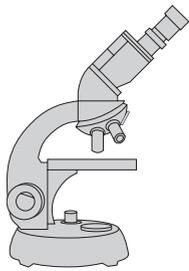


1 Terminología, microscopia y técnica histológica

1.1 Citología/biología celular, histología y anatomía microscópica	1
1.1.1 Citología/biología celular	1
1.1.2 Histología	1
1.1.3 Anatomía microscópica	2
1.2 Microscopia	2
1.2.1 Órdenes de magnitud	2
1.2.2 Microscopia óptica	2
1.2.3 Microscopia electrónica	3
1.3 Realización de preparados	4
1.3.1 Fijación	4
1.3.2 Inclusión	4

1.3.3 Corte y coloración	4
1.3.4 Artefactos	9
1.3.5 Preparados de tejidos vivos	9

1.4 Técnicas especiales de la microscopia electrónica	9
1.4.1 Microscopia electrónica de transmisión	9
1.4.2 Microscopia electrónica de barrido	11
1.5 Interpretación de los cortes histológicos	11
1.6 Reglas básicas para el diagnóstico	12



Introducción

El presente libro se ocupa de las células (citología/biología celular), los tejidos (histología) y los órganos (anatomía microscópica) de los seres humanos, el plano intermedio de la morfología, entre la macroscopia y la bioquímica. Las conclusiones se desprenden del razonamiento y de la investigación con los microscopios óptico y electrónico. En este capítulo se describen principalmente los aspectos metódicos importantes para la evaluación crítica de los preparados microscópicos ópticos y electrónicos.

1.1 Citología/biología celular, histología y anatomía microscópica

1.1.1 Citología/biología celular

En la actualidad el estudio de la célula a menudo recibe el nombre de biología celular y se ocupa de la estructura y la función. La **estructura celular** se identifica en detalle sobre todo con la ayuda de la microscopia electrónica moderna. La función celular puede determinarse mediante los diferentes métodos de la biología celular, entre ellos las técnicas inmunohistoquímicas y citoquímicas. Los detalles fundamentales de la estructura y la función de las células se presentan en forma abreviada en el capítulo 2, dado que la biología celular desempeña un papel importante en todos los capítulos: es una clave fundamental para la comprensión de todas las funciones de los tejidos y los órganos. El término “citología”, que antes era sinónimo de biología celular, se utiliza cada vez menos en este contexto.

1.1.2 Histología

En sentido estricto la histología es el estudio de los tejidos. Los tejidos corresponden a un plano intermedio de organización del cuerpo y se prestan particularmente bien para el estudio con el microscopio. Los tejidos son “asociaciones de células con diferenciación semejante y sus derivados, las sustancias intercelulares” (W. Bargmann, 1957), que pueden clasificarse según determinados criterios. En la actualidad se distinguen cuatro tejidos básicos: **tejido epitelial**, **tejido conjuntivo** (incluidos los tejidos de sostén), **tejido muscular** y **tejido nervioso**. Esta clasificación se remonta a Albert Kölliker (1817-1905). Los conocimientos citobiológicos y ontogénicos modernos permiten otras clasificaciones; así, por ejemplo, los límites entre las células típicas del tejido conjuntivo (los fibroblastos) y algunas células del tejido muscular se desdibujan: los llamados miofibroblastos tienen características específicas de los fibroblastos por un lado y de las células musculares por el otro. Las células musculares estriadas pueden ser células epiteliales y el tejido nervioso exhibe coincidencias

específicas con el tejido epitelial. Todos los órganos están compuestos por variantes específicas de los cuatro tejidos básicos.

1.1.3 Anatomía microscópica

La anatomía microscópica también se conoce como “histología de los órganos”, dado que requiere el conocimiento de la citología y la histología y lo aplica a los órganos. Consiste en la comprensión de la **funciones de los órganos** bajo la consideración concreta de las circunstancias morfológicas microscópicas ópticas y electrónicas. Claro que la anatomía microscópica también tiene un **lado práctico diagnóstico**; provee los conocimientos de la estructura microscópica normal, sana, de los órganos que deben dominarse en sus fundamentos y también en su desarrollo y en la extensión de su variabilidad para reconocer y comprender las alteraciones patológicas.

1.2 Microscopia

Los microscopios son los instrumentos más importantes para la identificación y la comprensión de los principios generales y las particularidades especiales en lo que se refiere a la estructura de las células, los tejidos y los órganos. Los microscopios abren dimensiones a las que no tiene acceso el ojo desnudo. El microscopio óptico se inventó en el siglo XVII (Antoni van Leeuwenhoek, 1632-1723) y desde entonces se ha perfeccionado en forma incesante. Permite una magnificación de hasta 1.000 veces (1.000 ×). El microscopio electrónico comenzó su desarrollo en la década del 30 del siglo XX y trajo consigo un aumento considerable de la resolución óptica. En la práctica rutinaria permite obtener aumentos de bastante más que 100.000 veces (100.000 ×). Los datos siguientes están orientados hacia los intereses prácticos del estudiante de medicina.

1.2.1 Órdenes de magnitud

El límite de resolución del **ojo desnudo** es de alrededor de 0,08 mm, por lo cual puede identificar estructuras de no menos de 100 μm de diámetro.

El **microscopio óptico** o microscopio de luz tiene un límite de resolución de aproximadamente 0,3 μm (en la práctica, un aumento de alrededor de 1.000 veces), con lo cual pueden identificarse bien células y bacterias. El límite de resolución depende de la longitud de onda de la luz.

Los órdenes de magnitud habituales de la **microscopia óptica** oscilan entre unos pocos milímetros (mm) y algunos micrómetros (μm, 1 mm = 1.000 μm).

El **microscopio electrónico** tiene un límite de resolución de alrededor de 0,3 nm; esto permite el estudio de virus y de la ultraestructura de las células y de las aglomeraciones proteicas grandes (filamentos citoplasmáticos) o los biopolímeros (p. ej., glucógeno).

Cuadro 1-1 Ejemplos de órdenes de magnitud de diferentes células y componentes celulares

Óvulo diferenciado	≅ 250-300 μm
Célula del epitelio intestinal (altura)	≅ 20-25 μm
Célula epitelial del hígado (según el estado funcional)	≅ 15-30 μm
Linfocitos	≅ 8 μm
Eritrocitos	≅ 7,6 μm
Mitocondrias (longitud)	≅ 2-5 μm
Microvellosidades (intestino delgado)	≅ 1-1,5 μm
Bacterias	≅ 1-2 μm
Virus	≅ 10-100 nm
Partícula de glucógeno (partícula β)	≅ 20 nm
Filamento de queratina	≅ 10 nm

Los órdenes de magnitud de la **microscopia electrónica** de rutina oscilan entre varios micrómetros y unos pocos nanómetros (nm, 1 μm = 1.000 nm).

En el cuadro **1-1** se ofrece un panorama general sobre los órdenes de magnitud de diferentes células y componentes celulares.

1.2.2 Microscopia óptica

El microscopio óptico común sigue siendo el instrumento más importante para la enseñanza de la histología, para el diagnóstico clínico y anatomopatológico y para la investigación en la biología celular. Funciona con una fuente luminosa eléctrica cuyos rayos iluminan y atraviesan el preparado desde abajo (**microscopia de luz transmitida**).

Un microscopio óptico en esencia está compuesto por una fuente luminosa incorporada en el **pie del microscopio**, cuya luz atraviesa el preparado y el sistema de lentes del microscopio, un **sistema de lentes condensador**, una **platina**, sobre la cual se coloca el preparado histológico que se desea examinar, **objetivos** (en la mayoría de los casos 3 o 4, ubicados en un dispositivo que rota para colocarlos uno a la vez, a gusto, en el paso de los rayos) y un **ocular**. **Sistemas de diafragmas** aumentan la claridad del preparado. El aumento corriente de los objetivos en los cursos de histología es de 4, 10, 20 y 40 ×. La imagen aumentada que producen los objetivos se aumenta todavía más por la acción del ocular. El ocular está en la parte superior del microscopio, por donde se mira. El aumento del ocular en la mayoría de los casos es de 10 ×. El aumento total, con el cual puede observarse un preparado, se obtiene del producto entre el aumento del objetivo y el aumento del ocular, o sea, en el ejemplo anterior, 40 (= 4 × 10) ×, 100 (= 10 × 10) ×, 200 (= 20 × 10) × y 400 (= 40 × 10) ×.

En la investigación se utilizan microscopios especiales.

Microscopia de contraste de fase El microscopio de contraste de fase es particularmente útil para la

observación de células (de cultivos, protozoarios) vivas (no teñidas). Intensifica el contraste de las estructuras celulares que apenas son visibles en el microscopio de luz transmitida corriente. El objeto (el preparado) mismo actúa como divisor del rayo luminoso para complementar trayectos de ondas luminosas capaces de interferir.

Microscopia de interferencia En la microscopia de interferencia (de Nomarski), el haz luminoso se divide antes de atravesar el preparado por la acción de un dispositivo optomecánico específico. El microscopio de interferencia también es particularmente apto para estudiar células vivas pero también puede aplicárselo para la observación de preparados inmunohistoquímicos, en los cuales sólo están teñidas células aisladas y su entorno carece de tinción.

Microscopia de fluorescencia Con la ayuda del microscopio de fluorescencia pueden analizarse estructuras celulares autofluorescentes o estructuras a las que se les unen fluorocromos. De una eficacia particular es la microscopia de epifluorescencia, en la cual los rayos excitadores llegan al objeto desde arriba. La técnica de la inmunofluorescencia indirecta combina la gran sensibilidad de la microscopia de fluorescencia con la especificidad de los métodos inmunohistoquímicos. Una desventaja puede ser el rápido desvanecimiento de la imagen fluorescente.

Microscopia de polarización La luz polarizada (que vibra en un solo plano) se utiliza en el microscopio de polarización para detectar y analizar estructuras muy bien ordenadas, por ejemplo, fibrillas colágenas de distribución paralela o fascículos de filamentos de miosina organizados en forma paralela en las bandas A de la célula muscular esquelética o cardíaca. En la luz polarizada estas estructuras con un grado alto de orden se comportan como birrefringentes (anisótropas). Brillan con claridad cuando transcurren diagonalmente entre dos filtros de polarización cruzados. Los componentes estructurales con un orden irregular se comportan como monorretrifringentes (isótropos) y permanecen siempre oscuros en el microscopio de polarización.

Videomicroscopia La videomicroscopia se realiza con la ayuda de una videocámara de gran resolución. La imagen visible en una pantalla puede manipularse electrónicamente; por ejemplo, las manifestaciones luminosas (señales) muy débiles y pequeñas pueden intensificarse. El procedimiento recibe el nombre de “contraste de interferencia diferencial videopotenciado” (VE-Dic = Video-enhanced-differential-interference-contrast). También puede aplicárselo con eficacia a células vivas y, por ejemplo, puede rastrearse la migración de partículas minúsculas dentro de la célula.

Microscopia láser confocal La microscopia láser confocal es un perfeccionamiento de la microscopia

de epifluorescencia. Un haz láser (la mayoría de las veces un láser de criptón-argón) barre el preparado. El análisis se realiza con la ayuda del procesamiento electrónico de la imagen. La estructura especial del microscopio permite el análisis de preparados gruesos, los cuales pueden descomponerse ópticamente en muchos planos (microtomografía). Las imágenes de los planos individuales pueden armarse técnicamente en una imagen tridimensional.

1.2.3 Microscopia electrónica

Se distinguen los siguientes tipos de microscopios electrónicos:

- Microscopio electrónico de transmisión
- Microscopio electrónico de barrido
- Microscopio electrónico de barrido de efecto túnel

El **microscopio electrónico de transmisión** permite resoluciones que superan mucho la del microscopio óptico. Esto es posible porque en lugar de usarse la luz visible, con su longitud de onda natural, se utilizan haces de electrones, cuya longitud de onda es mucho menor. En los microscopios óptico y electrónico el trayecto de los rayos en principio es semejante. En lugar de lentes de cristal se usan las llamadas lentes electrónicas (bobinas electromagnéticas). La fuente de electrones es un cátodo; el haz electrónico es acelerado por alta tensión y transcurre por un tubo al gran vacío. La imagen se observa mediante una lente de aumento binocular sobre una pantalla fluorescente.

Con la ayuda del microscopio electrónico de transmisión (MET) clásico pueden analizarse cortes de tejido pequeños (1-3 mm²), muy delgados (30-80 nm) (cortes ultrafinos), preparados mediante una técnica costosa y, en la práctica, como continuación de la microscopia óptica. El MET también permite el análisis de las réplicas finísimas que se preparan en el ámbito de los métodos de criofractura.

Microscopio electrónico de barrido Con el microscopio electrónico de barrido (MEB) se observan superficies naturales (o también artificiales) de objetos (epitelios, células, fibras extracelulares, sustancias duras, órganos, animales enteros, etc.). Antes de la observación en el MEB el objeto tiene que deshidratarse y cubrirse con una película delgada de metal noble (sombreado). El MEB funciona sin lentes formadoras de imágenes. Un preparado se explora (“barre”) en líneas secuenciales con un haz de electrones compacto. Para la formación de la imagen sirven los electrones retrodispersados (electrones secundarios). El detector es un disquillo de centelleo. Las señales luminosas de este disquillo son intensificadas por un fotomultiplicador y retroconvertidas en señales eléctricas. La imagen del MEB, que de nuevo se ve en una pantalla fluorescente, aparece sucesivamente a través de un barredor de líneas.

Microscopio electrónico de barrido de efecto túnel El microscopio electrónico de barrido de efecto túnel permite el análisis de superficies con una resolución atómica. Aquí sólo pueden examinarse superficies de barrido minúsculas (de alrededor de $1\mu\text{m}^2$).

1.3 Realización de preparados

Los métodos reseñados a continuación se utilizan para realizar los preparados histológicos habituales en la práctica de la anatomía, la anatomopatología y la investigación clínica así como en los cursos de histología. Una mirada a estas técnicas también debería fomentar el conocimiento y la crítica de los métodos. Los pasos metodológicos descritos aquí son consecutivos (fig. 1-1):

- Fijación
- Inclusión
- Realización de los cortes
- Coloración.

1.3.1 Fijación

La fijación tiene por objetivo:

- Mantener en la medida de lo posible el tejido en su estado natural y evitar su desintegración o su autólisis.
- Endurecer el material y así conseguir una mejor capacidad de corte.
- Eliminar las bacterias u otros agentes etiológicos de enfermedades que existan en la muestra para el examen.

Muchos medios de fijación, por ejemplo, la solución de formaldehído neutra al 5%, el ácido pícrico, el sublimado corrosivo y el alcohol, son precipitantes de las proteínas y formadores de redes proteicas. Mediante la alteración de la estructura de las proteínas y otras acciones de los medios de fijación el estado celular inicial se modifica y se produce una transformación más o menos obvia de la estructura natural de la célula viva. El resultado es una llamada imagen de equivalencias de características constantes, con la cual puede trabajarse con confianza, según lo demuestra la experiencia de décadas. Sin embargo, no debe olvidarse nunca que se examinan células muertas y con modificaciones químicas y que es imprescindible reunir intelectualmente los resultados de muchos métodos diferentes para obtener una imagen de la célula viva y su dinámica. Con frecuencia las muestras de tejido sencillamente se sumergen en las soluciones fijadoras (**fijación por inmersión**). Un resultado mejor se consigue con la ayuda de la **fijación por perfusión**, mediante la cual el órgano que debe fijarse se infiltra con el medio de fijación a través de su propio sistema vascular y así se fija.

1.3.2 Inclusión

La preparación de cortes finos (de alrededor de 5-8 μm en los preparados de rutina para la microscopía óptica) de fragmentos de órganos fijados se realiza con la ayuda de instrumentos especiales (micrótomos). Las muestras de tejido fijadas se colocan en un disolvente adecuado para poder incluirlas en parafina líquida y luego cortarlas, una vez que la parafina se solidifica. Como **disolvente** se usa una serie gradual de alcoholes de concentración creciente que no sólo conduce a la extracción completa del agua y así a un endurecimiento adicional del objeto sino que al mismo tiempo también disuelve la mayor parte de los lípidos de las células y los tejidos. En esta fase de la realización del preparado hay amplias posibilidades de que aparezcan artefactos, como retracciones y desgarros del tejido. Como **medio de inclusión** en la microscopía óptica habitualmente se utiliza la **parafina** o mejor el **Paraplast**. Se logran preparados histológicos buenos en particular cuando para la inclusión se utiliza una **resina sintética** (p. ej., metacrilato). En el texto que sigue y en los epígrafes de las figuras los preparados incluidos en esta forma se identifican con la palabra “plástico”. Los cortes de material incluido en plástico tienen un espesor de sólo 1-2 μm y muestran las estructuras celulares e hísticas más claramente que los cortes de material incluido en parafina, en los cuales muchas estructuras aparecen superpuestas.

En la **criomicroscopía** también se logra el endurecimiento de la muestra de tejido mediante la colocación de los fragmentos de órganos frescos en nitrógeno líquido y el corte posterior en un micrótopo de congelación especial, pero se evita la extracción del agua (deshidratación) con el peligro de la retracción del tejido y los solventes que disuelven los lípidos. Así, muchos componentes moleculares de los tejidos se mantienen en su configuración natural y luego pueden demostrarse con métodos histoquímicos, por ejemplo, las enzimas de la cadena respiratoria. La preparación de cortes por congelación puede realizarse con mucha rapidez, de modo que es posible, por ejemplo, efectuar un diagnóstico histológico intraoperatorio.

1.3.3 Cortes y coloración

Las muestras cortadas a un espesor de unos 5-8 μm con la ayuda de un micrótopo (fig. 1-1) y adheridas con firmeza a portaobjetos deben colorearse para lograr un contraste mejor de los componentes celulares e hísticos individuales. Sin embargo, como las soluciones colorantes habituales son en su mayoría soluciones acuosas el corte tiene que desparafinarse y rehidratarse en pasos intermedios adicionales. Luego de este tratamiento previo los diversos elementos celulares e hísticos captan los colorantes de las soluciones con afinidad variable, en lo cual las fuerzas electrostáticas entre los

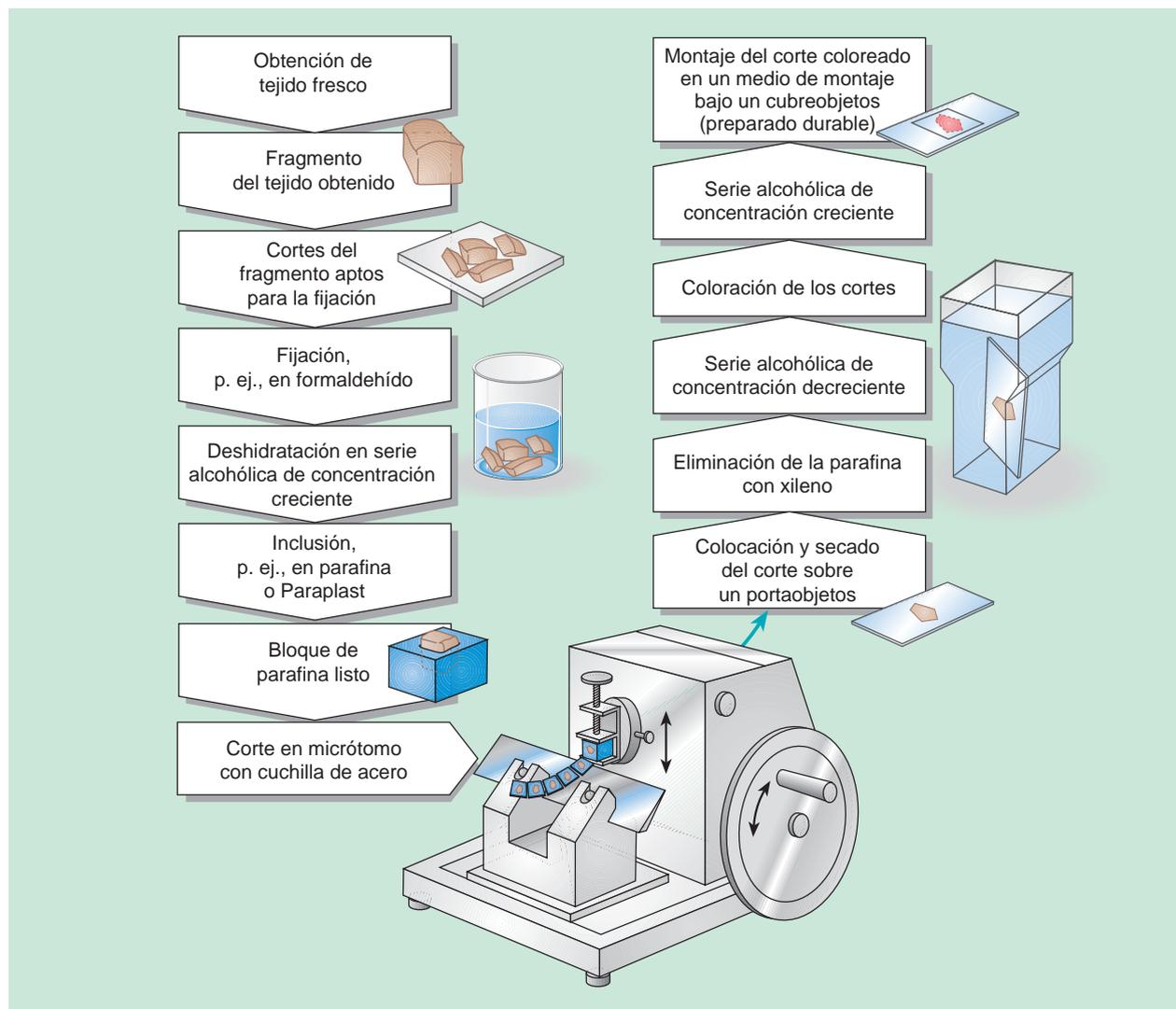


Fig. 1-1 Realización de preparatos. Representación de los pasos consecutivos que se requieren para obtener, a partir de una muestra de tejido fresco, un corte histológico coloreado apto para el examen microscópico óptico. (De [1])

colorantes y los componentes celulares e hísticos con frecuencia cumplen un papel decisivo. Los componentes con cargas eléctricas negativas (componentes aniónicos), como el DNA, captan colorantes básicos (catiónicos), por ejemplo la hematoxilina, y se llaman **basófilos**. Son basófilos, por ejemplo, el núcleo celular y las granulaciones de Nissl. Los componentes celulares e hísticos con cargas eléctricas positivas, o sea los componentes catiónicos, captan los colorantes ácidos (aniónicos) y se denominan **acidófilos** o **eosinófilos**, porque el colorante ácido de uso más frecuente se llama eosina. Los colorantes ácidos tiñen, por ejemplo, los eritrocitos y el colágeno. Además de unas pocas coloraciones de rutina hay una gran cantidad de coloraciones especiales.

Coloración de rutina La coloración de rutina típica es la tinción con **hematoxilina y eosina (H-E)** (fig. 1-2). La hematoxilina tiñe de azul violeta los núcleos y las partes del citoplasma con una abundancia de retículo endoplasmático rugoso. La eosina tiñe de rojo otras partes del citoplasma así como muchos componentes extracelulares fibrosos. El color azul violeta se debe a la existencia de regiones con carga negativa en el preparado (ácidos nucleicos [DNA, RNA], algunas mucinas y proteoglicanos extracelulares).

Otras coloraciones de rutina (cuadro 1-2) son la **tinción con azán**, la **trícromica de Masson** (fig. 1-3) y la **trícromica de Goldner** (fig. 1-4), las cuales permiten identificar particularmente bien la distribución del colágeno.

Las **tinciones para elastina** tornan visible la elastina de las fibras elásticas (fig. 1-5).

Métodos histoquímicos Entre las tinciones especiales los métodos histoquímicos ocupan una posición prioritaria; en el cuadro 1-2 se reseñan las tinciones de uso frecuente. Con la ayuda de la histoquímica de sustrato y enzima puede demostrarse una gran cantidad de las más variadas sustancias químicas definidas, como muchas enzimas, glucógeno, ácidos ribonucleico y desoxirribonucleico, proteínas, proteoglicanos, lípidos, etc., en el sitio de su ubicación natural en células y tejidos, con lo cual se obtiene una buena idea de los acontecimientos celulares dinámicos (fig. 1-6).

En el pasado reciente la **inmunohistoquímica** ha experimentado un desarrollo especial. Con la ayuda de esta técnica pueden demostrarse enlaces químicos específicos, sobre todo de péptidos y proteínas, por medio de una reacción antígeno-anticuerpo (fig. 1-7). Hay varias técnicas individuales, pero lo fundamental es que el corte de tejido en cual se desea demostrar un componente químico determinado (un antígeno) siempre se incubaba con una solución que contiene un

anticuerpo específico contra el antígeno buscado. El anticuerpo se une a los sitios de las células o del espacio extracelular en los cuales está el antígeno y así lo demuestra in situ.

La visualización de la reacción se consigue de modos diferentes; por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con una sustancia fluorescente o puede demostrarse, en un segundo paso, en una reacción con otro anticuerpo marcado con una enzima (a menudo peroxidasa). La determinación de la enzima se realiza entonces con métodos enzimohistoquímicos clásicos.

En la **autorradiografía** precursores radiactivos del DNA (^3H -timidina) o del RNA (^3H -uridina) se inyectan en forma intravenosa en animales de experimentación. Estos precursores se incorporan en los núcleos (DNA) o en el nucléolo o los ribosomas (RNA). Los cortes de tejido se cubren con una emulsión fotográfica cuyos cristales con contenido de plata se ennegrecen por la radiactividad y marcan los sitios de incorporación del precursor en cuestión. En el caso de la marcación de DNA se exponen los núcleos en la fase S. Con este método también puede determinarse la velocidad del recambio celular.

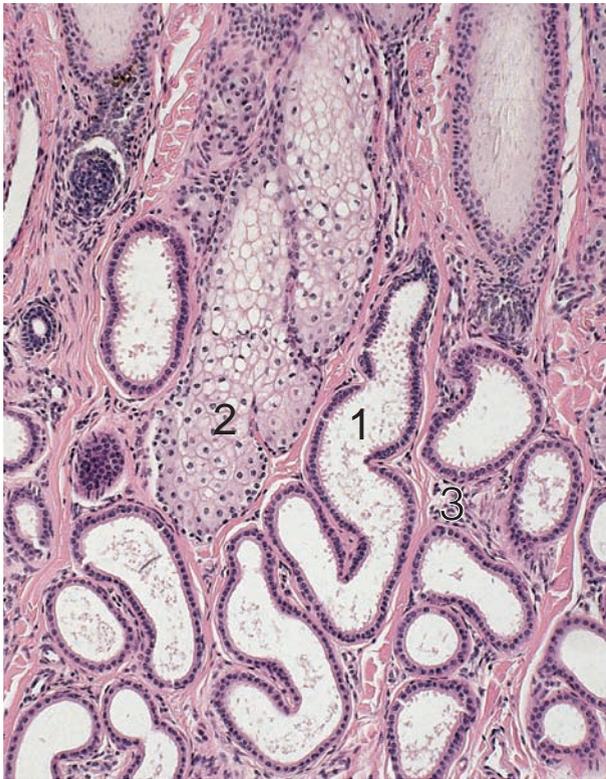


Fig. 1-2 Tinción con hematoxilina y eosina (H-E). Núcleos celulares en azul oscuro o violeta; citoplasma y sustancia intercelular en rojo. Glándulas cutáneas de un antilope (*Aepyceros melampus*): 1 glándulas odoríferas (apocrinas); 2 glándulas sebáceas (holocrinas); 3 tejido conjuntivo. 250 ×.

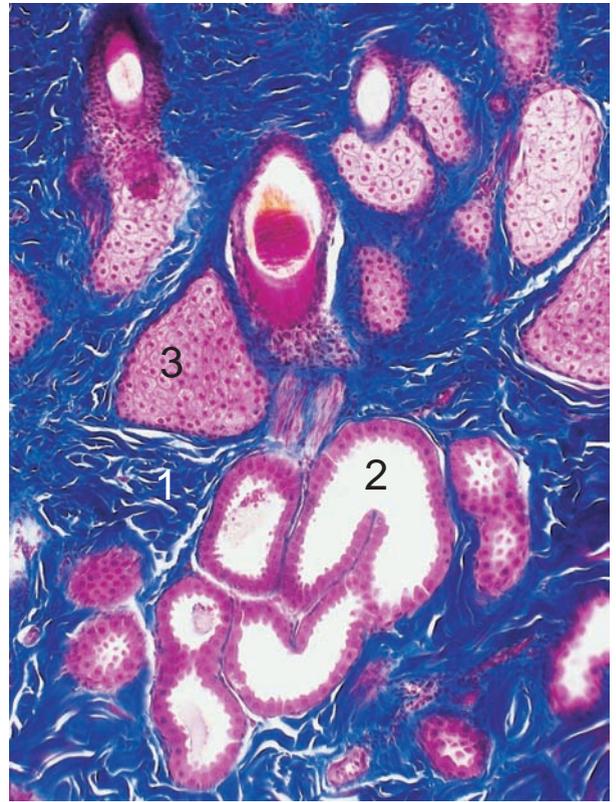


Fig. 1-3 Tinción tricrómica de Masson. Semejante a la coloración con azán (azocarmín + azul de anilina). Fibras colágenas del tejido conjuntivo (1) en azul oscuro; componentes celulares en diversos tonos de rojo. Glándulas cutáneas de una antilope (*Aepyceros melampus*): 2 glándulas odoríferas (apocrinas); 3 glándulas sebáceas (holocrinas). 250 ×.

Cuadro 1-2 Tinciones histológicas. (De [1])

Tinción	Núcleos	Citoplasma	Fibras colágenas	Fibras elásticas
H-E (hematoxilina-eosina)	Azul violeta	Rojo; regiones con abundancia de ribosomas y RER azul violeta	Rojo	Sin tinción o rosa
Azán (azocarmín/azul de anilina/naranja G)	Rojo brillante	Rosa pálido a azul tenue	Azul	Sin tinción (sólo si están presentes en grandes cantidades, como en las membranas elásticas o los ligamentos elásticos: rojo a azul rojizo)
Para elastina (resorcina-fucsina u orceína)	—	—	—	Negro violeta (resorcina-fucsina); rojo pardo (orceína)
van Gieson (hematoxilina férrica/ácido pícrico/fucsina ácida)	Azul negro	Amarillo a pardusco claro	Rojo	Sin tinción especial (sólo si están presentes en aglomeraciones gruesas, como en las membranas elásticas o los ligamentos elásticos: amarillo)
Tricrómica de Goldner (hematoxilina férrica/azofloxina/verde luz)	Pardo negro	Rojo ladrillo	Verde	A menudo sin tinción especial (en parte, verdoso a rojo claro)
EH (hematoxilina férrica) de Heidenhain (particularmente apta para la identificación de algunas estructuras celulares así como de las estriaciones transversales musculares)	Heterocromatina y nucléolo azul negro	Algunos componentes, p. ej., centriolos, cíncilios y haces de filamentos intermedios, aparecen de color negro profundo	Sin tinción especial o gris amarillento	Gris tenue
Tinciones histoquímicas				
Reacción del PAS	Tinción rojo violeta. El ácido peryódico forma grupos aldehído en el glucógeno y en los componentes sacáridos de las glucoproteínas. El reactivo de Schiff los tiñe de rojo violeta.			
Azul alciano	Tinción azul. Diversos componentes con carga eléctrica negativa (polianiones), p. ej., moco sulfatado, glucosaminoglucanos, hialuronano.			
Tinciones para lípidos (p.ej., Sudán III; Sudán negro; aceite rojo O)	Según el colorante, p. ej., naranja-rojo o pardo. Lípidos, p. ej., triacilgliceroles o lípidos de las vainas de mielina.			
Tinción de Feulgen para DNA	Tinción púrpura. El HCl forma grupos aldehído en la desoxirribosa, la pentosa del DNA. Los grupos aldehído reaccionan con el reactivo de Schiff, el cual tiñe selectivamente de púrpura la cromatina que contiene DNA.			
Azul de toluidina (basofilia selectiva)	Tinción azul. El azul de toluidina, un colorante básico, se une selectivamente a los grupos fosfato de carga negativa del DNA y del RNA. En consecuencia, se tiñen la cromatina (DNA), el nucléolo y los ribosomas (RNA).			

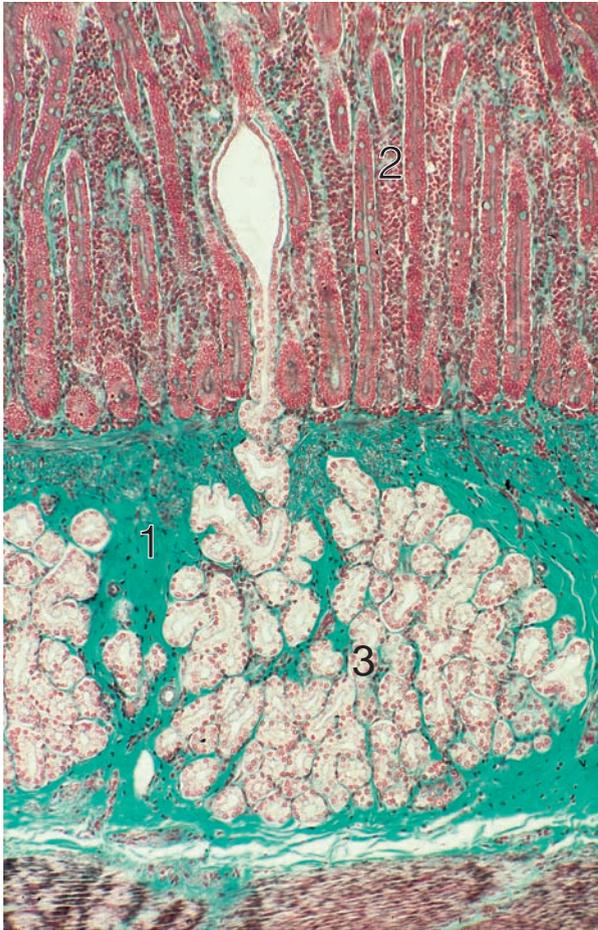


Fig. 1-4 Tinción de Goldner, coloración tricrómica de uso corriente que tiñe las fibras colágenas del tejido conjuntivo (1) de verde turquesa y las porciones celulares de rojo violeta a rojo pardo. Duodeno de un gato: 2 mucosa; 3 glándulas de Brunner en la submucosa. 200 ×.

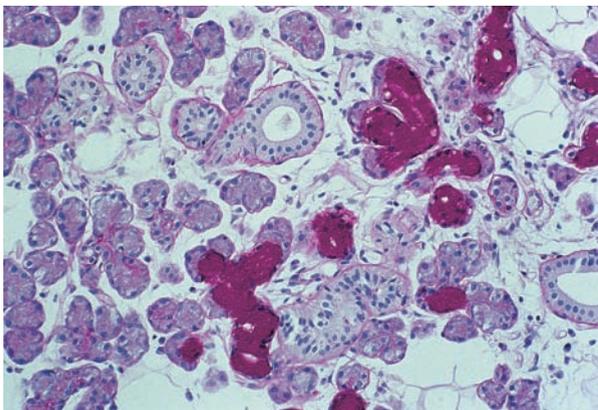


Fig. 1-6 Tinción con PAS (ácido peryódico-reactivo de Schiff), identificación de moco y glucoproteínas neutras, así como glucógeno. Aquí el moco de las células mucosas de la glándula submandibular (humana) está teñido de púrpura intenso; otras estructuras poseedoras de glucoproteínas, entre ellas las membranas basales, aparecen más tenues. Coloración de contraste de los núcleos celulares con hemalumbre (tono semejante al de la hematoxilina). 200 ×.

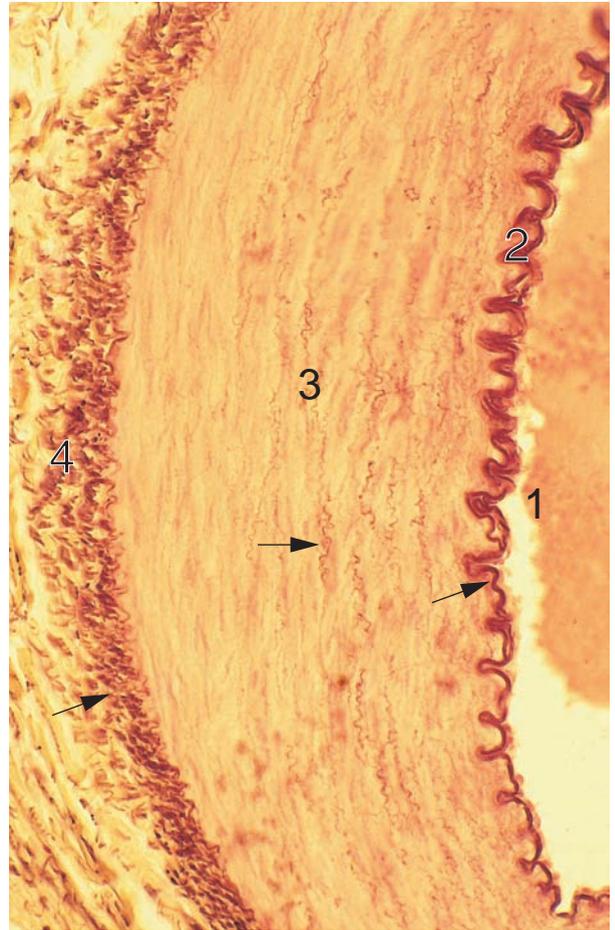


Fig. 1-5 Tinción para elastina (resorcina-fucsina), detección selectiva de membranas y fibras elásticas (→). Arteria muscular humana: 1 luz vascular; 2 membrana elástica interna, compuesta por una lámina elástica gruesa de trayecto ondulado; 3 túnica media; 4 túnica adventicia. 400 ×.

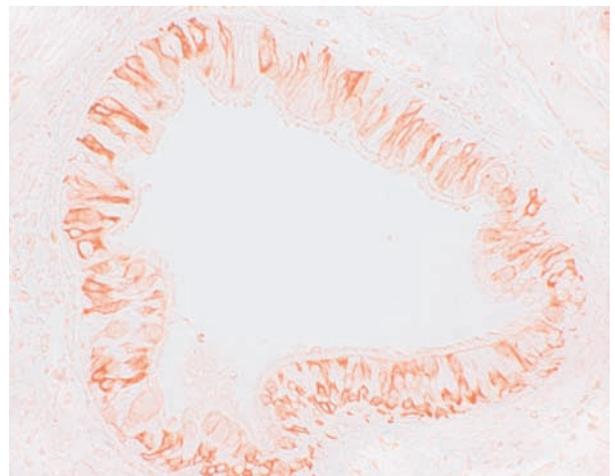


Fig. 1-7 Determinación inmunohistoquímica de la citoqueratina 19 (CK19), un componente del citoesqueleto, en un bronquio pequeño humano. Sólo una parte de las células epiteliales exhibe una reacción positiva (coloración parda); en su mayoría se trata de células basales o células en crecimiento. 250 ×.

En la **hibridación in situ** pueden localizarse ácidos nucleicos en el corte histológico mediante sondas complementarias (oligonucleótidos de DNA o RNA marcados radiactivamente o no radiactivamente). Con la hibridación in situ pueden demostrarse en el corte secuencias de DNA o RNA específicas. El método también puede aplicarse en cromosomas, en extendidos celulares o en preparados de cuerpo entero de animales pequeños.

1.3.4 Artefactos

Por razones diversas (p. ej., mala fijación, soluciones colorantes viejas, mellas en la cuchilla del micró-tomo) pueden aparecer alteraciones en los preparados histológicos (figs. 1-8 y 1-9) que son de causa puramente técnica y reciben el nombre de artefactos. El conocimiento de estos artefactos es muy importante en el examen de un preparado.

1.3.5 Preparados de tejidos vivos

Con el microscopio también pueden estudiarse células y tejidos vivos, lo que lamentablemente por



Fig. 1-8 Hendidura por retracción (*) entre la base del epitelio y el zócalo de tejido conjuntivo de las vellosidades intestinales, el denominado espacio de Grünhagen (yeyuno, humano). Azán; 270 ×.

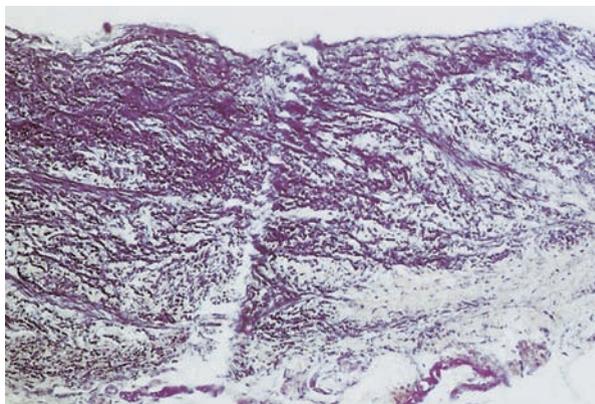


Fig. 1-9 Defecto de corte. Pequeños desgarros del tejido (válvula aórtica humana) producidos por una mella en la cuchilla del micró-tomo. Resorcina-fucsina; 100 ×. (De [1])

falta de tiempo casi nunca es posible en los cursos de histología. En la investigación la microscopía de células vivas, por ejemplo en cultivos celulares, ha experimentado una gran expansión, sobre todo porque se desarrollaron procedimientos microscópicos especiales, como la microscopía de contraste de fase y la microscopía de interferencia, que intensifican el contraste de las estructuras celulares vivas (fig. 1-10). En el microscopio de luz transmitida corriente este contraste es muy débil pero con el uso de sustancias coloreadas o marcadas con colorantes fluorescentes es posible, entre otras cosas, seguir la dinámica de los procesos de endocitosis o la reestructuración de las prolongaciones celulares. Las variantes de la microscopía vital son, por ejemplo, la aplicación de la luz ultravioleta, la microscopía de polarización y la microscopía de campo oscuro.

1.4 Técnicas especiales de la microscopía electrónica

1.4.1 Microscopía electrónica de transmisión

En la microscopía electrónica de transmisión se necesitan procedimientos de fijación particularmente cuidadosos para obtener una imagen lo más fiel posible al original de la estructura de las células vivas. El tejido debe colocarse rápidamente en la solución fijadora, en lo posible de inmediato o al menos a los pocos minutos de la extracción o la muerte. Si se trabaja con animales de experimentación, lo óptimo es la fijación por perfusión del animal anestesiado. La solución fijadora es el glutaraldehído amortiguado y a la fijación le sigue una posfijación con tetróxido de osmio. El metal pesado osmio se une a los lípidos y aumenta, por ejemplo, el contraste de las membranas biológicas. La inclusión se realiza en resinas sintéti-

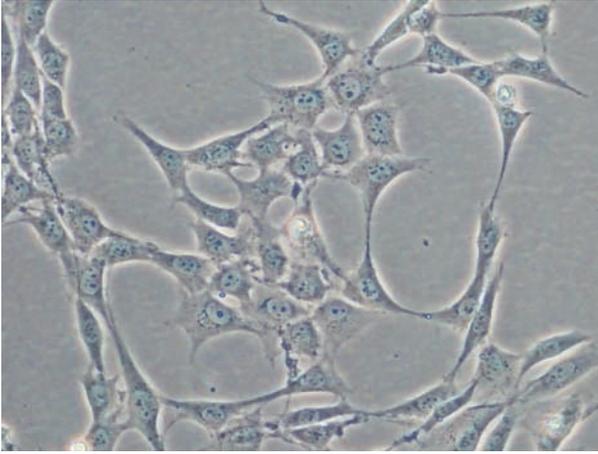


Fig. 1-10 Fibroblastos vivos en un cultivo celular, microscopía de contraste de fase. Además del núcleo, algunos orgánulos granulares y el límite celular general, los detalles de la estructura de estas células apenas pueden distinguirse. 450 ×.

cas como Araldita o Epon. Con ultramicrotomos se realizan cortes de 30 a 80 nm de espesor. Estos cortes son tan finos que las estructuras celulares que contienen deben contrastarse (“teñirse”) (fig. 1-11) con acetato de uranilo, citrato de plomo y en ciertos casos ácido fosfotúngstico.

En la investigación experimental pueden utilizarse sustancias acopladas a metales (oro, hierro, cobre). Los metales en los preparados para la microscopía electrónica de transmisión tienen un gran contraste y, en consecuencia, se identifican bien. Así, por ejemplo, en una serie de investigación temporal se puede seguir el trayecto de un componente invisible en sí mismo, como una glucoproteína, desde su captación en la célula hasta su degradación. Además, pueden localizarse componentes moleculares definidos en forma precisa con la ayuda de métodos diversos, por ejemplo proteoglicanos o glucosaminoglucanos.

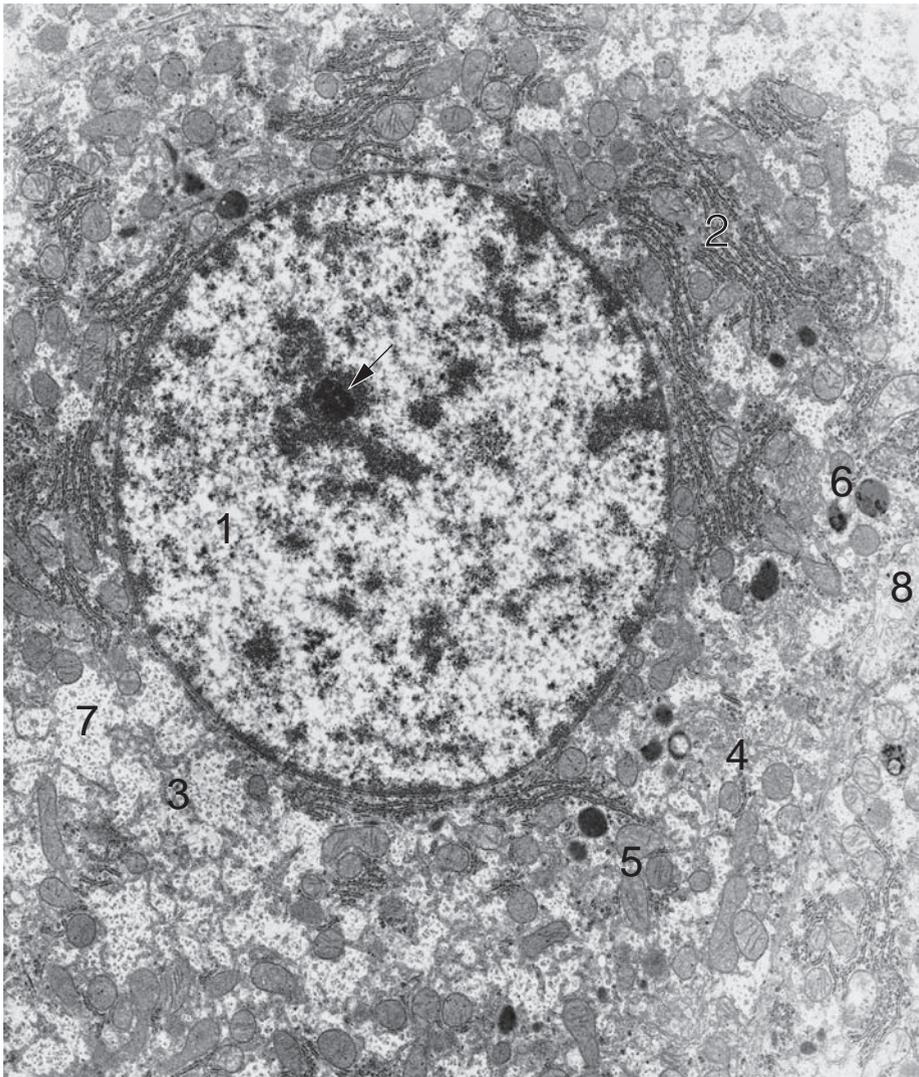


Fig. 1-11 Ultraestructura celular en el microscopio electrónico de transmisión. Célula epitelial del hígado de la rata con un núcleo grande (1) y los orgánulos típicos. 2 retículo endoplasmático rugoso; 3 retículo endoplasmático liso; 4 aparato de Golgi; 5 mitocondrias; 6 lisosomas. Estas células contienen mucho glucógeno (7) en forma de inclusiones. En la superficie que forma los canalículos biliares (8) la célula exhibe microvellosidades. → Nucléolo. 12.000 ×.

En la **inmuno-electromicroscopía** es posible demostrar in situ en el microscopio electrónico de transmisión sustancias marcadas con oro.

En un procedimiento especial, la generación de **contraste negativo**, pueden ponerse sobre una película transparente finísima partículas celulares, bacterias o virus. Los objetos se rodean de precipitados de metales pesados, con lo cual aparecen claros en un entorno oscuro.

En el método de la **criofractura** las superficies liberadas de pequeñas muestras hícticas congeladas a muy baja temperatura se cubren con una película metálica finísima. La réplica obtenida de ese modo se observa con el microscopio electrónico de transmisión (véanse pp. 20, 32, 34 y 38). Las membranas celulares se parten a lo largo de su centro hidrófobo, de modo que las **caras interiores** de las hojuelas externa e interna de la membrana quedan libres y pueden analizarse.

1.4.2 Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido tiene su fundamento en principios propios y permite el análisis de superficies celulares y epiteliales genuinas (fig. 1-12).

1.5 Interpretación de los cortes histológicos

Para poder realizar una evaluación más crítica del mensaje y las conclusiones de los cortes histológicos

siempre hay que tener en cuenta una serie de verdades simples:

- El corte histológico provee sólo una **instantánea**, producto del proceso de fijación, de un todo vivo en cambio continuo.
- La gran mayoría de los cortes representan sólo una **rodaja finísima** de una parte casi siempre pequeña de un órgano tal vez muy grande, por ejemplo, el hígado. La no homogeneidad en la distribución de ciertas estructuras puede hacer a que no siempre se las encuentre en cada corte.
- El corte histológico genera una **imagen bidimensional** plana de las células y los tejidos siempre tridimensionales, de cuyo volumen es posible darse una idea sólo con la implementación de técnicas determinadas (p. ej., el uso de cortes gruesos), en este caso mediante el denominado transefoque de los cortes.

No obstante, las conclusiones inmediatas sobre la forma real de los elementos estructurales de las células y los tejidos o de formaciones organizadas superiores en el corte individual sólo son posibles en casos excepcionales y sólo puede extraérselas con precaución. Algunos ejemplos simples aclaran esto (fig. 1-13). Para facilitar la comprensión se representan los cortes en los planos diferentes de objetos bien conocidos. Por ejemplo, si un huevo cocido (duro) se corta en sentido transversal en la región de uno de sus dos polos o se le practica un corte longitudinal muy periférico en ninguno de esos cortes estará contenida la yema central, lo cual no niega su existencia. Asimismo, los cortes longitudinales o transversales de un tubo recto o curvo dan como resultado imáge-

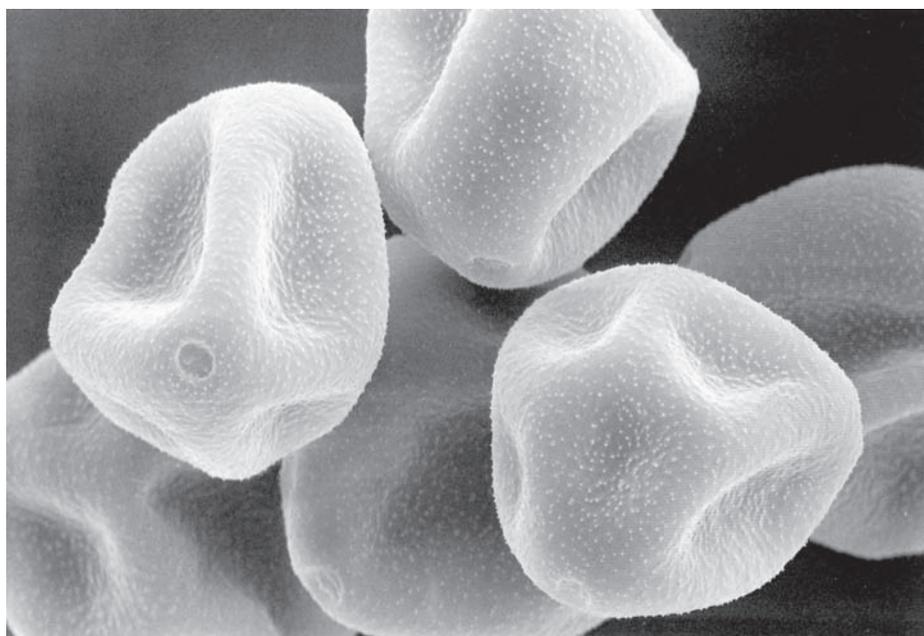


Fig. 1-12 Microfotografía electrónica de barrido de polen de avellano. 1.700 ×.

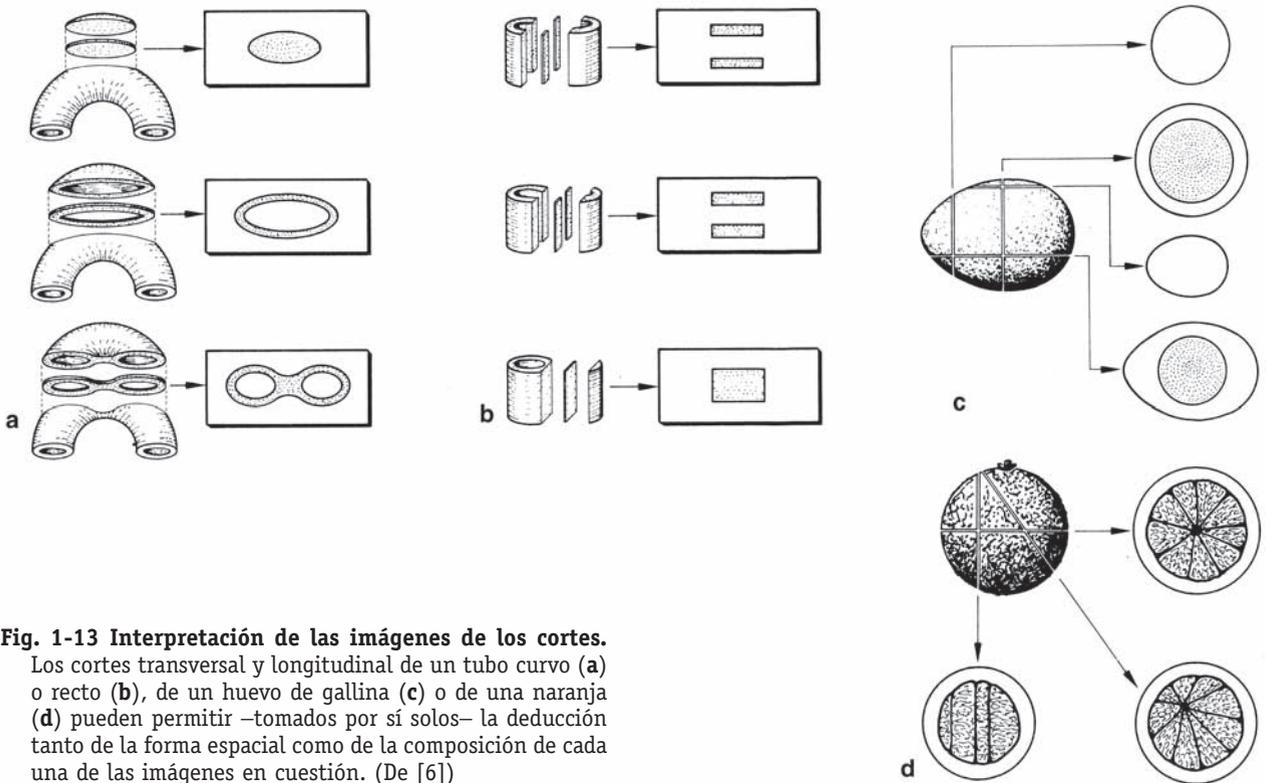


Fig. 1-13 Interpretación de las imágenes de los cortes. Los cortes transversal y longitudinal de un tubo curvo (a) o recto (b), de un huevo de gallina (c) o de una naranja (d) pueden permitir –tomados por sí solos– la deducción tanto de la forma espacial como de la composición de cada una de las imágenes en cuestión. (De [6])

nes muy diferentes según dónde y cómo se incida el tubo. Cabe esperar imágenes de corte muy similares cuando se trata de tubos biológicos, por ejemplo, los vasos sanguíneos o los túbulos renales. Incluso una naranja, que en forma aproximada es comparable con las porciones secretoras (ácinos) de las glándulas, al igual que estas da imágenes diferentes según la orientación del corte.

Las siluetas circulares, exactamente igual en la dimensión microscópica óptica que en la electrónica, pueden derivar, por ejemplo, de cortes transversales de cilindros, esferas, elipsoides o conos. Si todas las siluetas de un preparado son del mismo tamaño, esto hablaría antes que nada de la existencia de cilindros paralelos del mismo diámetro, dado que es improbable que las otras formaciones posibles, por ejemplo esferas o conos, se hayan seccionado en el mismo sitio de su contorno.

Desde hace mucho que la aparición de dos cortes nucleares en una célula no es una demostración de binuclearidad sino que casi siempre tiene su origen en un núcleo contorneado que el corte interesa dos veces.

1.6 Reglas básicas para el diagnóstico

Para identificar con seguridad un preparado histológico desconocido y poder realizar su diagnóstico

diferencial hay que tener en cuenta algunas reglas básicas:

- El preparado siempre tiene que observarse primero a **simple vista**, dado que ciertos órganos ya pueden diagnosticarse con un alto grado de probabilidad por la orientación típica del corte, por ejemplo un corte sagital de la hipófisis, un corte transversal de la suprarrenal o un corte longitudinal del intestino delgado.
- A continuación el preparado se mira con el objetivo más débil del microscopio. Se buscan **principios organizativos** concretos: ¿hay una zona interna y una zona externa (correspondientes a médula y corteza)? ¿Se encuentra una superficie natural (cubierta por epitelio) o una cápsula? ¿Hay regiones con propiedades tintoriales completamente diferentes? ¿Aparece alguna luz? ¿Hay elevaciones regulares de la superficie, por ejemplo, pliegues?
- **Se realiza el examen minucioso de todo el corte** con el objetivo más débil, es decir que tienen que haberse visto todos sus bordes libres pues sólo entonces puede resolverse con seguridad una de las cuestiones más importantes para el diagnóstico diferencial, a saber: **¿hay algún epitelio en algún sitio del preparado?** En caso afirmativo, primero se **diagnostica con precisión el epitelio**, dado que de allí ya surge una dirección determinada en la meta del diagnóstico diferencial.

Esto se aclara con un ejemplo: si se encuentra un “epitelio simple cilíndrico” teóricamente habría que pensar en un corte de una parte del tubo digestivo o de la trompa uterina o del útero. Para corroborar el primero de estos dos diagnósticos presuntivos se busca la organización en capas típica del tubo digestivo y con la identificación de esta puede establecerse con seguridad que el preparado es del tubo gastrointestinal. En cambio, si falta esta estructura estratificada típica es cierto el segundo de los dos diagnósticos presuntivos. Para confirmarlo, en el epitelio se buscan los posibles cinocilios –característicos de la trompa uterina y de la mucosa del útero en determinadas fases del ciclo–. Así se relaciona el resto de los elementos estructurales del corte, por ejemplo, pliegues muy ramificados (trompa uterina) y la invaginación del epitelio para formar túbulos glandulares (mucosa uterina). Si no hay cinocilios ni glándulas tubulares pero en la superficie aparecen pliegues delgados cubiertos de epitelio simple cilíndrico debe considerarse el diagnóstico diferencial de vesícula biliar.

El diagnóstico de un preparado histológico a menudo puede realizarse con el aumento menor y como mucho con un aumento mediano. Un ejemplo también lo aclara: en el diagnóstico diferencial de las glándulas serosas debe incluirse en las consideraciones el páncreas. Sin embargo, como los islotes de Langerhans, otras veces tan confiables como criterio diagnóstico diferencial, son poco frecuentes en la región de la cabeza y en el proceso unciforme del páncreas y en algunos cortes faltan por completo, hay que pensar en la existencia abundante en los seres humanos de las denominadas células centroacinosas como buena característica diferencial frente a todo el

resto de las glándulas serosas. No obstante, en la mayoría de los casos la identificación de estas células como tales (para lo que se necesita una resolución relativamente alta y también algo de experiencia) les resulta más difícil a los principiantes que distinguir un criterio diagnóstico diferencial simple, a saber, la ausencia total de conductos estriados en el páncreas. Sin embargo, con el uso de aumentos grandes, a causa de que el sector examinado es demasiado pequeño, esto con frecuencia pasa inadvertido y puede realizarse un diagnóstico incorrecto del preparado.

Reglas básicas para el diagnóstico de un preparado histológico:

- Primero mírese el preparado a simple vista y determínese si es de un órgano macizo o hueco y si los bordes del corte son artificiales (rectos) o corresponden a superficies naturales.
- Luego mírese en el microscopio con el aumento menor y determínese si hay una organización definida, por ejemplo, en corteza/médula, en lobulillos o configuraciones lumbales determinadas y qué epitelios se encuentran en las superficies naturales.
- Examínese minuciosamente todo el corte con los aumentos menor y mediano. Procédase a un diagnóstico histórico específico cuidadoso y a la identificación de los cortes tangenciales y de los artefactos.
- Sólo utilícese gran aumento para los detalles celulares, por ejemplo, para la diferenciación entre cinocilios y borde en cepillo.