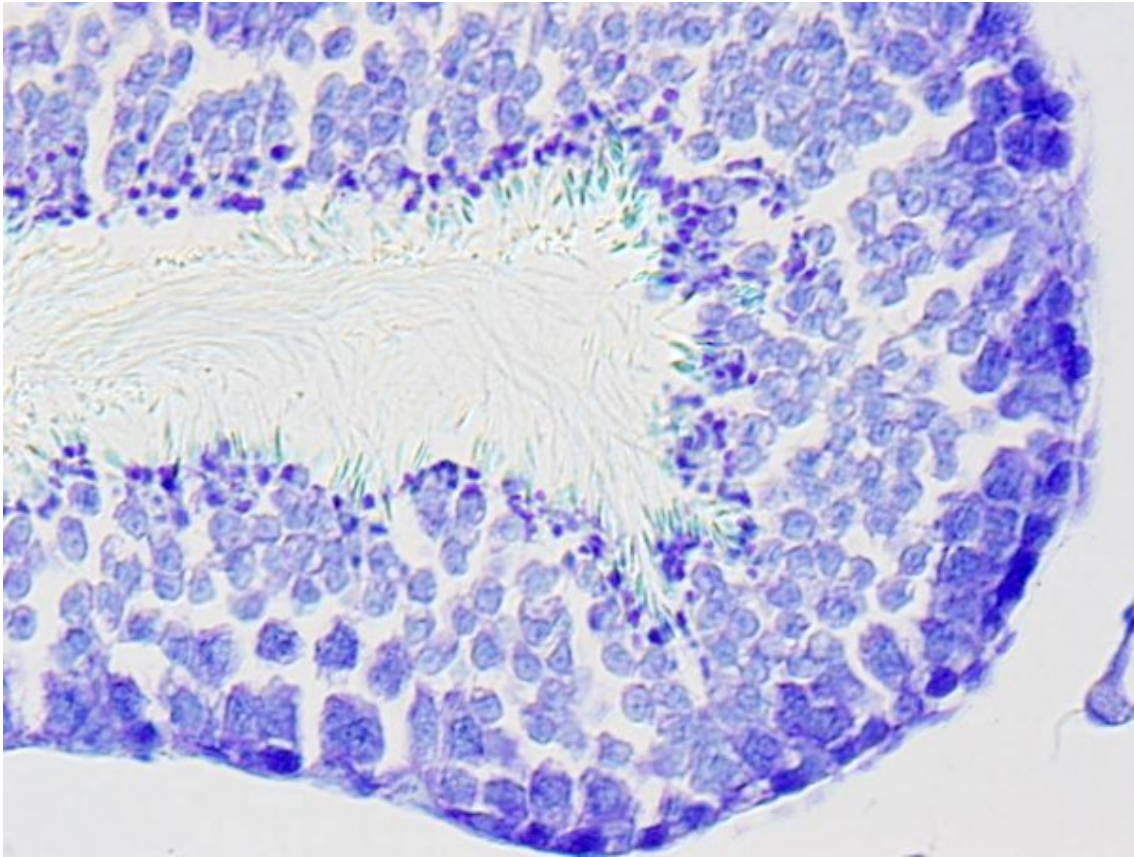


Figura 4: Túbulo seminífero de un testículo de rata. Obsérvese cómo la cabeza de los espermatozoides tienen un color verde brillante en comparación con los núcleos de las espermátidas, los espermatoцитos y espermatoгонias.

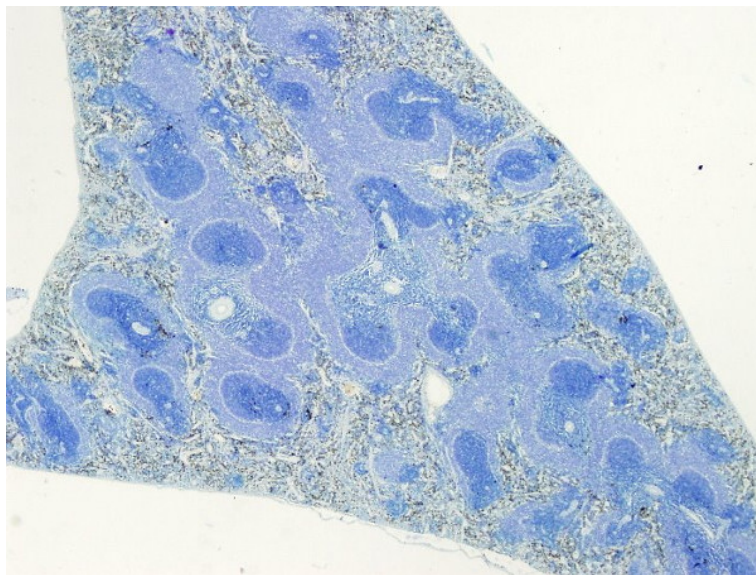


Figura 5: Imagen de un bazo.

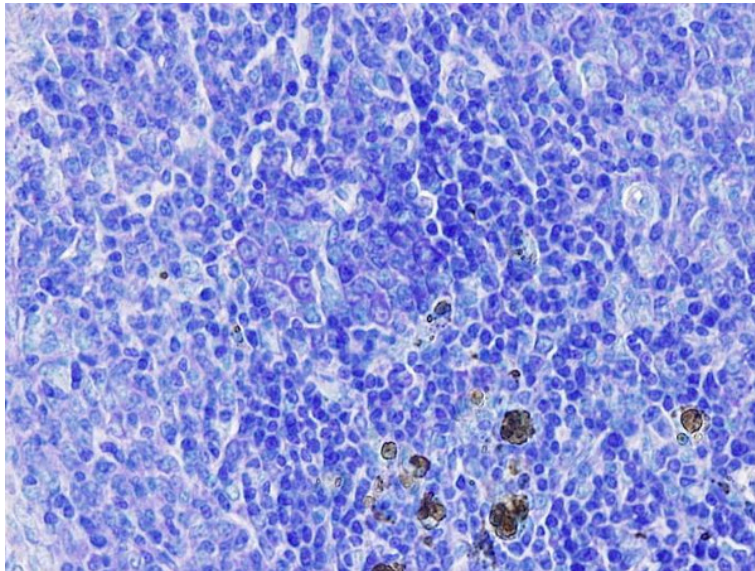


Figura 6: Detalle de la imagen de un bazo donde se puede apreciar la metacromasia, con células teñidas de púrpura y otras de azul claro.

8 Hematoxilina de Heidenhain

Este protocolo da una muy buena calidad en la tinción por hematoxilina de núcleos y estructuras citoplasmáticas. Aunque se puede combinar con otros colorantes complementarios, es buena por sí sola. Se emplea para estudiar estructuras celulares por lo que fijación debe ser muy buena y el grosor de los cortes no mayor de 5 μm . Es una tinción en dos pasos. En el primero se añade una solución férrica que se une a los grupos carboxilo de las proteínas y un segundo paso con hematoxilina que se une a este hierro. La solución de diferenciación eliminará hematoxilina del tejido hasta que la tinción se considere idónea. Algunos orgánulos celulares se describieron con esta tinción antes de la aparición del microscopio electrónico.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 5 μm de grosor y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina-alumbre.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100^o
- 3.- 10 min en etanol 96^o
- 4.- 10 min en etanol 80^o
- 5.- 10 min en etanol 50^o
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- Toda la noche. Solución férrica.
Sulfato amónico de hierro. H₂O 5 g
H₂O destilada 100ml
- 8.- 3x1 min en H₂O
- 9.- Toda la noche. Hematoxilina alcohólica.
Hematoxilina 0.5 g
Etanol 96^o 100 ml
Iodato sódico (o potásico) 25 mg
- 10.- 3x5 min. H₂O corriente

- 11.- Solución férrica al 1%

El tiempo de diferenciación varía según el tejido y lo que queramos observar. Con esta concentración, el tiempo puede variar entre 1 y varios minutos. Podemos incrementar la concentración o disminuirla para controlar mejor los tiempos. Se puede controlar el progreso de la diferenciación en el microscopio añadiendo unas gotas de solución férrica sobre el tejido.

La diferenciación se produce porque el hierro disuelto compite con el previamente unido al tejido por la hematoxilina.

- 12.- 3x10 min. H₂O corriente
- 13.- 5 min en etanol 80^o
- 14.- 5 min en etanol 96^o
- 15.- 2x10 min en etanol 100^o
- 16.- 2x10 min en xileno
- 17.- Montado con medio de montaje

Resultados

Tiñe de azul oscuro numerosas estructuras y tipos celulares. Destaca una buena tinción nuclear y estructuras citoplasmáticas como mitocondrias, citoesqueleto (células musculares) y otros orgánulos. También la mielina de los nervios.

Consejos

Las estructuras que se tiñen con este protocolo pueden variar dependiendo de la diferenciación. Por ejemplo, si usamos una solución de diferenciación ligeramente ácida deja como últimas estructuras teñidas a los núcleos. Pero si usamos una solución algo básica o con hierro III (como la ferrocianuro potásico) el citoplasma y los orgánulos serán los últimos en desteñirse. La solución de sulfato amónico de hierro está entre estos dos extremos.

Productos

- Xileno
- Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 96^o y 100^o
- Hematoxilina

Sulfato amónico de hierro.12 H₂O

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

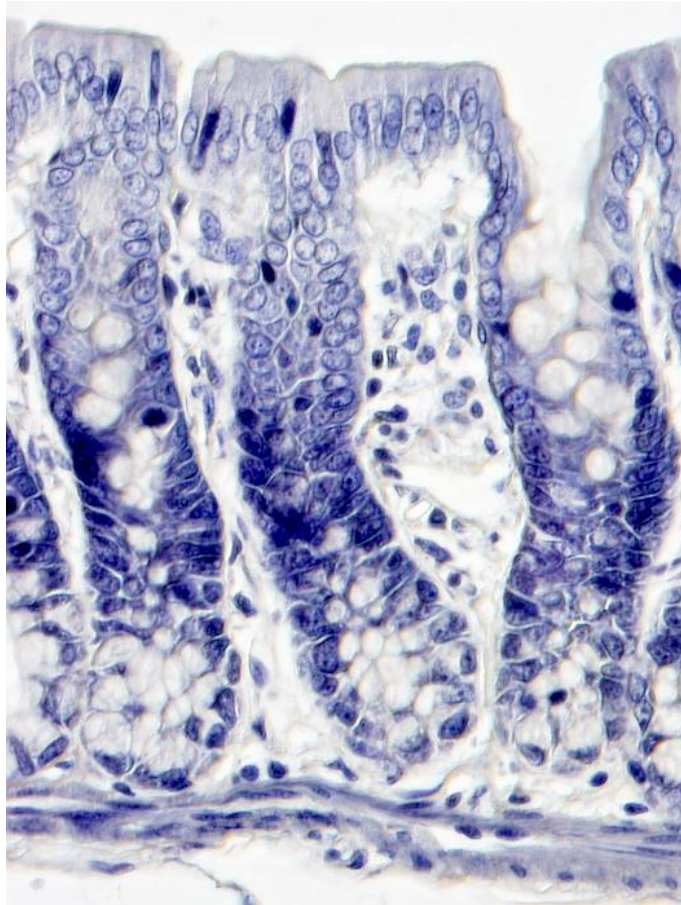


Figura 7: Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina de Heidenhain. Intestino grueso.

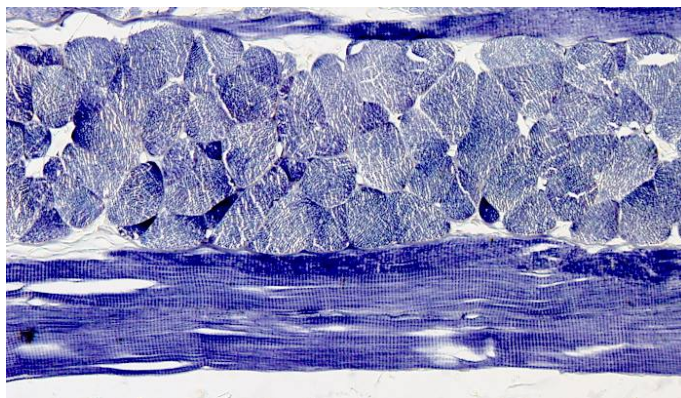


Figura 8: Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina de Heidenhain. Músculo estriado.

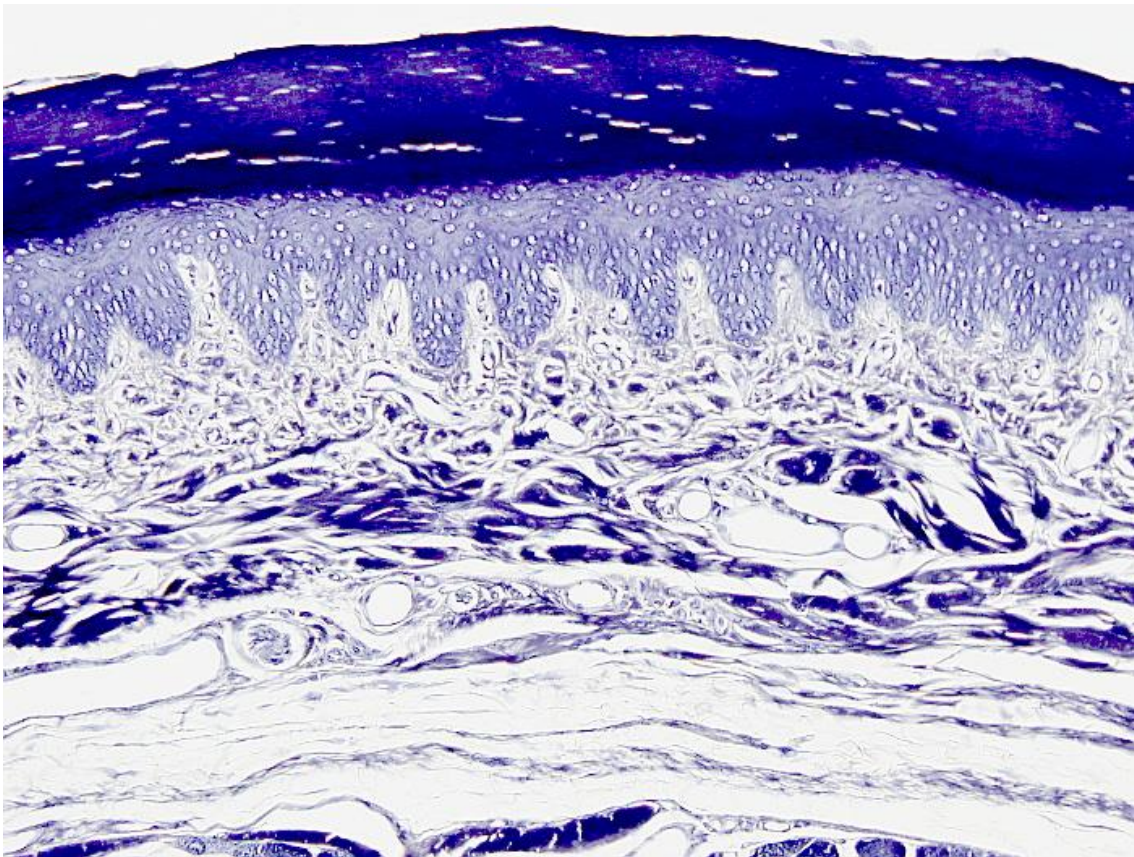


Figura 9: Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina de Heidenhain. Tegumento.

9 Hematoxilina y eosina

La mayoría de las células y matrices extracelulares no poseen un color propio por lo que su observación directa al microscopio óptico no permite observar sus características morfológicas. Para poder observarlos se emplean colorantes, sustancias dotadas de color que se unen de manera más o menos específica a determinadas estructuras del tejido.

Las tinciones generales se usan habitualmente en los laboratorios de histología para obtener una visión general de las muestras de tejido. Normalmente combinan más de un colorante. La tinción más común es la que combina una sustancia como la hematoxilina y el colorante ácido eosina.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm de grosor y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina-alumbre.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100^o
- 3.- 10 min en etanol 96^o
- 4.- 10 min en etanol 80^o
- 5.- 10 min en etanol 50^o
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- 5-10 min en Hematoxilina de Mayer

La hematoxilina no es un colorante en sentido estricto sino que es la hemateína, su producto oxidado, la que teñirá sustancias como la cromatina del núcleo y las grandes agregaciones ribosomales del citoplasma, como las que se dan en el retículo endoplasmático rugoso.

- 8.- 15 min en agua corriente. Diferenciación.
- 9.- 2x1 min en H₂O destilada.
- 10.- 0.5 a 2 min en Eosina al 0.2 % en H₂O destilada.

La eosina, colorante ácido, se une a elementos del

citoplasma y de la matriz extracelular.

Se pueden usar tres tipos de eosina: eosina amarillenta (CI 45380), eosina azulada (CI 45400) y eosina soluble en alcohol (CI 45386). La primera es la más usada.

- 11.- Tiempo variable (unos cuantos segundos) en 70^o para diferenciación

El tiempo de diferenciación depende de la intensidad de tinción de eosina que queramos en nuestra muestra. Se le pueden añadir unas gotas de acético.

- 12.- 20s en etanol 96^o
- 13.- 2x3 min en etanol 100^o
- 14.- 2x10 min en xileno
- 15.- Montado con medio de montaje

Resultados

Colágeno: rosa pálido.

Músculo: rosa fuerte.

Queratina: rojo intenso.

Citoplasma: rosado.

Núcleos: azul oscuro o púrpura (en realidad se tiñe sólo la cromatina).

Eritrocitos: color cereza.

Consejos

Los fijadores ácidos dan mejores resultados para la eosina, mientras que los fijadores que contienen ácido pícrico favorecen una mejor tinción general. Los procesos de descalcificación usando ácidos fuertes provocan una pobre tinción nuclear.

La eosina es muy soluble en agua. Una tinción excesiva se puede disminuir con lavados prolongados en agua.

Aunque la hematoxilina de Mayer es comúnmente usada, se puede cambiar por otros tipos de hematoxilina (ver recetas).

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 96º y 100º

Hematoxilina de Mayer

Eosina acuosa al 0.2%

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

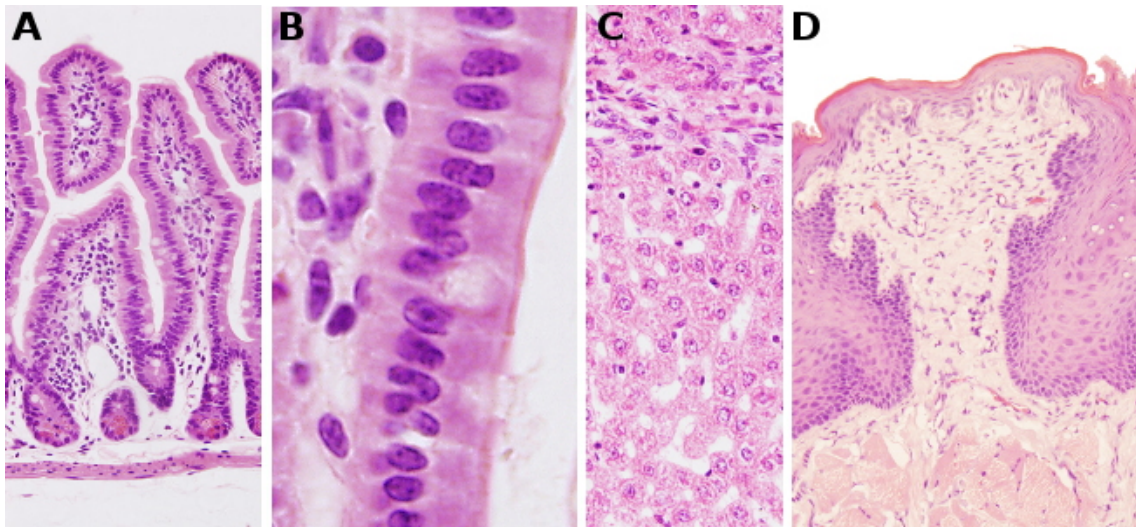


Figura 10: Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina y eosina. A) Vellosidades del intestino delgado. B) Detalle del epitelio del digestivo. C) Hepatocitos. D) Papila fungiforme de la lengua.

10 Hematoxilina, eosina, azul alcian

Este protocolo es útil para poner de manifiesto el cartílago y es especialmente útil para diferenciar cartílago hialino articular de hueso, puesto que la matriz extracelular cartilaginosa se tiñe con el azul alcian. Pero también se usa para teñir células mucosas como las del epitelio digestivo o las de las glándulas mucosas de las glándulas salivales.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100^o
- 3.- 10 min en etanol 96^o
- 4.- 10 min en etanol 80^o
- 5.- 10 min en etanol 50^o
- 6.- 5 min en H₂O destilada
7. 15 min Azul Alcian pH 2.5

Preparación de la solución: Azul alcian (CI 74240) 1g + ácido acético al 3%, completar hasta 100 ml en agua destilada.

8. 15 min en H₂O destilada
- 9.- 5-10 min en Hematoxilina de Mayer
- 10.- 15 min en agua corriente. Diferenciación.
- 11.- 2x5 min en H₂O destilada
- 12.- 1 a 2 min en Eosina al 0.2 %

La eosina, colorante ácido, se une a elementos del citoplasma y de la matriz extracelular.

Se pueden usar tres tipos de eosina: eosina amarillenta (CI 45380), eosina azulada (CI 45400) y eosina soluble en alcohol (CI 45386). La primera es la más usada.

- 13.- Tiempo variable en 70^o para diferenciación

El tiempo de diferenciación depende de la intensidad de la tinción con eosina que queramos en nuestra muestra. Se le pueden añadir unas gotas de acético.

- 14.- 5 min en etanol 96^o
- 15.- 2x10 min en etanol 100^o
- 16.- 2x10 min en xileno
- 17.- Montado con medio de montaje

Resultados

Citoplasma: rosado.

Núcleos: negro.

Hueso: azul intenso.

Colágeno: azul pálido.

Glándulas mucosas: azul intenso.

Mastocitos: citoplasma azulado.

Consejos

El pH del Azul alcian debe ser 2.5, comprobar siempre antes de usarlo.

Hay que tener en cuenta que la tinción con azul alcian es progresiva por lo que el tiempo de tinción se podrá ajustar a cada tejido. Por ejemplo, una coloración óptima para cartílago articular puede ser de uno 10 minutos.

Los fijadores ácidos dan mejores resultados para la eosina, mientras que los fijadores que contienen ácido pícrico favorecen una mejor tinción general. Los procesos de descalcificación provocan una pobre tinción nuclear.

La eosina es muy soluble en agua. Una tinción excesiva se puede disminuir con lavados prolongados en agua.

Si el xileno se vuelve lechoso tras la deshidratación es porque la deshidratación no ha sido completa. Si esto ocurre, se han de poner limpios el último alcohol de 100^o y el paso de xileno estropeado, volver las secciones al alcohol de 50^o y deshidratar de nuevo.

Aunque la hematoxilina de Mayer es comúnmente usada, se puede cambiar por otros tipos de hematox-

ilina (ver recetas).

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º, 96º y 100º

Azul alcian (CI 74240)

Hematoxilina de Mayer

Eosina acuosa al 0.2%

Ácido acético

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

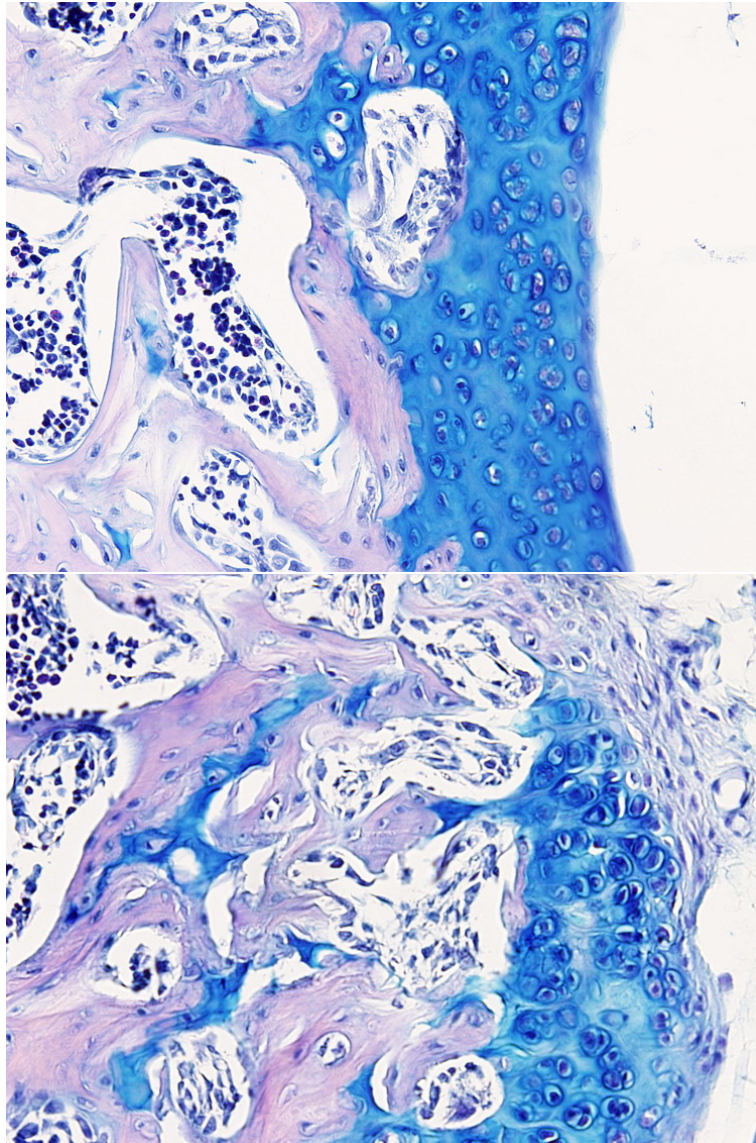


Figura 11: Secciones de hueso en la zona de la articulación teñidos con hematoxilina eosina más azul alcian. El cartílago articular (hialino) se puede distinguir claramente.

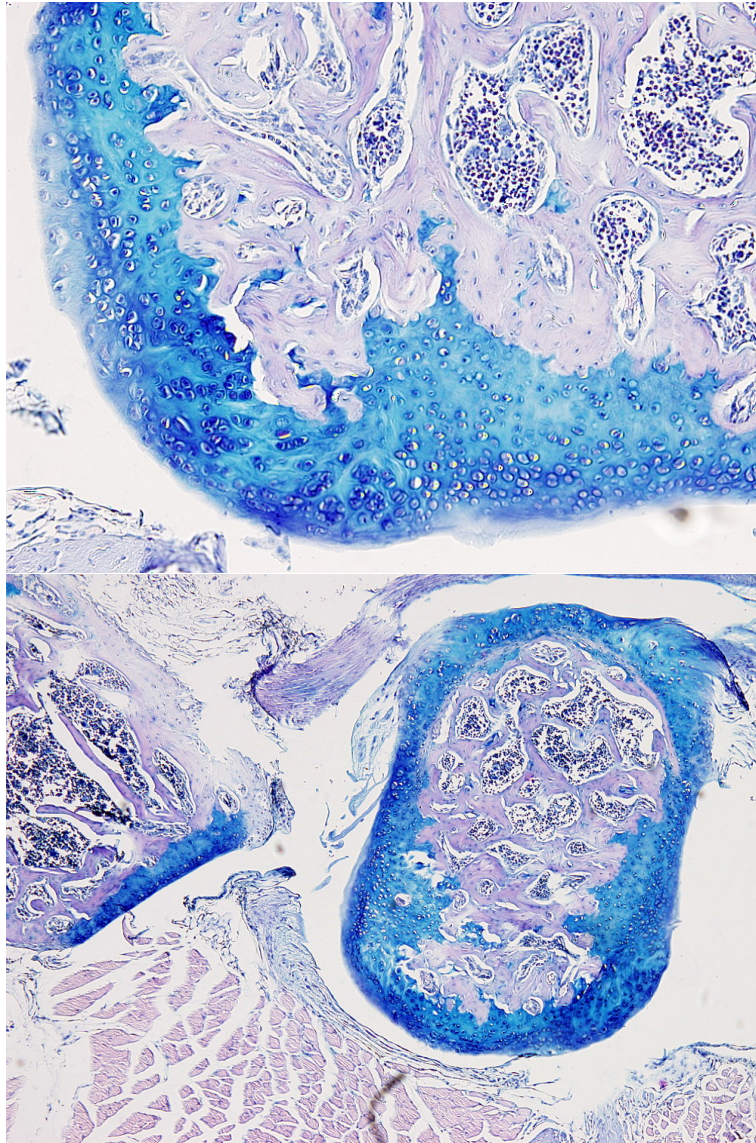


Figura 12: Secciones de hueso en la zona de la articulación teñidos con hematoxilina eosina más azul alcian. El cartílago articular (hialino) se puede distinguir claramente.

11 Naranja de acridina

El naranja de acridina es un colorante orgánico catiónico fluorescente metacromático que se utiliza para la tinción de ácidos nucleicos y compartimentos ácidos como los lisosomas. Emite luz verdosa cuando tiñe al ADN y luz más anaranjada cuando se une a ARN o tiñe compartimentos ácidos.

Procedimiento

Protocolo modificado por Zaira Salgueiro. Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y se han adherido a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100º
3. 10 min en etanol 96º
4. 10 min en etanol 80º
5. 10 min en etanol 50º
6. 5 min en H₂O destilada
7. 10-20 s en naranja de acridina

Preparación de la solución de naranja de acridina:

Naranja de acridina (CAS: 494-32-8) 26 mg

Ácido acético 2 ml

H₂O destilada 98 ml

8. 1 min en alcohol salino

Preparación de alcohol salino:

NaCl 0,9 g

Etanol 100º 2 ml

H₂O destilada 98 ml

9. 1 min en solución salina

Preparación de solución salina:

NaCl 0,9 g

H₂O destilada 100 ml

17. Montado con una gota de glicerol y un cubreobjetos.

18. Observar con el microscopio de fluorescencia

Resultados

Núcleos: verde brillante.

Compartimentos ácidos: anaranjado-amarillento.

Consejos

Los pasos por alcohol salino y solución salina son esenciales para establecer la calidad e intensidad de la tinción.

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 96º y 100º

Naranja de acridina (CAS: 494-32-8)

NaCl

Ácido acético

H₂O destilada

Glicerol

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

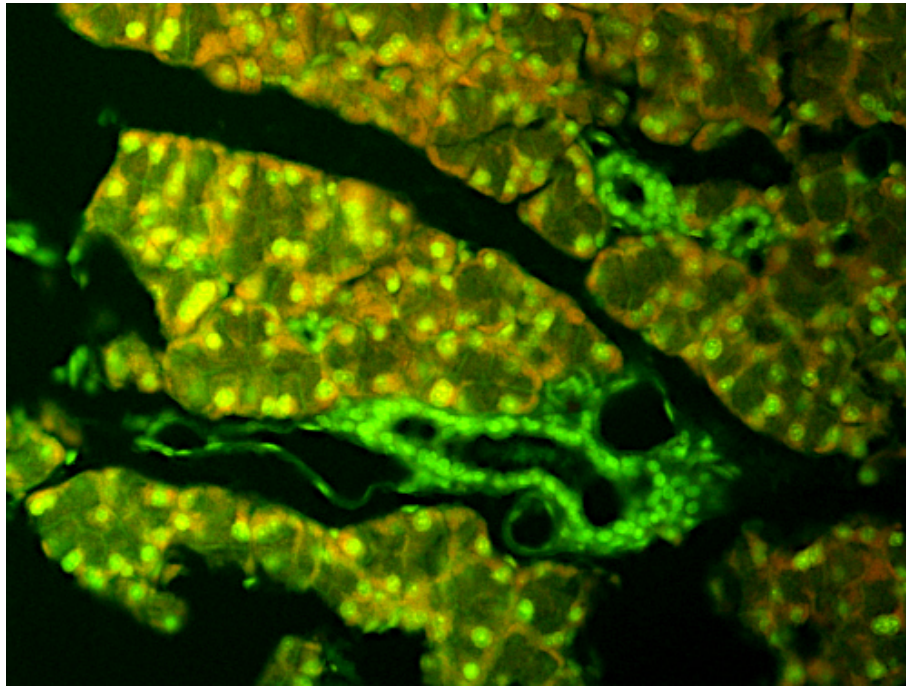


Figura 13: Sección de páncreas de ratón teñida con naranja de acridina. Obsérvese el contenido anaranjado de las células y los núcleos verdosos.

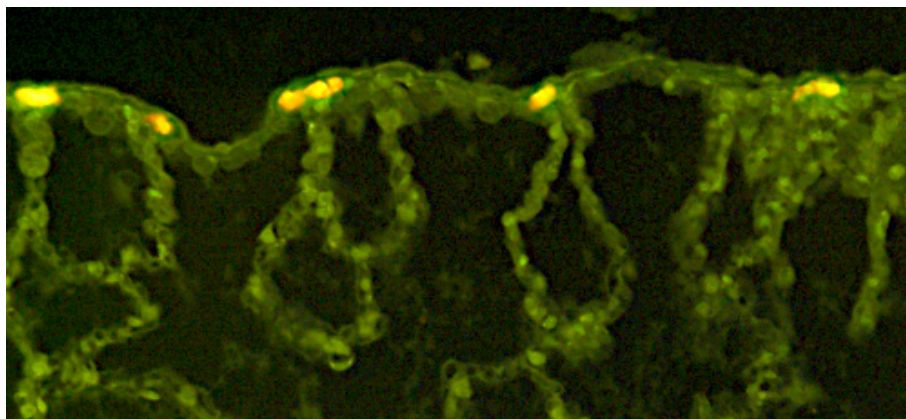


Figura 14: Sección de pulmón de ratón teñida con naranja de acridina. Obsérvese las células teñidas de amarillo-anaranjado de la periferia, posiblemente mastocitos, y los núcleos verdes de todas las células.

12 PAS - azul alción

Este método de tinción se emplea para detectar polisacáridos en tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. También es una buena tinción para membranas basales y cartílago. Cualquier fijador es apropiado para esta técnica.

La combinación del PAS con el azul alción nos permite distinguir a los mucopolisacáridos ácidos, teñidos con el azul alción, del resto de polisacáridos. Todos los polisacáridos se tiñen con el PAS.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

- 1.- Xileno para desparafinar, 2x10 min.
- 2.- Etanol 100^o, 2x10 min.
- 3.- Etanol 96^o, 10 min.
- 4.- Etanol 80^o, 10 min.
- 5.- Etanol 50^o, 10 min.
- 6.- H₂O destilada, 5 min.
- 7.- Azul alción al 1 %, 30 min.

Azul alción:

1 g de azul alción (C.I. 74240)

3 ml de ácido acético

97 ml de H₂O destilada

8.- H₂O corriente, 3 min.

9.- Ácido peryódico al 0.5 % en H₂O destilada, 10 min.

10.- H₂O destilada, 3x1m.

11.- Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad (el tiempo depende de la temperatura y del propio reactivo; puede ser incluso 10 min).

Los grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) resultando en un

color rojo fucsia. Las secciones quedan de un color rosado.

Se puede dar un paso con una solución de metabisulfito potásico (o sódico) al 0.5 % durante 2 minutos para eliminar los residuos de reactivo de Schiff de la muestra.

12.- H₂O corriente, 5 min.

13.- H₂O destilada, varios lavados.

14.- Hematoxilina de Mayer, 5 min (es opcional).

15.- H₂O corriente, 5 min (es opcional).

16.- H₂O destilada, 20s (es opcional).

17.- Etanol 80^o, 5 min.

18.- Etanol 96^o, 5 min.

19.- Etanol 100^o, 2x10 min.

20.- Xileno, 2x10 min.

21.- Montado con medio de montaje

Resultados

Glúcidos: rosa intenso a fucsia

Mucopolisacáridos ácidos: azul

Consejos

El tiempo en reactivo de Schiff depende de la temperatura y de las condiciones en las que se encuentre el propio reactivo. Incluso se puede teñir en microondas durante menos de un minuto.

El reactivo de Schiff puede reutilizarse pero ha de conservarse en nevera y llevarlo a la temperatura deseada antes de su uso.

El reactivo de Schiff debe conservar un color amarillento y hay que descartarlo si se vuelve de color rosado. Si aparece precipitado blanco en el fondo del bote de reactivo se puede disolver de nuevo.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Azul alción (C.I. 74240)

Ácido peryódico

Reactivo de Schiff

(Opcional) Hematoxilina de Mayer

Ácido acético

H₂O destilada

Agua corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

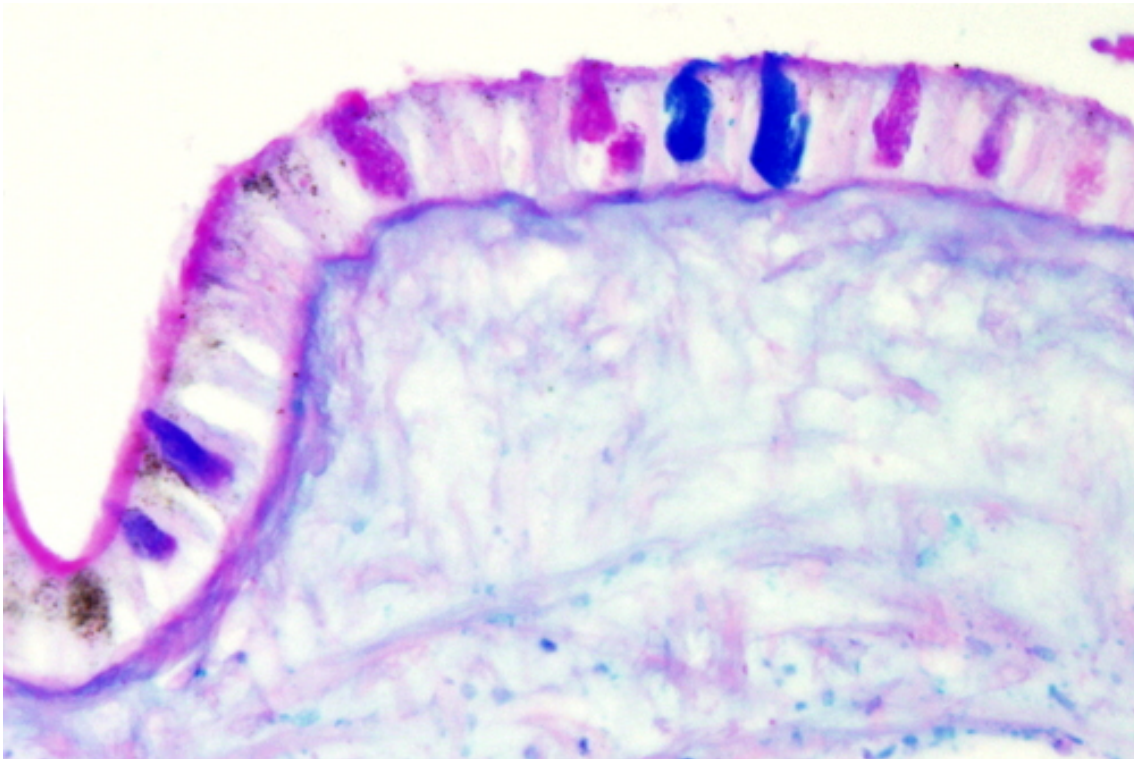


Figura 15: Sección de parafina teñida con PAS-azul alcian. Se observan mucocitos epiteliales de color azul, lo que indica que tiene sacáridos ácidos y otros rosados que son azúcares PAS positivos. La imagen proviene del epitelio de una oreja de mar (*Haliotis*).

13 PAS - hematoxilina

Este método de tinción se emplea para detectar polisacáridos en los tejidos, tanto glucógeno como mucopolisacáridos. También es una buena tinción para membranas basales y cartílago. Cualquier fijador es apropiado para esta técnica.

El mecanismo de coloración de la tinción de PAS no sólo es por afinidad eléctrica, como los colorantes habituales, sino que es una tinción histoquímica, es decir, se realiza una modificación química del tejido previa a la coloración. Es el ácido peryódico quien lleva a cabo esta reacción histoquímica.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100^o
- 3.- 10 min en etanol 96^o
- 4.- 10 min en etanol 80^o
- 5.- 10 min en etanol 50^o
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- Ácido peryódico al 0.5 % durante 5 min

Se oxidan las uniones carbono-carbono de los azúcares para formar grupos aldehídos.

- 8.- Varios lavados en H₂O destilada.
- 9.- Reactivo de Schiff durante 30 min en oscuridad (el tiempo depende de la temperatura)

Los grupos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (ácido sulfuroso con fucsina) resultando en un color rojo fucsia. Las secciones quedan de un color rosado intenso.

Se puede dar un paso con una solución de metabisulfito potásico (o sódico) durante 2 minutos para eliminar los residuos de reactivo de Schiff de la muestra.

- 10.- 5 min en agua corriente
- 11.- Varios lavados en H₂O destilada
- 12.- 5 min en hematoxilina de Mayer
- 13.- 15 min en agua corriente
- 14.- 20 s en H₂O₂O destilada
- 15.- 5 min en etanol 80^o
- 16.- 5 min en etanol 96^o
- 17.- 2x10 min en etanol 100^o
- 18.- 2x10 min en xileno
- 19.- Montado con medio de montaje

Resultados

Glúcidos: rosa intenso a fucsia

Núcleos: azul oscuro (en realidad se tiñe sólo la cromatina)

Consejos

El tiempo en reactivo de Schiff depende de la temperatura. Incluso se puede teñir en microondas durante menos de un minuto.

El reactivo de Schiff puede reutilizarse pero ha de conservarse en nevera y llevarlo a la temperatura deseada antes de su uso.

El reactivo de Schiff debe conservar un color amarillento y hay que descartarlo si se vuelve de color rosado. Si aparece precipitado blanco en el fondo del bote de reactivo se puede disolver de nuevo.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Ácido peryódico al 5 %

Reactivo de Schiff

Hematoxilina de Mayer

H₂O destilada

Agua corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

Estufa

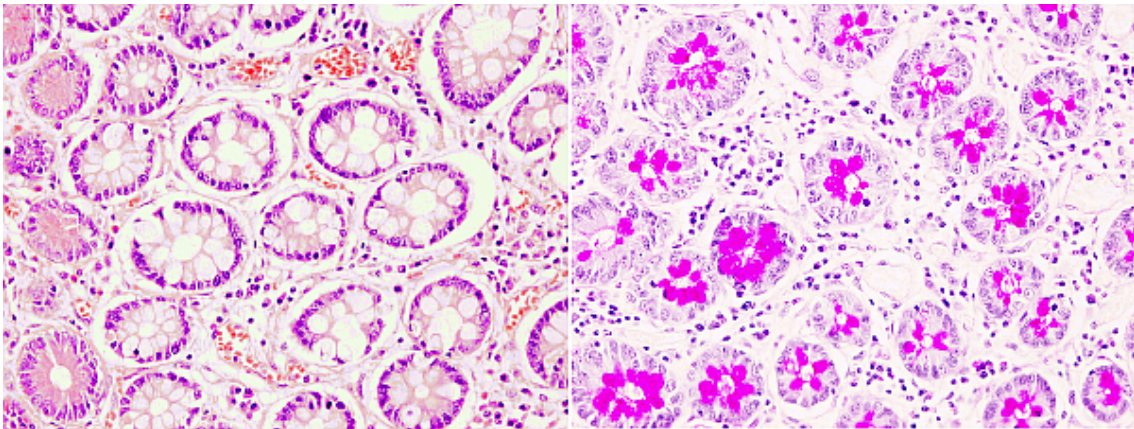


Figura 16: Secciones de parafina de 8 μm de grosor teñidas con hematoxilina y eosina (izquierda) y con PAS y hematoxilina (derecha). Las secciones pertenecen a campos similares del digestivo. La tinción de fucsia corresponde al reactivo de Schiff, el cual marca mucopolisacáridos de las células caliciformes.

14 Safranina - azul alción o verde rápido

Así como para observar tejidos animales es imprescindible usar colorantes que diferencien el núcleo del citoplasma, en el caso de los tejidos y órganos vegetales se usan colorantes con afinidad por las paredes celulares. La tinción vegetal por excelencia se caracteriza por usar la safranina, que presenta afinidad por las paredes lignificadas (paredes secundarias), y un segundo colorante que puede ser el azul alción o en ocasiones el verde rápido, ambos con afinidad por las paredes no lignificadas (paredes primarias).

Procedimiento

Partimos de muestras fijadas con FAA (formaldehído, alcohol, acético) y cortadas en vibratomo o en microtomo de congelación, o de cortes de inclusiones en parafina. Los cortes gruesos tendrán un grosor mínimo de 40-50 μ m y se manipulan con pincel, haciendo los pasos en los diversos líquidos en pocillos pequeños con pequeño volumen. Los cortes de parafina se procesan de manera convencional. Hay que emplear tiempos diferentes según el tipo de corte.

Safranina / azul alción

1. Etanol de 50°. 5 min.
2. Tinción en safranina. 1 min.

Safranina (C. I. 75100): 1 g.

Etanol 95o: 15.5 ml.

H₂O destilada: 14.5 ml.

Antes de usar, mezclar esta solución (solución madre) y etanol 50° (1:1).

3. H₂O destilada. 4 x 20 s.
4. Tinción en azul alción (1 %, pH 2.5). 3-5 min.

Azul alción (C.I. 74240): 1 g.

H₂O: 97 ml.

Ácido acético glacial 3 ml.

Poner en agitación al menos una hora y posterior-

mente filtrar. Se puede usar durante varios años.

5. H₂O destilada. 1 min.

6. Diferenciar con alcohol de 96° hasta que la mayor parte del tejido adquiera color azul claro. Es conveniente controlar el proceso de diferenciación bajo lupa.

7. Etanol 100°. 1 min.

8. Xileno. 1 min.

9. Montado con cubreobjetos y medio de montaje.

Safranina / verde rápido

1. Etanol de 50°. 5 min.

2. Tinción en safranina (1 %, pH 2.5). 3 - 5 min.

Safranina (C. I. 75100): 1 g.

Etanol 95°: 15.5 ml.

H₂O destilada: 14.5 ml.

Antes de usar, mezclar esta solución (solución madre) y etanol 50° (1:1).

3. H₂O destilada. 4 x 20 s.

4. Etanol 96°. 1min.

5. Tinción en verde rápido (1%). 60s.

Este colorante "compite" con la safranina y por tanto a más tiempo menos color rojo de la safranina quedará en la sección.

Etanol 100°: 50 ml.

Esencia de clavo: 50 ml.

Verde rápido (C. I. 42053): 1 g.

6. Etanol 100°. 1 min.

7. Xileno. 1 min.

8. Montado con cubreobjetos y medio de montaje.

Resultados

Paredes vegetales primarias: azul (con azul alción) o verde (con verde rápido).

Paredes vegetales secundarias: rojo.

Paredes con suberina y cutina: rojo.

Consejos

Generalmente el protocolo rápido para obtención de cortes histológicos vegetales supone el uso de vibratomo o micrótomo de congelación. Sin embargo, se pueden obtener buenas tinciones y calidad del tejido con inclusión en parafina y cortes por debajo de las 10 μm . pared vegetal es una barrera para el paso de sustancias.

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 90º y 100º

Ácido acético glacial

Esencia de clavo

Safranina (C. I. 75100)

Azul alcian (C.I. 74240)

Verde rápido (C. I. 42053)

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Placa de cerámica excavada

Pinceles

Portaobjetos

Cubreobjetos

Agitador magnético

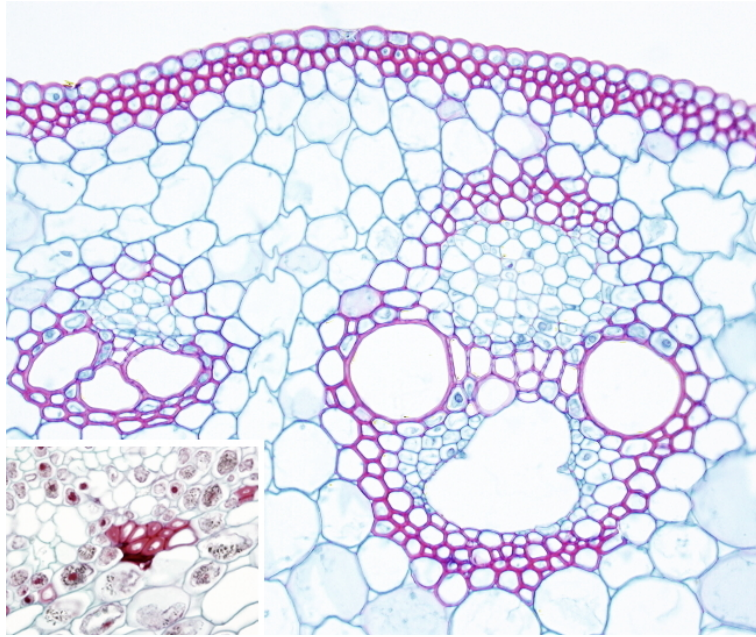


Figura 17: Corte en parafina teñido con safranina / azul alcían.



Figura 18: Corte en vibratomo teñido con safranina / verde rápido. (Imagen cedida por Rafael Álvarez Nogal. Departamento de Biología molecular. Universidad de León).

15 Safranina de Johansen - verde rápido

Así como para observar tejidos animales es imprescindible usar colorantes que diferencien el núcleo del citoplasma, en el caso de los tejidos y órganos vegetales se usan colorantes con afinidad por las paredes celulares. La tinción vegetal por excelencia se caracteriza por usar la safranina, que presenta afinidad por las paredes lignificadas (paredes secundarias), y un segundo colorante que puede ser el azul alcian o el verde rápido, ambos con afinidad por las paredes no lignificadas (paredes primarias). La safranina O de Johansen combinada con el verde rápido es una buena técnica para teñir tejidos vegetales y diferenciar entre paredes celulares primarias y secundarias.

Procedimiento

Partimos de muestras fijadas con FAA (formaldehído, alcohol, acético) e incluidas en parafina. Los cortes tendrán un grosor de 5 a 10 μm . También podemos teñir cortes gruesos obtenidos con vibratomo o microtomo de congelación, pero entonces hay que ajustar los tiempos.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en H₂O destilada
7. 24 h en safranina O de Johansen.

2-metoxietanol (Etilen glicol monometil éter): 50 ml

Etanol 100^o: 25 ml

H₂O destilada: 25 ml

Acetato sódico: 1 g

Disolver

Formol 37 % (formalina): 2 ml

Safranina O (C.I. 50240): 1 g

8. 2 x 5 min en H₂O destilada.

9. 10 s en etanol 96^o + 0.5 % de ácido pícrico o ácido clorhídrico en agitación suave.

10. 10 s en etanol 96^o + 4 gotas de hidróxido amónico en agitación suave.

11. 10 s en etanol 100^o en agitación suave.

La tinción con safranina es regresiva, luego la intensidad de color rojo se controla con los tiempos en los tres pasos anteriores. Si son demasiado largos la coloración se puede perder por completo.

12. 20 s en verde rápido con agitación suave.

2-metoxietanol (Etilen glicol monometil éter): 33.3 ml

Etanol 100^o: 33.3 ml

Metil salicilato: 33.3 ml

Verde rápido FCF (C.I. 42053): 0.05 g

13. 5 a 10 s en solución de aclarado diluida con agitación suave.

Solución de aclarado diluida

Solución de aclarado (ver más abajo): 50 ml

Etanol 100^o: 25 ml

Xileno: 25 ml

14. 10 s en solución de aclarado con agitación suave.

Solución de aclarado

Metil salicilato: 50 ml

Etanol 100^o: 25 ml

Xileno: 25 ml

15. 2x10 min xileno

16. Montado en medio de montaje.

Consejos

El control de los tiempos en los pasos del protocolo tras los colorantes es fundamentales para una buena tinción.

La safranina es una tinción regresiva luego el grado de tinción se controla con el tiempo de lavado en los alcoholes posteriores, mientras que el grado de coloración con verde rápido se consigue variando el tiempo en el propio colorante.

Al ser conveniente una agitación suave en cada paso de aclarado, la tinción ha de hacerse individualmente a cada portaobjetos.

Productos

Xileno

Etol de 50º, 70º, 90º y 100º

Acetato sódico

Ácido clohídrico

Safranina O (C.I. 50240)

Formol 37%

2-metoxietanol

Metil salicilato

Verde rápido FCF (C.I. 42053)

Solución saturada de ácido pícrico

Hidróxido amónico

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Pinzas

Portaobjetos

Cubreobjetos

Botes para almacén de soluciones

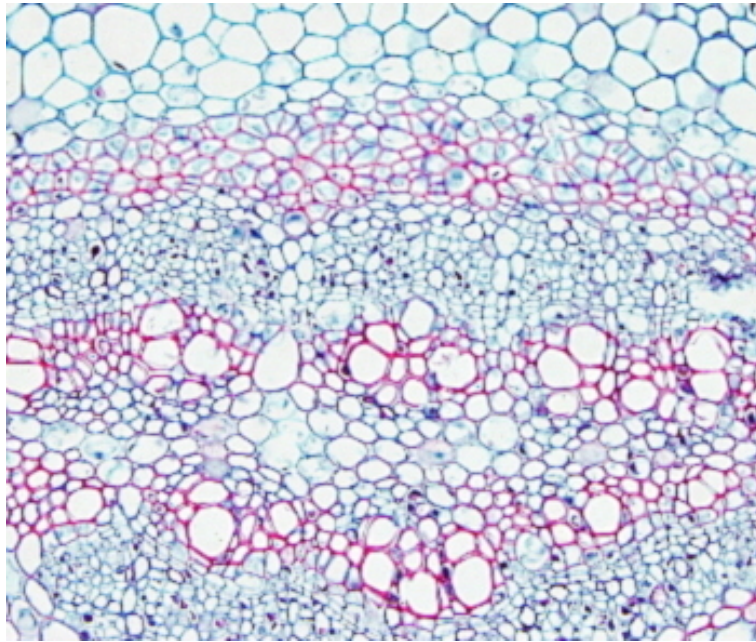


Figura 19: Corte en parafina de una hoja de roble teñido con safranina de Johansen-verde rápido.

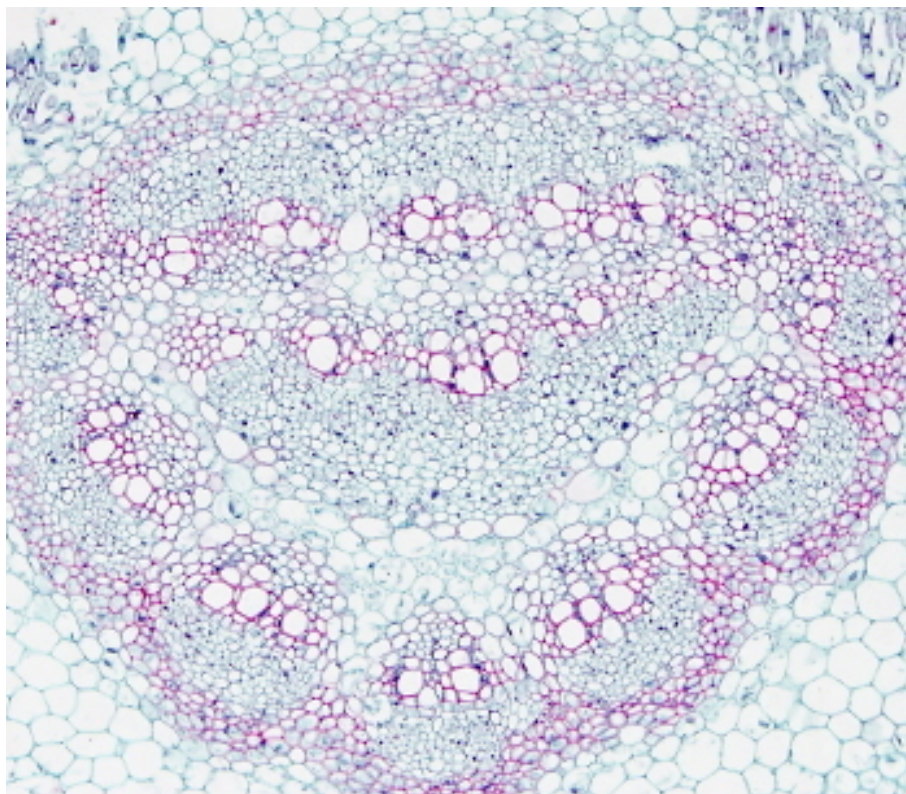


Figura 20: Corte en parafina de una hoja de roble teñido con safranina de Johansen-verde rápido

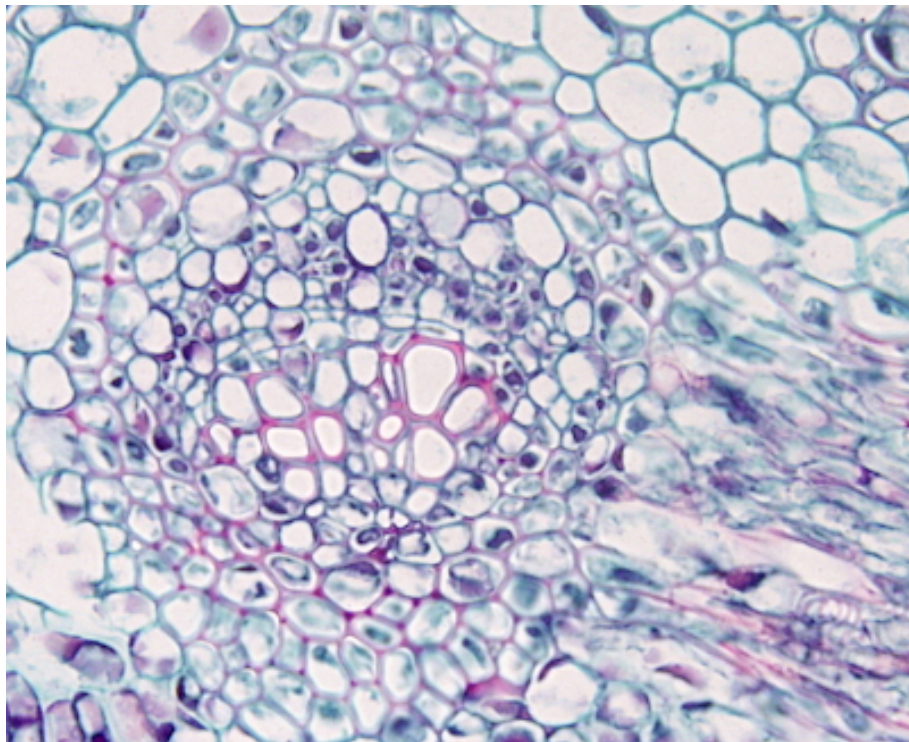


Figura 21: Corte en parafina de una hoja de roble teñido con safranina de Johansen-verde rápido

16 Tinción de Nissl

La tinción de Nissl es muy usada en tejido nervioso, sobre todo en encéfalo y médula espinal, para estudiar la organización de las neuronas en núcleos y capas, aunque sirve para cualquier tejido. Tiñe estructuras ácidas como el núcleo y los cúmulos de ribosomas. El colorante en el que se basa la tinción es normalmente el azul de toluidina o el violeta de cresilo. El más usado es el violeta de cresilo, que es el que se describe más abajo.

En el citoplasma de las neuronas aparecen unas estructuras fuertemente teñidas con esta tinción denominadas cuerpos de Nissl, que se corresponden con acumulaciones de retículo endoplasmático rugoso. Aquí se tiñen el ARN ribosómico y el ARN mensajero que se está traduciendo.

Procedimiento

Partimos de muestras fijadas con formaldehído (fijador Bouin o paraformaldheído) e incluidas en parafina.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100º
- 3.- 10 min en etanol 96º
- 4.- 10 min en etanol 80º
- 5.- 10 min en etanol 50º
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- 5-10 min solución de violeta de cresilo al 0.1 %

Hay varias maneras de preparar el violeta de cresilo:

a) 0.1 g de violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada. Justo antes de usar se añaden unas gotas de ácido acético glacial y se filtra.

b) 0.1 g de violeta de cresilo en 100 ml de agua destilada, más 0.25 ml de ácido acético glacial. Disolver a 60 ºC hasta la disolución del violeta de cresilo. Guardar en oscuridad y filtrar antes de usar.

c) *Tampón acetato:* Solución A: 0.6 ml de ácido acético en 100 ml de agua destilada; solución B: 1.36

g de acetato sódico en 100 ml de agua destilada. Mezclar las soluciones A y B en una proporción de 9 a 1 (9 de A y 1 de B) y ajustar el pH a 3.7. Mezclar violeta de cresilo al 1 % en agua destilada y tampón acetato en una proporción de 1:1. Filtrar y usar.

En el caso de que sean secciones gruesas se puede usar la solución calentada a 37 ºC.

8.- Lavado rápido en H₂O destilada.

9.- Diferenciar en etanol de 96º durante varios minutos y comprobar el proceso con el microscopio.

10.- 2x10 min en etanol 100º.

11.- 2x10 min en xileno.

15.- Montado con medio de montaje.

Resultados

Núcleos: rosa - violeta.

Retículo endoplasmático rugoso: púrpura.

Consejos

La calidad de la tinción depende del tiempo de diferenciación durante la deshidratación final, luego los tiempos en estos alcoholes afectarán al resultado final.

Si permanecen en el tejido gotas de lípidos o mielina (cortes de vibratomo, microtomo de congelación o de criostato), y no se quiere que interfieran con la tinción de los cuerpos celulares, las secciones pueden deshidratar en etanol creciente y volver a hidratar para eliminar tales lípidos.

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º, 96º y 100º

Violeta de cresilo

Ácido acético

Acetato sódico

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Filtro de papel

Probeta

Botes

Cesta para portas

Cubreobjetos

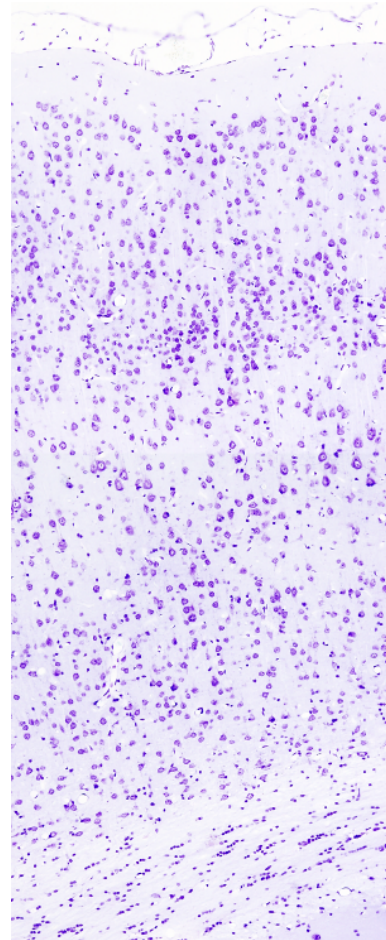


Figura 22: Sección de corteza dorsal de ratón teñida con violeta de cresilo.

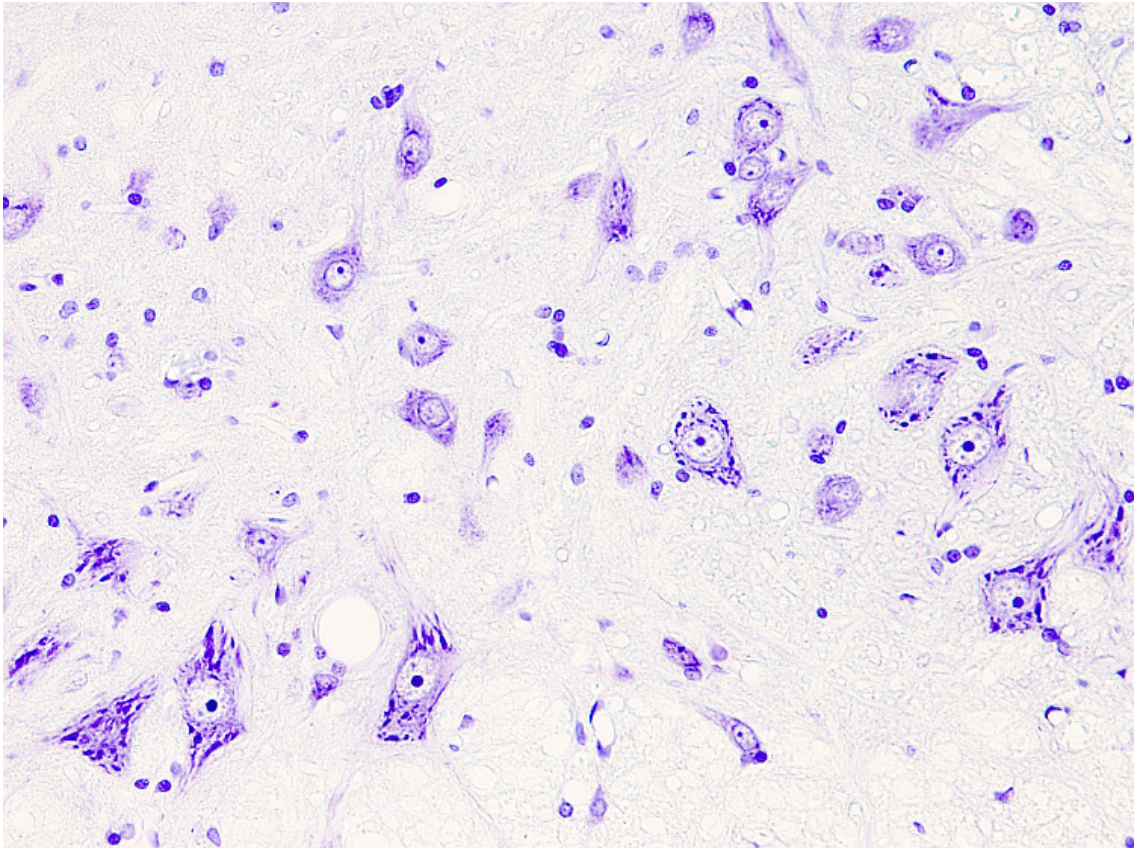


Figura 23: Imagen de motoneuronas de la médula espinal de rata. Los grumos oscuros que aparecen en el citoplasma son los cuerpos de Nissl.

17 Tinción de Woelcke

Esta tinción se usa para teñir la mielina del sistema nervioso central, aunque no sirve para la del sistema nervioso periférico. Es útil en estudios de alteraciones de los tractos nerviosos o del tejido nervioso en general. También se emplea en casos de muerte celular puesto que las neuronas degeneradas aparecen completamente negras, mientras que en las sanas sólo se tiñe el núcleo.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas en formol o Bouin e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en H₂O destilada.
7. 16-18 h en solución de sulfato férrico amónico al 2,5 % en H₂O destilada.

Solución de sulfato férrico amónico 2.5 g en 100 ml de agua destilada. Hay que usar el mortero para triturar y disolver bien los cristales y asegurarse de que la solución tiene un color violáceo.

8. 1.5 a 2 h en solución de trabajo de hematoxilina.

(a) Hematoxilina alcohólica: 10 g de hematoxilina en 100 ml de etanol 100^o.

(b) Solución saturada de carbonato de litio: 1,45 g de carbonato de litio en 99 ml de H₂O destilada.

Solución de trabajo de hematoxilina: 45 ml de H₂O destilada + 10 ml de (a) + 7 ml de (b).

Preparar la solución de trabajo de hematoxilina siguiendo el orden indicado. No agitar demasiado para mezclar los 3 componentes. Esta solución se puede usar durante una semana aproximadamente.

9. Etanol de 80^o hasta aclarar el fondo. El tiempo depende del proceso de aclarado del color de la tinción.

10. 5 min en etanol 96^o
11. 2x10 min en etanol 100^o
12. 2x10 min en xileno.
13. Montado con medio de montaje.

Resultados

Glía y nucléolo: negros.

Vainas de mielina: azul oscuro.

Neuronas en degeneración: soma negro.

Fondo: claro.

Consejos

Es importante no sobreteñir con la hematoxilina puesto que se tendría una tinción de fondo muy oscura que oculta la mielina.

Los tiempos en los alcoholes puede variar para conseguir la tinción deseada, sobre todo el etanol de 80^o tras la solución de trabajo de hematoxilina.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Hematoxilina cristalizada (C.I. 75290)

Sulfato férrico amónico

Carbonato de litio

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Mortero

Cubreobjetos

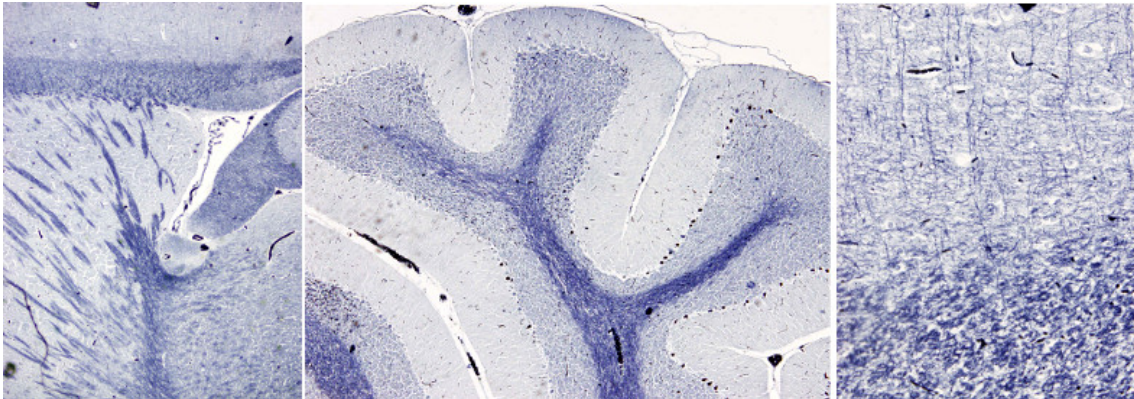


Figura 24: Secciones de 8 μm de grosor teñidas con el protocolo de Weelcke, usado para resaltar las vainas de mielina en un cerebro de rata.

18 Tricrómico de Gomori

Esta tinción se usa para destacar el tejido muscular y el tejido conectivo propiamente dicho.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas en formol o Bouin e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar.
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en agua destilada.
7. 1h en líquido de Bouin a 56-60 °C, o 24 h a temperatura ambiente.

La solución de Bouin actúa como mordiente.

8. Varios lavados en H₂O destilada hasta que desaparezca el color amarillo.

9. 10 min en hematoxilina de Weigert.

Si la solución es vieja puede ser necesario incrementar el tiempo de tinción.

10. 5-10 min en agua corriente.

Si las muestras pierden su color o se tiñen débilmente, se puede volver a la Hematoxilina férrica de Weigert durante 5 minutos más. Se puede comprobar la tinción mirando por el microscopio.

11. 15 min en solución tricrómica.

Solución tricrómica:

0.6 g cromo2R (CI 16570).

0.3 g verde luz (CI 42095).

0.8 g ácido fosfotúngstico.

1 ml ácido acético glacial.

Hasta 100 ml de agua destilada.

12. 1 min en ácido acético al 1 %.

Este es un paso de diferenciación. Si las muestras no están bien teñidas o no hay suficiente coloración roja en la muestra, las secciones se pueden dejar más tiempo en la solución tricrómica.

13. 30 s en H₂O destilada

14. 1 min en etanol 100^o

15. 1 min en etanol 100^o

16. 2 min en xileno

16. 3 min en xileno

17. Montado de las secciones

Resultados

Colágeno: verde oscuro-celeste.

Músculo: rojo.

Citoplasma: rosado.

Núcleos: negro.

Consejos

La hematoxilina férrica de Weigert como solución de trabajo no debe estar más de 10 días preparada, dado que pierde efectividad. También es recomendable filtrarla antes de ser utilizada, para evitar posibles artefactos.

La solución tricrómica debe tener un pH de 2, para una mejor tinción.

La diferenciación con el ácido acético se puede hacer con menos concentraciones de acético para controlar mejor la diferenciación.

La deshidratación final debe ser rápida para que no se pierda el colorante.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Hematoxilina de Weigert

Bouin

Cromo2R (CI 16570)

Verde luz (CI 42095)

Ácido fosfotúngstico

Ácido acético glacial

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Vasos de precipitado

Agitador magnético

Botes para colorantes

Cubreobjetos

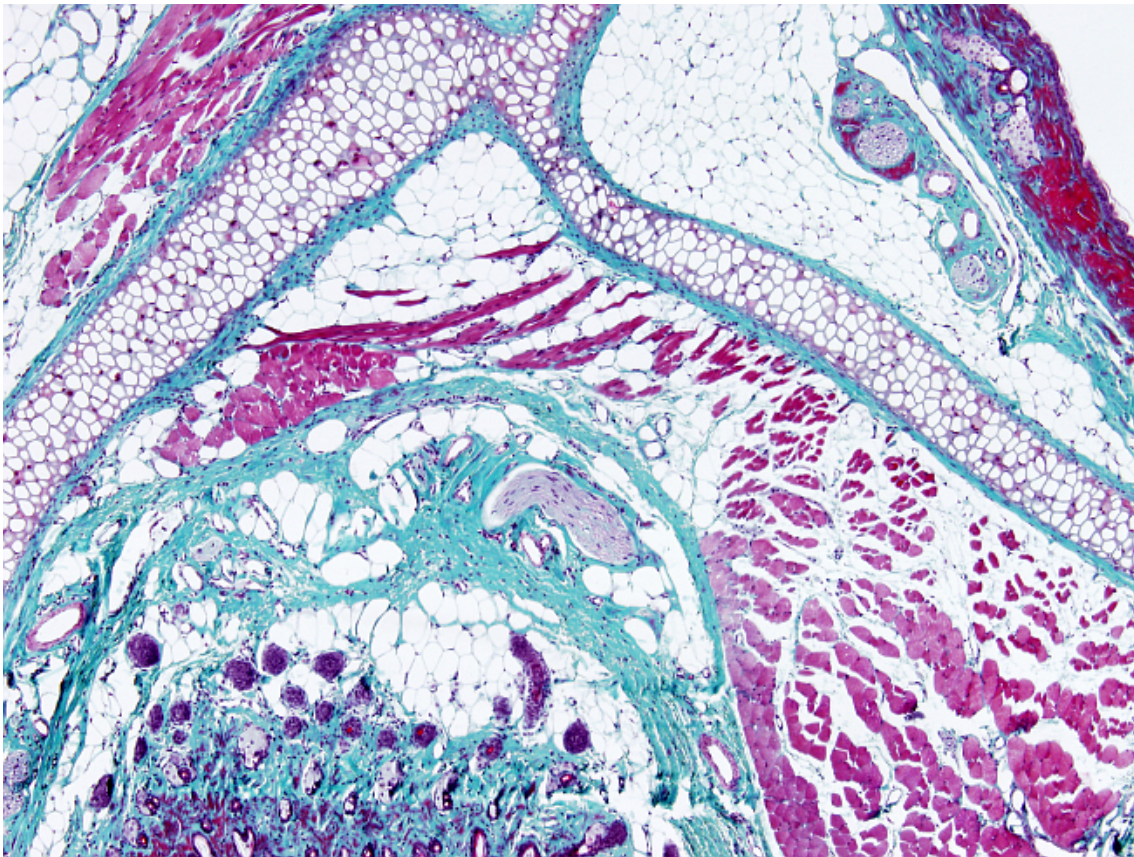


Figura 25: Sección de parafina de 8 μm de grosor teñida con tricrómico de Gomori, en oreja de rata.

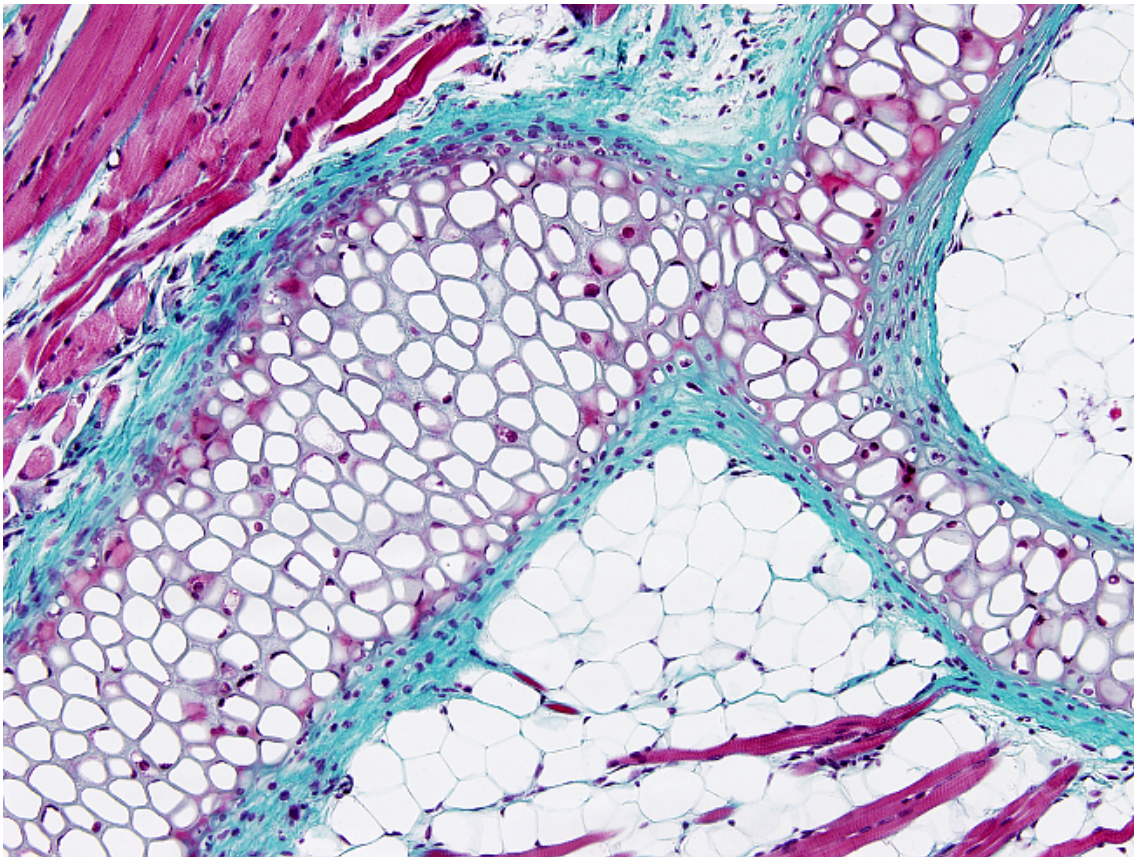


Figura 26: Sección de parafina de 8 μm de grosor teñida con tricrómico de Gomori, en oreja de rata.

19 Tricrómico de Masson

Como su nombre indica, esta tinción emplea tres colorantes. Son la hematoxilina, la fucsina y el verde luz. Es muy útil para poner de manifiesto las fibras de colágeno, y el conectivo en general, en comparación con las células musculares o epitelios. Se emplea mucho en la diagnosis de procesos tumorales. Hay muchas variantes de esta tinción adaptadas a las necesidades particulares de cada laboratorio.

Procedimiento

Protocolo modificado por Serxio Fernández Fidalgo. Partimos de muestras que han sido fijadas en solución de Bouin e incluidas en parafina. Se han obtenido secciones de unas 8 μm adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en H₂O destilada

Si el tejido no se ha fijado con BOUIN es recomendable sumergir las secciones en solución de Bouin, el cual actúa como mordiente, durante 24 h a temperatura ambiente o 1 h a 56 - 60 °C.

7. 3x3 min en H₂O destilada.
8. 5 min en Hematoxilina férrica de Weigert (10 min si el colorante lleva más de 5 días hecho).
9. 5 min en agua corriente para diferenciación.

Cuando se aprecie el viraje de color se puede comprobar si la tinción es adecuada al microscopio, pudiendo volver a meter las muestras en la hematoxilina si no es suficientemente intensa.

10. 3 min lavado en H₂O destilada.
11. 5 min en fucsina-escarlata.

Preparación de Fucsina-Escarlata:

90 ml de Escarlata de Biebrich (C.I. 26905) al 1% en H₂O destilada.

9 ml de fucsina ácida en solución acuosa al 1% en H₂O destilada.

1 ml de ácido acético glacial.

12. 2 min lavado en H₂O destilada.

Este es otro paso en el que se puede comprobar si la coloración es satisfactoria, teniendo en cuenta que tendrá un color algo más oscuro e impreciso ya que la diferenciación se realiza varios pasos más adelante. Si la tinción es muy clara se devuelven las muestras a la fucsina-escarlata, pero si es excesiva, con dejar las muestras en agua más tiempo es suficiente para decolorar, ya que se va perdiendo colorante con el tiempo.

13. 15 min en ácido fosfomolibdico al 5% en agua destilada.

Es imprescindible para que el verde luz tiña correctamente el tejido. Es recomendable que la disolución de ácido fosfomolibdico sea fresca y usarla muy pocas veces. Este paso también elimina color de la fucsina-escarlata de las secciones por lo que hay que tenerlo en cuenta en los pasos previos. Si no se ve una buena tinción se puede volver a pasos anteriores.

14. 10 min en verde luz (CI 42095) al 2 % (puede ser sustituido por azul de anilina).

Verde luz (CI 42095) 2 g más ácido acético glacial 2 ml en 100 ml de H₂O destilada.

15. Unos segundos en agua destilada.

Podremos distinguir a simple vista si el tejido ha captado suficiente colorante, o también se puede observar al microscopio si se prefiere. En caso de que no se haya teñido adecuadamente se puede retroceder sin problemas y volver a teñir con verde luz, pero siempre pasando antes por el ácido fosfomolibdico. Si la tinción es excesiva no hay mayor problema ya que la diferenciación con agua acidificada y el alcohol de 96^o con el que se comienza la deshidratación van reduciendo el verde luz. Así que con alargar estos pasos sería suficiente.

16. 3 min de diferenciación con ácido acético al 1% en H₂O destilada.

Con 1 min es suficiente si las muestras no llevan un exceso de verde luz. Más tiempo puede decolorar demasiado.

17. Deshidratado rápido, unos segundos, en etanol de graduación creciente: 80º, 96º y 100º

El paso de etanol de 96º debe durar sólo unos pocos segundos, comprobando siempre que las partes teñidas con fucsina-escarlata vayan virando adecuadamente a un color mas rosado y claro, pero no demasiado tiempo ya que decoloraría demasiado las partes teñidas con verde luz. Para un buen contraste es imprescindible realizar bien este paso. Si por cualquier razón la tinción no nos parece adecuada se puede volver atrás y repetir cualquiera de los pasos con colorantes, incluso desde la hematoxilina pero siempre continuar a partir de ese paso siguiendo todos los demás. Como las muestras se habrán deshidratado un poco con el alcohol de 96º antes de nada habrá que meterlas en H₂O destilada para rehidratarlas y poder volver a pasos anteriores.

18. 2x10 min en xileno.

19. Montado con medio de montaje.

Resultados

Colágeno: verde azulado.

Músculo: rojo, marrón.

Citoplasma: rosado.

Núcleos: negro.

Citoplasma: rosado.

Consejos

En este protocolo se puede volver hacia atrás sin problemas, pero no más de tres o cuatro veces puesto que el tejido va perdiendo la capacidad de retener los colorantes.

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º, 96º y 100º

Hematoxilina férrica de Weigert

Fucsina escarlata

Ácido fosfomolibdico al 5 %

Verde luz

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

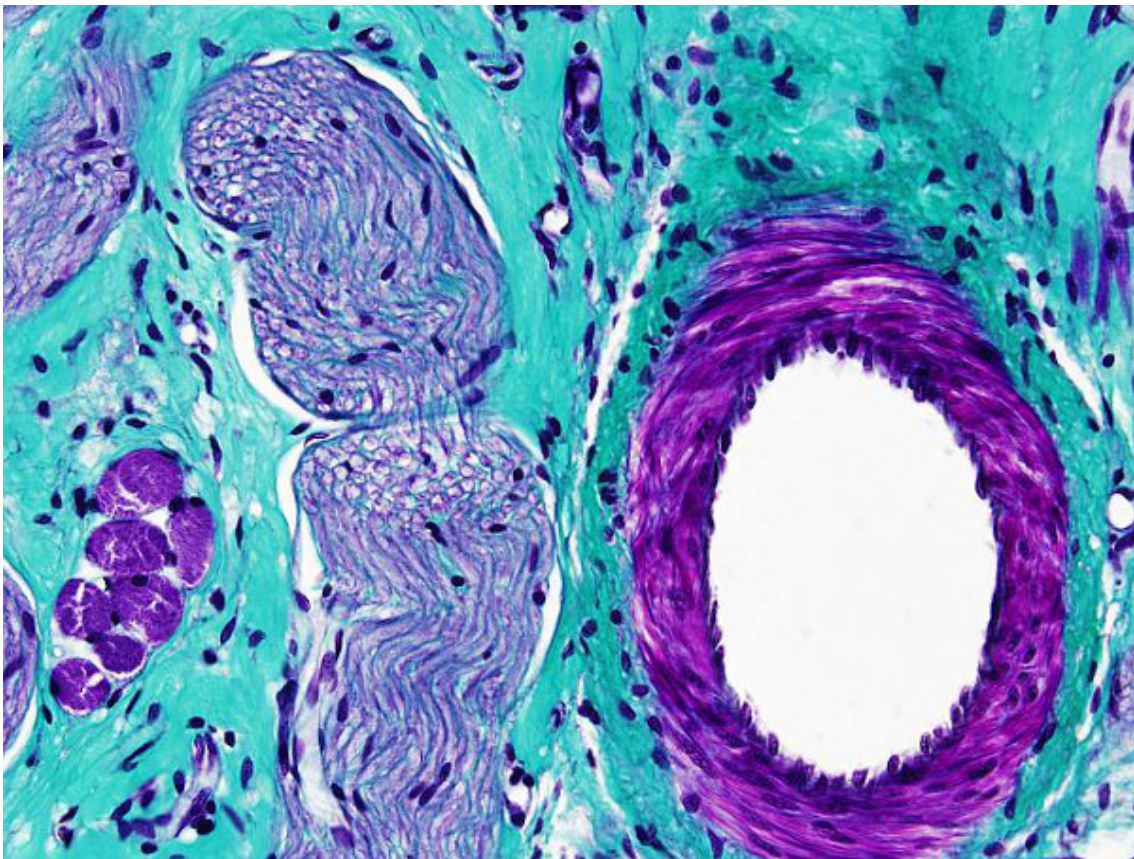


Figura 27: Sección de parafina de 8 μm de grosor teñidas con tricrómico de Masson. Zona profunda de la lengua de rata.

20 Tricrómico de van Gieson

Es una tinción donde se combina la tinción nuclear mediante la hematoxilina férrica de Weigert con la mezcla ácido pícrico-fucsina ácida, la cual permite diferenciar cromáticamente las fibras colágenas del tejido conjuntivo.

Procedimiento

Cualquier fijador es válido para esta tinción. Las muestras se incluyen en parafina y se cortan en secciones de unas 8 μm que se adhieren a portaobjetos recubiertos con gelatina.

1. 2x10 min en xileno para desparafinar.
2. 2x10 min en etanol 100^o
3. 10 min en etanol 96^o
4. 10 min en etanol 80^o
5. 10 min en etanol 50^o
6. 5 min en H₂O destilada

7. 10 min en hematoxilina férrica de Weigert (este colorante está formado por dos soluciones que se mezclan en el momento de la tinción: ver documento con recetas).

8. 5 min en H₂O corriente
9. 1 min en H₂O destilada
10. 4 a 5 min con picrofucsina de Van Gieson.

Picrofucsina de Van Gieson

Solución A. Fucsina ácida 1%.

1 g de fucsina ácida (C.I. 75290).

100 ml de H₂O destilada

Solución B. Solución acuosa saturada de ácido pícrico.

Solución de trabajo.

1 ml de solución A.

45 ml de solución B.

La solución de trabajo se realiza en el momento de

la tinción aunque se puede dejar madurar unas semanas. Según el caso, el tiempo de tinción puede variar. De cualquier manera, antes de su uso se le agregan 0.25 ml de ácido clorhídrico. Tras la coloración con esta mezcla no se debe lavar con agua normal ya que ocasiona una coloración más débil, y es por ello que se recomienda usar el agua acidificada.

11. 2 x 30 s en H₂O acidificada.

Preparación del H₂O acidificada:

0.5 ml de ácido acético

100 ml de H₂O destilada

12. 3 x 1min en etanol 100^o

13. 2 x 5 min en xilol.

14. Montado con medio de montaje.

Resultados

Colágeno: rojo rosado.

Músculo: amarillo anaranjado.

Citoplasma: amarillo anaranjado.

Núcleos: negro azulado.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 90^o, 96^o y 100^o

Hematoxilina de Weigert

Fucsina ácida (C.I. 75290)

Ácido pícrico

Ácido acético

Ácido clorhídrico

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Cesta para portas, Cubreobjetos

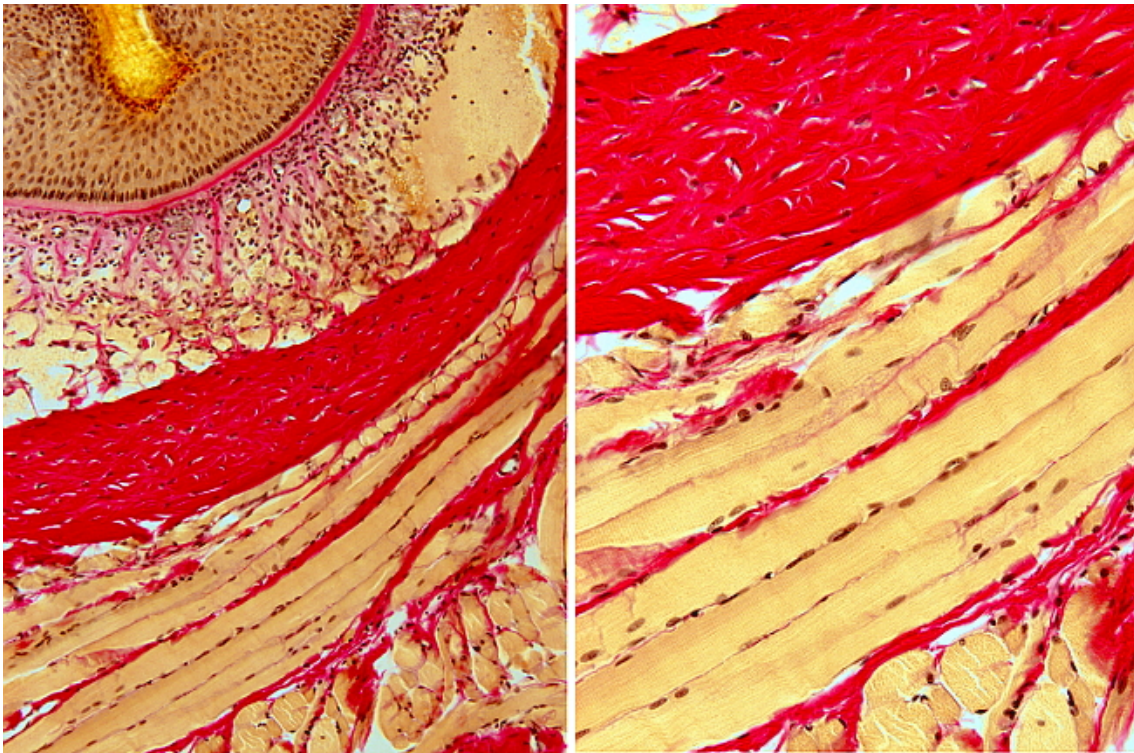


Figura 28: Sección de 8 μm de grosor de una muestra incluida en parafina teñida con tricrómico de Van Gieson. Zona profunda de la dermis.

21 Impregnación de Golgi en corte

La observación de las neuronas tiene la complicación de que es muy difícil poner de manifiesto sus árboles dendríticos y axónicos. Mediante la técnica de Golgi, que es una impregnación de plata, se pueden observar neuronas individuales, tanto el soma como sus dendritas y axones. Esta técnica tiene la peculiaridad de que sólo revela un pequeño porcentaje de las neuronas, con lo cual se pueden estudiar de manera prácticamente individualizada. También es capaz de impregnar a los astrocitos. La base química de esta reacción es desconocida, así como el porqué unas neuronas se impregnan y otras no. Esta técnica permitió observar por primera vez la morfología de las neuronas.

La impregnación de Golgi se aplica a bloques de tejido nervioso relativamente gruesos (0,5 a 1 cm aproximadamente). A continuación describimos una adaptación de esta técnica a cortes gruesos de unos 100 100 μm de grosor.

Procedimiento

Partimos de cerebros o médula espinal que han sido fijadas preferentemente con paraformaldehído tamponado al 4 %. El tejido se corta en un vibratomo en secciones de 100 a 300 μm de grosor. Los cortes se usan en flotación y pueden quedar en nevera durante días antes de su uso.

1.- 10 min tetróxido de osmio al 1 % en tampón fosfato (PB 0.1 M pH 7.3)

El tetróxido de osmio es muy tóxico y volátil, luego su manejo ha de hacerse en campana extractora y con guantes. Una vez usado es necesaria su inactivación con aceite de maíz.

2.- 2x10 min en PB.

3.- 2-3 horas en dicromato potásico al 3.5 % en agua destilada.

4.- Montado de los cortes en un portaobjetos con un pincel.

5.- Eliminación del exceso de dicromato potásico con un papel del filtro, sin que el corte se llegue a secar.

6.- Colocación de un cubreobjetos sobre la sección procurando que no queden burbujas entre el cubre y la superficie de la sección.

7.- Añadir entre el portaobjetos y el cubreobjetos, por capilaridad, nitrato de plata al 1.5 %. La solución debe tocar los bordes del corte, pero no las superficies de corte.

Con una micropipeta se añaden lentamente gotas de la solución de manera que se extiendan por capilaridad.

8.- Colocar en cámara húmeda y en oscuridad hasta la aparición de las neuronas impregnadas.

El tiempo de impregnación es variable y puede durar desde varias horas hasta uno o dos días. De cualquier manera el desarrollo de la reacción se puede controlar con el microscopio y se detiene cuando se estime oportuno.

9.- Deshidratación muy rápida. Varios segundos en etanol de 50^o, 80^o 96^o y 100^o

Para que la impregnación se mantenga intensa y duradera es preciso hacer una deshidratación rápida, aunque no debe quedar agua. Tras ello se incluyen las secciones en resinas de tipo epoxy empleadas en las técnicas de microscopía electrónica.

10.- 2x5 min en óxido de propileno.

11.- Resina tipo epoxy toda la noche a temperatura ambiente.

12.- 48 h polimerización a 60 °C

Las secciones se colocan sobre un portaobjetos, se añade la resina y se cubren con un cubreobjetos. Se pueden colocar algo de peso sobre el cubreobjetos para que las secciones queden bien estiradas.

Resultados

Neuronas: marrón oscuro a negro. Astrocitos: marrón oscuro a negro. Resto de tejido: marrón muy claro, anaranjado pálido. Vasos sanguíneos: a veces se marca el endotelio de color oscuro.

Consejos

El tiempo en tetróxido de osmio parece afectar a la cantidad y rapidez de neuronas marcadas pero es variable para cada muestra.

Es importante que la solución de nitrato de plata sea transparente, nada de turbidez, lo que indica que la solución está en buen estado.

La permanencia prolongada en los alcoholes durante la deshidratación (más de dos o tres minutos) atenúa el marcaje

El montaje con medios de montaje convencionales usados tras el xileno no permite la perdurabilidad de la impregnación y termina por desvanecerse.

Productos

Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º, 96º y 100º

Tetróxido de osmio

Dicromato potásico

Nitrato de plata

Resina tipo epoxy

H₂O destilada

Material

Cámara húmeda

Cubreobjetos

Papel de filtro

Pinceles

Estufa a 60 °C

Aceite de maíz

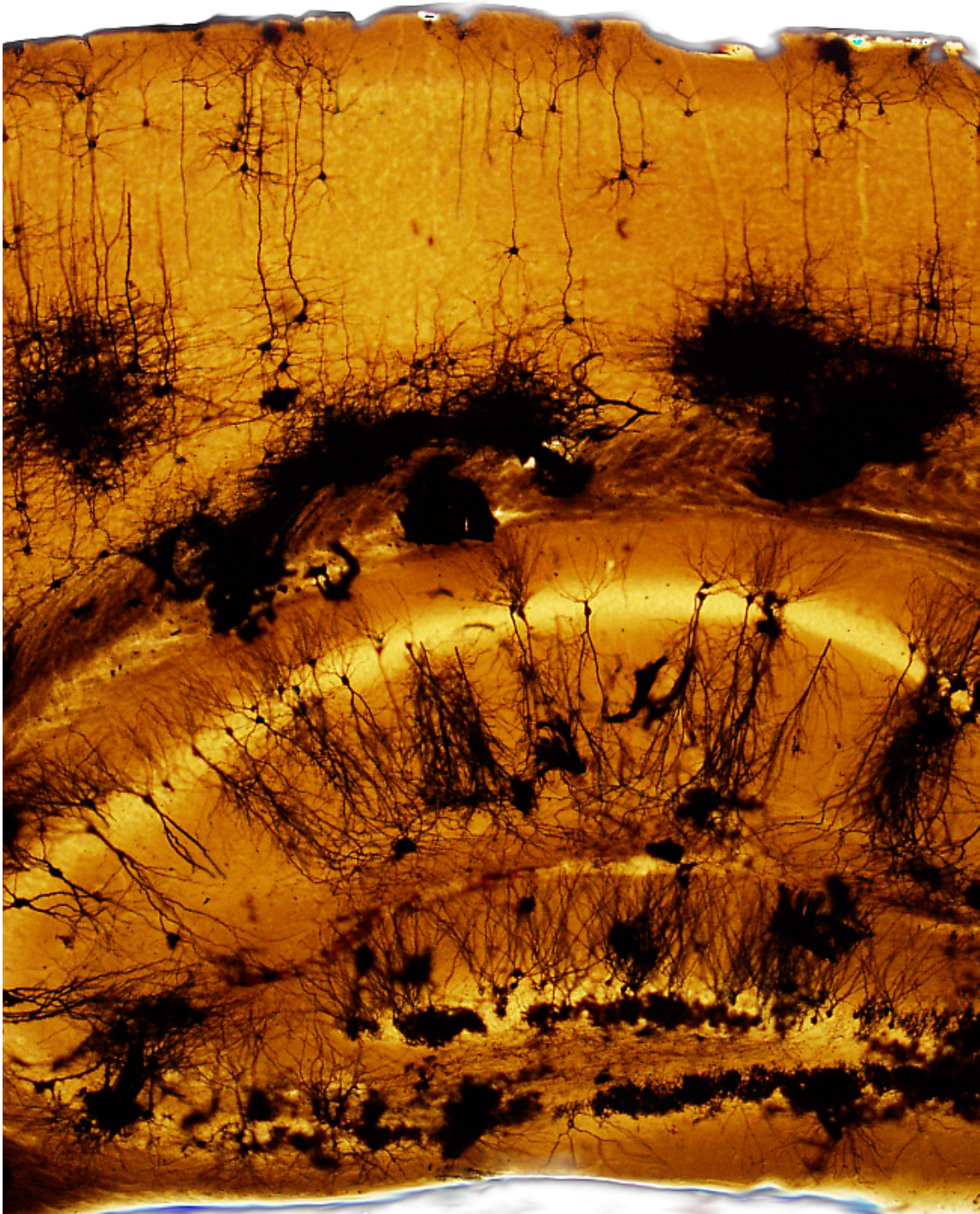


Figura 29: Neuronas impregnadas por el método de Golgi en corte

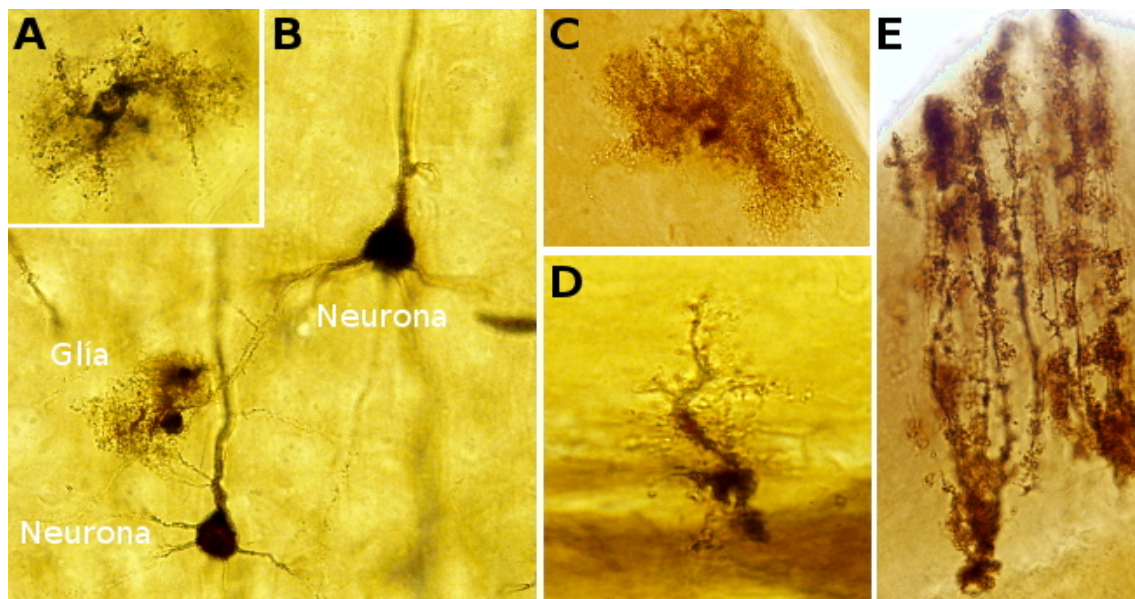


Figura 30: Neuronas (B) y células gliales impregnadas por el método de Golgi en corte

22 Nitrato de plata

El protocolo de impregnación de nitrato de plata se utiliza para poner de manifiesto tractos de fibras y cuerpos celulares en el sistema nervioso. La técnica se realiza sobre muestras de cerebro o médula espinal de unos milímetros de espesor.

Procedimiento

En esta técnica es importante el fijador usado.

1.- Fijador. 16-18 h en refrigerador por inmersión.

Hidrato de cloral 4 g

Etanol 100 °C 20 ml

Agua destilada 25 ml

Amoniaco para ajustar el pH a 8,6

2.- Etanol absoluto 24 h.

3.- Nitrato de plata 1.5 % en agua destilada 5 días a 37 °C en oscuridad.

4.- Agua destilada, dos lavados de 30 segundos.

5.- Reducción. 24 h a temperatura ambiente.

Hidroquinona 0.5g

Agua destilada 40 ml

Formol 3.5 ml

6.- Etanol 70° 3 x 1 min.

7.- Inclusión en parafina.

8.- Secciones a 10 µm.

9.- Desparafinado y deshidratación con tiempos cortos, no más de 5 min en cada paso.

Se puede dar un contraste con hematoxilina durante la hidratación para resaltar los núcleos de las neuronas y glía, y así ver los tractos de fibras en el contexto de las diferentes regiones nerviosas.

10.- Deshidratación y montaje.

La deshidratación debe ser rápida, no más de 5 min por alcohol y líquido intermediario. El medio

de montaje puede afectar a la calidad de la impregnación. Un buen resultado se consigue mediante el uso como medio de montaje a resinas tipo epoxy (empleadas en las inclusiones para microscopía electrónica) y como líquido intermediario al óxido de propileno. En estos casos hay que solidificar el medio de montaje mediante polimerización a 60 °C durante 24 h.

Resultados

Neuronas: marrón pálido con nucléolo patente.

Fibras (axones): negro, marrón.

Consejos

Los resultados son muy variables, es recomendable usar productos de buena calidad.

El tiempo de reducción es variable y se decide terminarlo en función del color de la pieza.

No es recomendable usar piezas muy grandes, no más de 1 centímetro de tamaño.

Los procesos de eliminación de parafina, hidratación, deshidratación y montaje de secciones han de ser rápidos.

Productos

Etanol de 50°, 70°, 80°, 90°, 96° y 100°

Hidrato de cloral

Nitrato de plata

H₂O destilada

Amoniaco

Hidroquinona

Formol

Óxido de propileno

Resina tipo epoxy

Material

Recipientes y viales

Estufa a 60 °C

Estufa a 37 °C



Figura 31: Técnica de nitrato de plata en cerebro. (Imágenes cedidas por la Dra. Rosa Álvarez Otero. Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo)

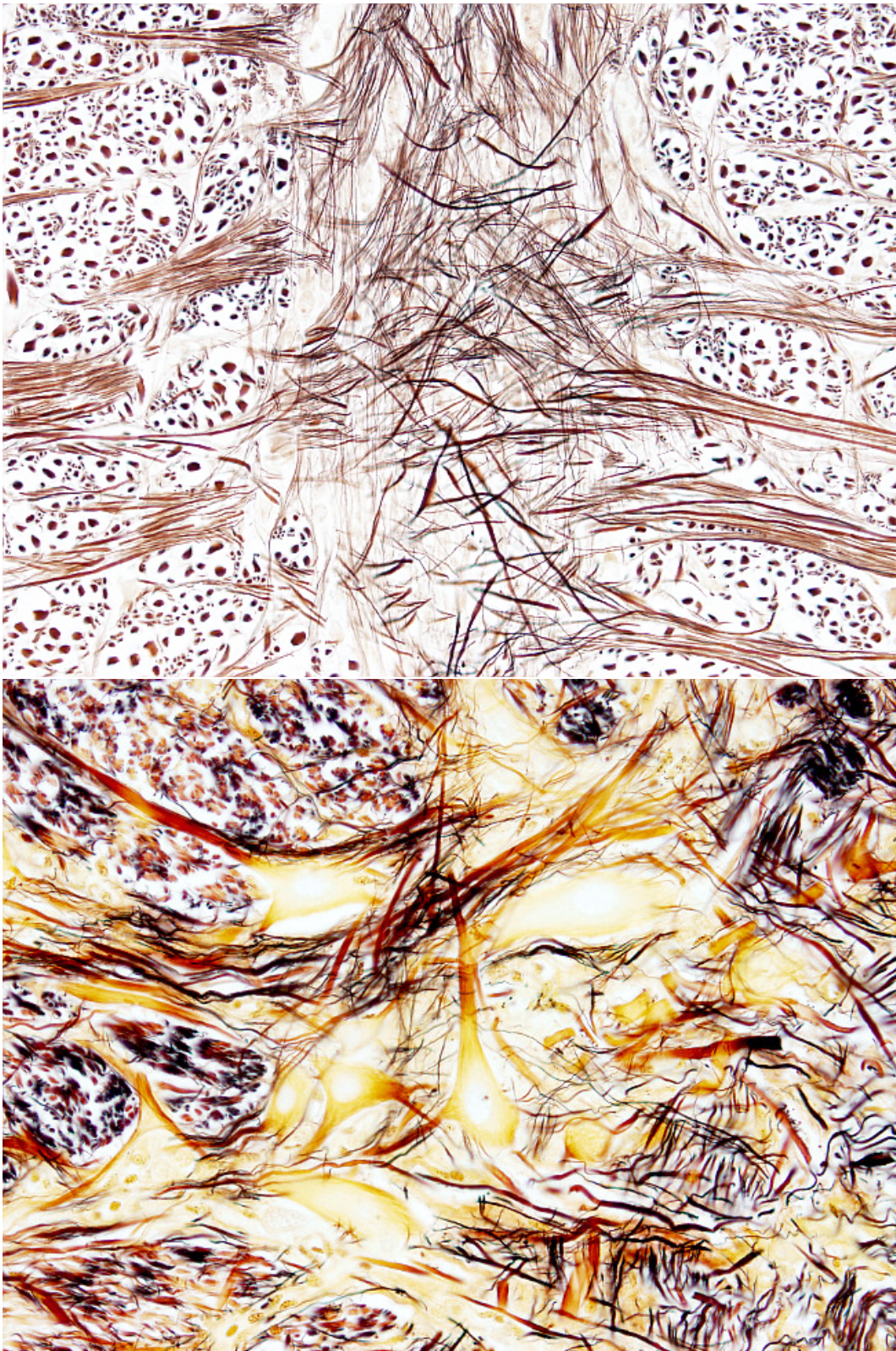


Figura 32: Técnica de nitrato de plata en cerebro. (Imágenes cedidas por la Dra. Rosa Álvarez Otero. Depto. Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo)

23 Gomori-argéntica

Esta impregnación argéntica se utiliza para poner de manifiesto a las fibras reticulares, las cuales son fácilmente observables en los tejidos linfoides y en la médula ósea.

Procedimiento

Partimos de muestras que han sido fijadas e incluidas en parafina. Estas muestras se han cortado en secciones de unas 8 μm de grosor y adheridas a portaobjetos recubiertos con gelatina-alumbre.

- 1.- 2x10 min en xileno para desparafinar
- 2.- 2x10 min en etanol 100^o
- 3.- 10 min en etanol 96^o
- 4.- 10 min en etanol 80^o
- 5.- 10 min en etanol 50^o
- 6.- 5 min en H₂O destilada
- 7.- 1-2 min de oxidación en permanganato potásico al 1 % en H₂O destilada
- 8.- Varios lavados en H₂O destilada.
- 9.- 1 min de blanqueo en metabisulfito potásico al 3 % en H₂O destilada
- 10.- 5 min de lavado con H₂O corriente abundante
- 11.- 1 min en solución de alumbre férrico al 2 % en H₂O destilada (solución recién preparada).
- 12.- 10 min de lavados con agua corriente.
- 13.- 2 x 2 min lavados en H₂O destilada.
- 14.- 1 min de incubación en el complejo argéntico (solución recién preparada).

El complejo argéntico está formado por plata amoniacal diluida 1:1 en H₂O destilada. Preparación: 10 ml de solución de nitrato de plata al 10 %, 2 ml de hidróxido de potasio al 10 %. Se forma un precipitado que se disuelve con amoníaco concentrado. Tras tener la solución clara se añade más nitrato de plata hasta que empiece a haber precipitado de nuevo. Entonces

preparar el complejo argéntico.

- 15.- 10 s de lavado con H₂O destilada (sacar y meter las secciones)
- 16.- Reducir con formol (formaldehído al 10 %) Detener la reducción mediante observación.
- 17.- 5 min de lavado en H₂O corriente.
- 18.- 1 min en metabisulfito potásico al 1
- 19.- 1 min en tiosulfato sódico al 1
- 20.- 5 min de lavado en agua corriente.
- 21.- 1 min en H₂O destilada.
- 22.- 5 min en etanol 50^o
- 23.- 5 min en etanol 70^o
- 24.- 5 min en etanol 80^o
- 25.- 5 min en etanol 96^o
- 26.- 2x5 min en etanol 100^o
- 27.- 2x5 min en xileno
- 28.- Montar con medio de montaje.

Resultados

Fibras reticulares: negras.

Colágeno: amarillento.

Consejos

Uno de los pasos críticos para tener una buena coloración es el tiempo de reducción con formol, el cual debe determinarse empíricamente.

Es también importante que el paso previo a la reducción sea muy rápido.

Productos

Xileno

Etanol de 50^o, 70^o, 80^o, 96^o y 100^o

Permanganato potásico al 0.5 %

Metabisulfito potásico al 3 % y al 1 %

Alumbre de hierro al 2

Nitrato de plata al 10 %

Hidróxido potásico al 10 %

Amoniaco concentrado

Tiosulfato sódico al 1 %

H₂O destilada

H₂O corriente

Medio de montaje

Material

Probetas, frascos y botellas

Cubetas de tinción

Cesta para portas

Cubreobjetos

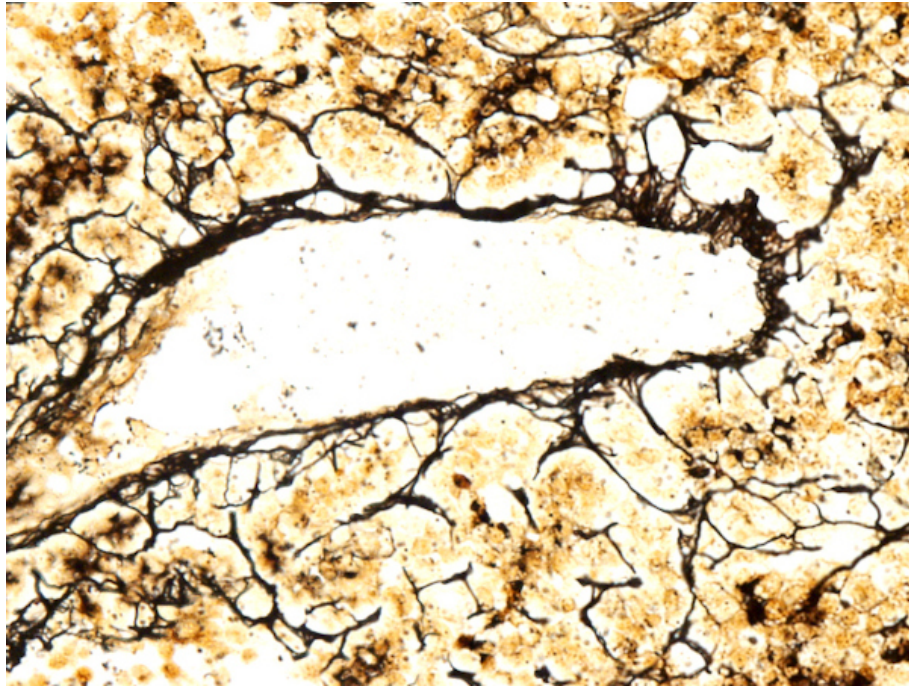


Figura 33: Secciones de parafina de 8 μm de grosor de un ganglio linfático impregnadas con el protocolo de Gomori para fibras reticulares.

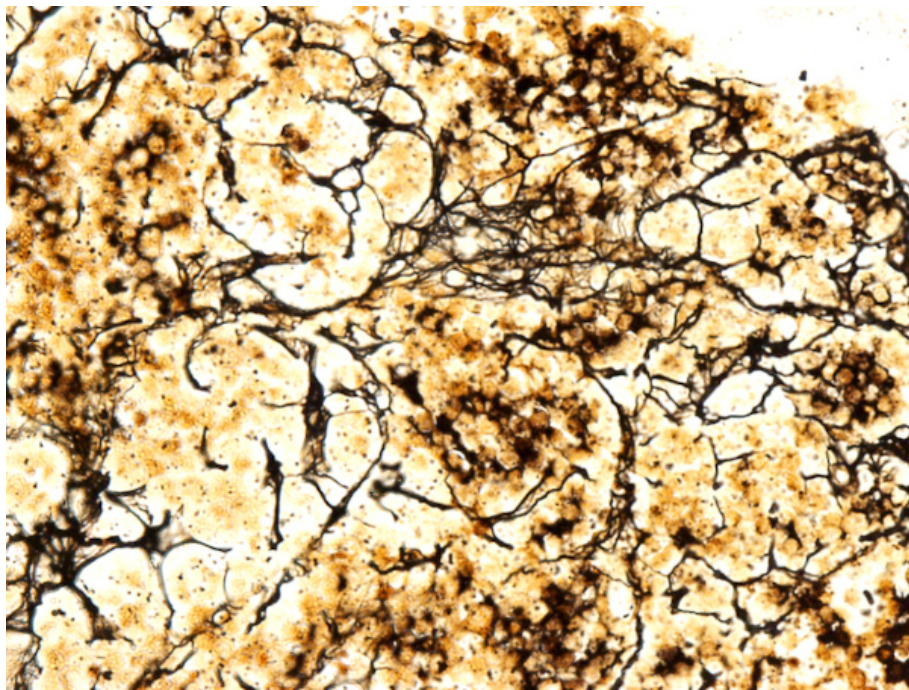


Figura 34: Secciones de parafina de 8 μm de grosor de un ganglio linfático impregnadas con el protocolo de Gomori para fibras reticulares.

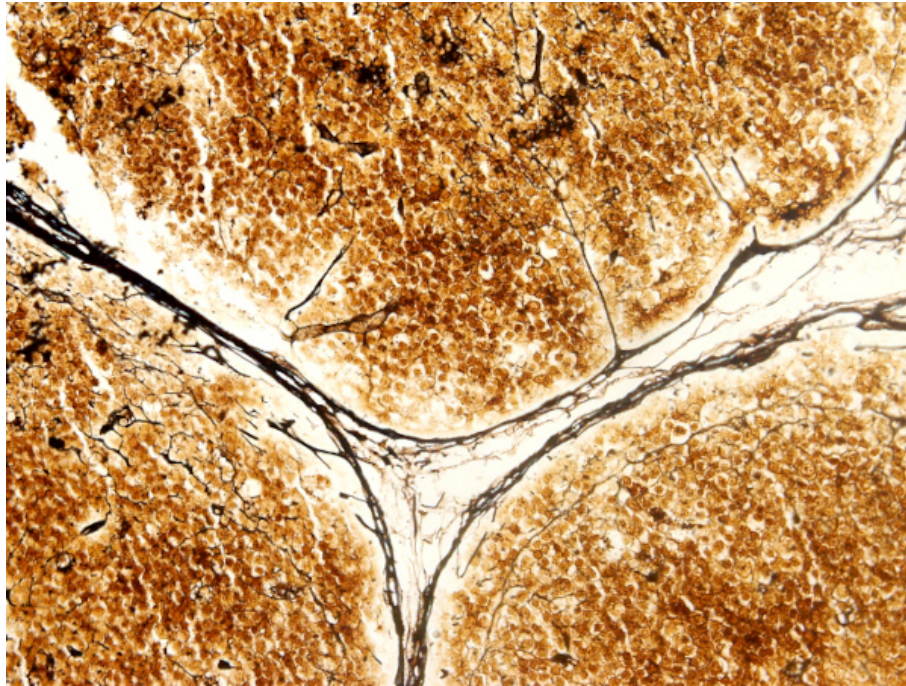


Figura 35: Secciones de parafina de 8 μm de grosor de un ganglio linfático impregnadas con el protocolo de Gomori para fibras reticulares.

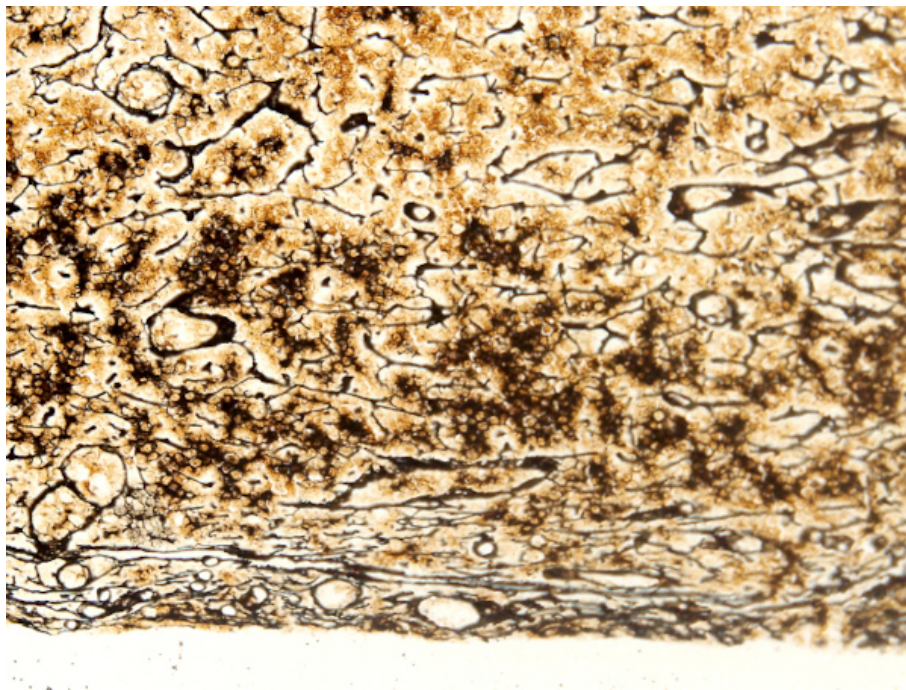


Figura 36: Secciones de parafina de 8 μm de grosor de un ganglio linfático impregnadas con el protocolo de Gomori para fibras reticulares.

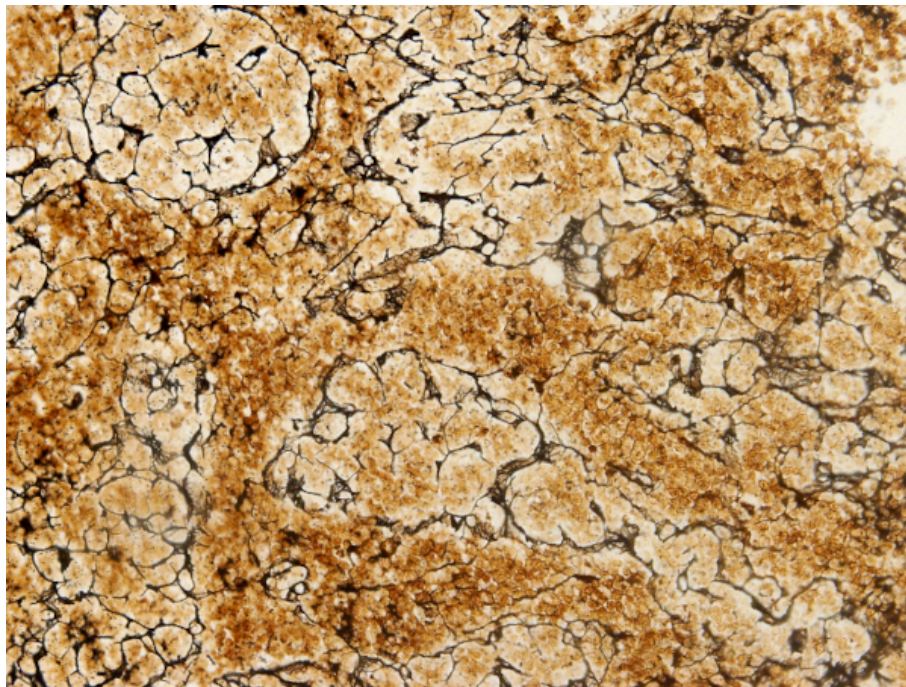


Figura 37: Secciones de parafina de 8 μm de grosor de un ganglio linfático impregnadas con el protocolo de Gomori para fibras reticulares.

24 NADPH diaforasa

La actividad NADPH-diaforasa es el nombre genérico que se aplica para cualquier enzima con la capacidad de transferir electrones entre el NADPH o NADH y distintos aceptores, entre los que se encuentran las sales de tetrazolio. Las sales de tetrazolio reducidas forman moléculas insolubles y azuladas llamadas formazanos. Así, esta técnica pone de manifiesto cualquier deshidrogenasa que utilice NADPH como donador de electrones y sales de tetrazolio como aceptor. Por ejemplo, se ha usado para poner de manifiesto la succinato deshidrogenasa.

En el sistema nervioso central esta técnica pone de manifiesto diversas poblaciones de neuronas que expresan la enzima óxido nítrico sintasa neuronal, la cual produce óxido nítrico, considerado como un neurotransmisor atípico. Pero también detecta la enzima óxido nítrico sintasa endotelial en los vasos sanguíneos del encéfalo. Por tanto estas enzimas poseen activada deshidrogenasa. La equivalencia entre la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa y la actividad NADPH-diaforasa ha permitido estudiar estas poblaciones neuronales productoras de óxido nítrico de una manera sencilla y rápida. Aunque hay que tener precaución en la interpretación de los resultados, puesto que el resultado de la técnica depende en cierta medida del fijador y proceso de fijación de la muestra.

Procedimiento

Partimos de cortes de material fijado con paraformaldehído al 4 %. Los cortes se obtienen mediante vibratomo o por congelación.

- 1.- 2x10 min en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 (TB).
- 2.- 2x10 min en TF con Triton X-100 al 0.3 % con agitación.
- 3.- 10 min en TF + 0.3 % de Triton X-100 + NADPH (0.5 mg/ml) + Nitro azul de tetrazolio (0.2 mg/ml).

Incubación con agitación.

A temperatura ambiente.

Protegido de la luz.

4.- 2-6 horas a 37 °C en la solución del paso 3.

5.- Parar el revelado con lavados en TB.

6.- Deshidratar y montar.

Si los cortes son de vibratomo en flotación han de pegarse tras el revelado sobre portas recubiertos con gelatina. Se pueden usar pinceles para la manipulación de los cortes.

Resultados

Neuronas, prolongaciones nerviosas: azul.

Vasos sanguíneos: azul.

Consejos

Si los cortes no se lavan bien tras la fijación los resultados pueden no ser adecuados.

Si el proceso de revelado es muy largo puede aparecer precipitado de formazano. Esto se puede evitar sustituyendo la solución de revelado por otra fresca cuando la solución de revelado adquiera un color púrpura intenso.

Productos

Xileno

Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º, 96º y 100º

Nitro azul de tetrazolio

NADPH

Tampón fosfato 0.1 M pH 7.4

Triton X-100

H₂O destilada

Medio de montaje

Material

Cubetas de tinción

Filtro de papel

Pincel

Papel de aluminio, Agitado orbital

Estufa a 37 °C

Portas recubiertos de gelatina

Cubreobjetos

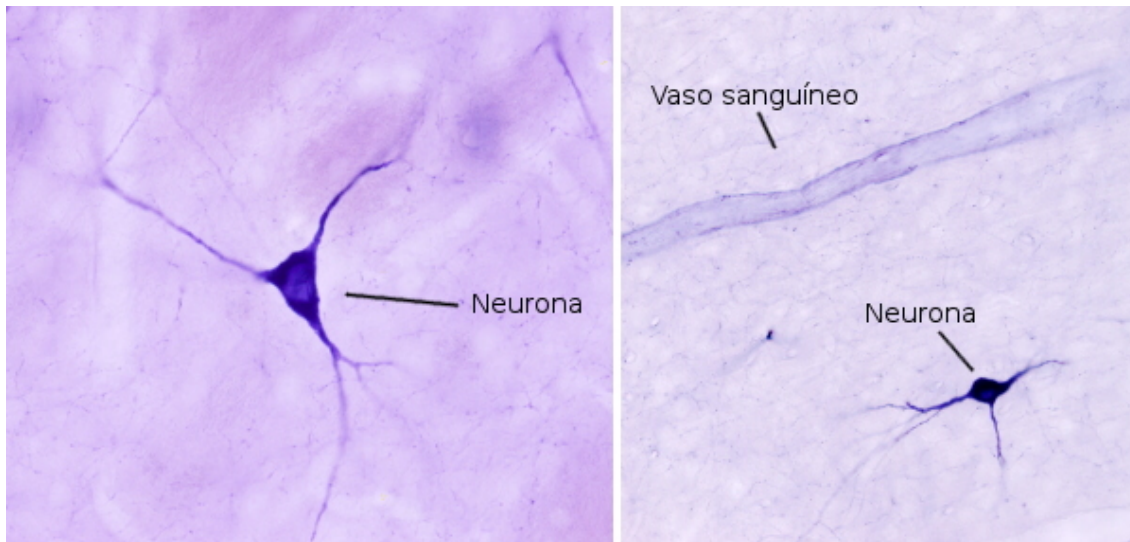


Figura 38: Sección de cerebro de ratón procesada para la detección de la actividad NADPH diaforasa.