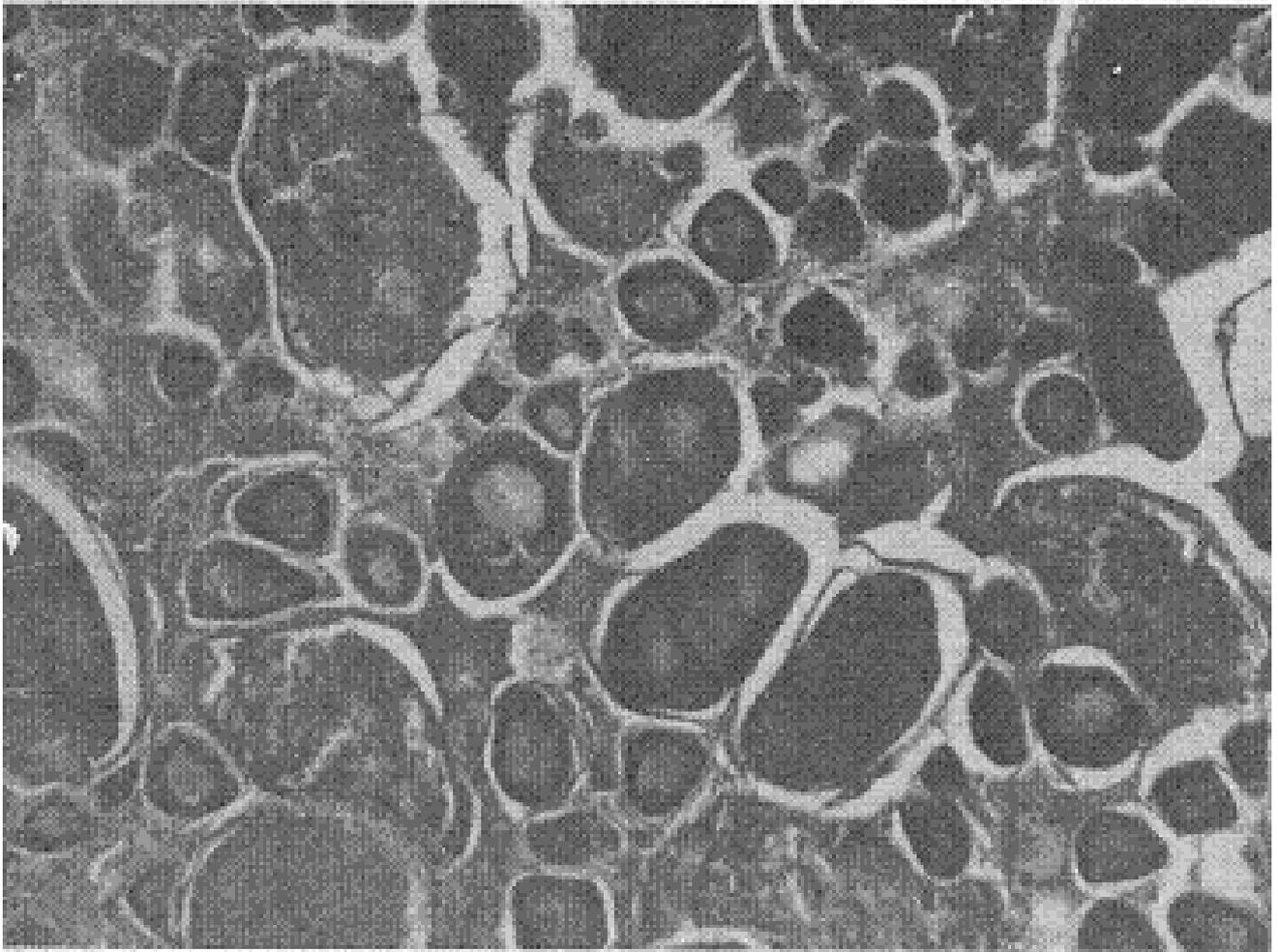


MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS



Secretaría de Pesca

SECRETARIA DE PESCA

**MANUAL DE TECNICAS
HISTOLOGICAS**

Biól. Olivia Tapia Vázquez

**INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA
México, 1984**

ISBN 968-817-009-7
Primera edición
Julio, 1984

SECRETARIA DE PESCA

LIC. PEDRO OJEDA PAULLADA
Secretario de Pesca

ALFONSO G. CALDERON VELARDE
Subsecretario de Fomento Pesquero

LIC. FERNANDO CASTRO Y CASTRO
Subsecretario de Infraestructura Pesquera

LIC. GLORIA BRASDEFER
Oficial Mayor

DR. JORGE CARRANZA FRASER
Director General del Instituto Nacional de la Pesca

LIC. HORACIO ESTAVILLO LAGUNA
Director General de Comunicación Social

Indice

I. Resumen	7
II. Introducción	8
III. Desarrollo	9
IV. Preparación de reactivos y colorantes	17
V. Recomendaciones	31
VI. Bibliografía	32

I. Resumen

El presente manual de técnicas histológicas proporciona las indicaciones que deben seguirse, desde la colecta de organismos hasta la obtención de preparaciones, para hacer un diagnóstico histológico adecuado.

Se señala material mínimo indispensable, técnicas topográficas generales, forma de preparación de reactivos y colorantes y algunas recomendaciones al respecto.

II. Introducción

La diversidad y cantidad de especies que se trabajan en los Centros de Investigación Pesquera del Instituto Nacional de la Pesca, obliga a que los estudios histológicos sobre los mismos se realicen en forma integral a los Proyectos, para que de esta manera se puedan emitir en forma conjunta conclusiones más adecuadas, estableciendo así las bases para una metodología de trabajo en la histología.

El Proyecto de Investigaciones Histológicas ha elaborado este manual con el objetivo fundamental de facilitar el manejo de la técnica histológica, indicando los cuidados que deben tomarse desde la colecta, fijación, lavado, etc., y los fijadores y técnicas más utilizadas. Asimismo, se anota la preparación de fijadores y algunas recomendaciones importantes para obtener preparaciones o laminillas que proporcionen datos confiables y definitivos para lograr la meta principal del Proyecto, o sea determinar épocas y tallas de madurez gonadal de las especies de importancia pesquera.

III. Desarrollo

Colecta

La colecta de organismos tanto vegetales como animales debe valorarse primeramente, aspecto que depende fundamentalmente de los objetivos del proyecto de investigación. Pueden obtenerse organismos vivos para estudiar su comportamiento en el laboratorio, o ejemplares posmórtem para otros tipos de estudio, entre los que se incluye el diagnóstico histológico; la colecta es parte importante de la técnica histológica, del hábil manejo y toma de datos del muestreo depende mayormente la obtención de resultados confiables.

Enseguida hay que precisar dónde y cómo han de realizarse las colectas, para que de esta manera preparen oportunamente el material y reactivos adecuados, considerando como indispensable lo siguiente:

Material

1. Bolsa de plástico
2. Ligas, hilo o alambres forrados
3. Estuche de disección conteniendo:
 - 2 Tijeras rectas (con filo)
 - 2 Pinzas rectas
 - 2 Mangos de bisturí
 - 2 Navajas para bisturí
4. Una caja de navajas de rasurar
5. Guantes
6. Cubetas de plástico
7. Regla de tope
8. Etiquetas
9. Lápiz semiduro con borrador o marcador con tinta insoluble
10. Libretas u hojas para datos de colecta
11. Cajas de cartón o frascos
12. Jeringa

Reactivos

1. Agua destilada
2. Fijador (depende del estudio y del organismo)

Método de colecta

1. Colectar la cantidad mínima necesaria de ejemplares.
2. Si es el caso, se indicarán los datos particulares que han de tomarse en cuenta.
3. Tener listo el material a utilizar.
4. Tomar fotografías de los organismos, una vez colectados, o bien elaborar esquemas de lo más representativo.
5. Una vez extraídos los ejemplares de su hábitat natural, no deberán permanecer expuestos al sol.
6. Cuando se obtiene una fracción del organismo, es conveniente tomar fotografías o elaborar esquemas antes de separarlo o fijarlo, indicando posición anatómica, color y textura (poner nombres a las estructuras conocidas para tener relaciones anatómicas reales).
7. Lavar rápidamente el ejemplar en agua destilada, o la fracción del mismo, para eliminar impurezas (arena, sangre, etc.) que puedan interferir en el estudio.
8. Anotar con lápiz o marcador de tinta insoluble, con letra clara, la clave a utilizar.
9. La clave que se utiliza debe ser sencilla y clara.
10. Indicar en la libreta u hojas de colecta, los datos que se anexan en el *Cuadro No. 1*.
11. Envolver la muestra en una gasa doble, junto con la clave, amarrando perfectamente, pero sin apretar.
12. Se procede a fijar.

Fijación

El objetivo de utilizar un fijador es detener los procesos que conducen a la descomposición. Se considera que se realiza una buena fijación cuando se toman en cuenta los siguientes aspectos:

1. El fijador a utilizar debe elegirse cuidadosamente, de acuerdo a las necesidades planteadas por el estudio.
2. La fijación debe realizarse en lugares donde la temperatura no exceda de 25° C (a la sombra).
3. El ejemplar debe colocarse en el fijador (previo lavado) inmediatamente después de ser obtenido.
A) Si el organismo es grande y se fija completo, debe inyectarse el fijador

con una jeringa, haciendo una presión lenta al émbolo para que el líquido penetre poco a poco sin lesionar los tejidos.

B) Cuando se obtiene una fracción del organismo es conveniente tomar fragmentos del órgano a estudiar, con tamaño de 1 cm³

4. Tomando en cuenta el tamaño del organismo, el líquido fijador debe usarse en una relación de 10 a 1.
5. Se colocan las muestras en bolsas de plástico o bien en frascos perfectamente cerrados, y se agrupan por tallas, épocas o temporadas, según sea el caso, manteniéndolos en refrigeración o bien en lugares frescos.

Ahora bien, existen diferentes tipos de fijadores, pero los más utilizados, tanto para vertebrados como invertebrados, son el formol al 5% y 10%, formol neutro, Buffer Formalina, Bouin, Zenker y F.A.A.

Después de la fijación, el material queda lo suficientemente endurecido como para que, en algunas ocasiones congelando, se corte directamente al microtomo de congelación (criostato) (*Figura 1*) en rebanadas del orden de 10 a 30 μ m. Sin embargo, la mayoría de las veces se hace necesaria su inclusión en un material que le de mayor consistencia y dureza, tales como la parafina y la celoidina; los pasos para lograrlo reciben el nombre de marcha de inclusión. (*Figuras 2, 3 y 4*).

Ya sea que la muestra se corte directamente con el microtomo de congelación o que se incluya en parafina, debe lavarse después de fijada para eliminar el exceso de fijador.

Lavado

A) Material

1. Charola de disección
2. Gasa
3. Hilo
4. Etiquetas
5. Frascos
6. Navajas de rasurar
7. Cajas de petri
8. Tijeras
9. Pinzas

El lavado de la muestra dependerá del fijador que se haya usado y varía desde el agua corriente, para eliminar el formaldehído, hasta alcohol del 70% o alcohol yodado para eliminar el Bouin (ácido pícrico) y el Zencker (bicloruro de mercurio), respectivamente.

Por lo general se utilizan fijadores conteniendo formaldehído, por lo que es importante señalar la forma de eliminación del mismo. Se toma el ejemplar usando guantes y pinzas y colocándolo sobre una charola de disección; se lava

para eliminar el exceso de fijador y se procede a seccionar con navajas de rasurar el órgano en estudio, tomando fracciones de 1 cm^3 , las que a su vez se colocan en una gasa que se etiqueta con la clave; se envuelve y amarra con un hilo, dejando un extremo largo.

El tejido ya fijado se pasa a un frasco de boca ancha, el cual se tapa con una gasa perfectamente estirada con una liga; se coloca el frasco bajo el chorro del agua, dejando correr ésta durante 1 a 24 horas, dependiendo del tamaño de la pieza y del tiempo de fijación (*Figura 3*).

Marcha de inclusión

Material

1. Moldes de inclusión o escuadras metálicas
2. Vasijas con parafina
3. Pinzas
4. Tijeras
5. Agujas de disección
6. Lámparas de alcohol
7. Alcohol glicerinado
8. Etiquetas
9. Pincel
10. Estufa

La marcha de inclusión la forman los procesos de deshidratación, transparentación, paso por parafinas de punto de fusión creciente e inclusión definitiva.

Deshidratación

Se usan generalmente alcohol etílico, acetona y alcohol isopropílico.

El desplazamiento que sufre el agua por el agente deshidratante debe ser gradual, por lo que se utilizan alcoholes crecientes que pueden ser desde alcohol al 25 % hasta el absoluto, evitando de esta forma la retracción excesiva del material en estudio (*Figura 4*).

Transparentación

Antes de pasar las piezas a la parafina, y a fin de asegurar la eliminación total del alcohol, se hace necesario "transparentar" con una sustancia que las substituya y prepare para la parafina, como son: el tolueno, xileno y benceno, removiendo de 2 a 3 veces estas sustancias aclarantes con tiempos que varían

de 15 minutos hasta una hora (*Figura 4*). Todos estos pasos pueden facilitarse con el uso del procesador de tejidos (*Fotografías Nos. 4 y 5*).

Inclusión en parafina

El paso siguiente consiste en impregnar la pieza gradualmente con parafinas de punto de fusión creciente: parafina I (54-56° C), parafina II (56-58° C), y la inclusión final se hace con la parafina más dura (58-60° C), la cual permite obtener un bloque que se corta en el microtomo.

Para la obtención del bloque de inclusión se coloca un molde, como muestra la *Figura 5*, y mediante el uso de un pincel se cubren las paredes y el piso del mismo con alcohol glicerinado para evitar que se pegue el bloque de parafina en el molde.

Se vierte la parafina de inclusión (59-60° C) formando un pequeño cojinite; con unas tijeras calientes se corta la gasa que contiene el órgano y teniendo cuidado de no presionar, se toma con unas pinzas para darle la orientación adecuada; se termina de llenar el molde con la parafina, eliminando las burbujas formadas en el bloque con aguja de disección previamente calentada, sin tocar el órgano.

Se coloca la etiqueta y se deja solidificar, poniéndolo en un recipiente con agua (*Figura 5*).

Obtención de corte

Material

1. Microtomo
2. Baño de flotación
3. Termómetro
4. Cartoncillo negro
5. Agujas de disección
6. Pincel
7. Canastillas de vidrio o metálicas
8. Marcador (lápiz diamante)
9. Portaobjetos
10. Trapo.

Una vez que se ha obtenido el bloque de inclusión, se pone en la platina del microtomo y se coloca la cuchilla, cuidando que ambos queden fijos, se marcan las micras (5-10) y se gira la manivela, iniciándose la obtención de cortes.

Antes de proceder a cortar, se prepara el baño de flotación que contiene gelatina y agua a una temperatura de 45-50° C, que recibirá los cortes obtenidos en el microtomo, los que deberán ser colocados con ayuda de un pincel

o una aguja de disección sobre la superficie del agua, permitiéndoles extenderse y ser recogidos mediante el uso de portaobjetos perfectamente limpios.

Es importante que los cortes queden centrados y siempre en una misma posición. Se dejan escurrir en una gradilla y se acomodan en una canastilla de vidrio o metálica; posteriormente, se meten en la estufa a una temperatura de 60° C por 30 minutos como tiempo mínimo, permitiendo que el corte se adhiera bien al portaobjetos, quedando listas para ser utilizadas en la técnica de coloración.

Desparafinación

Material

1. Cajas de coloración
2. Canastillas metálicas
3. Papel absorbente
4. Cajas de petri
5. Embudo

La cantidad de ejemplares manejados a nivel de muestreos hace indispensable el uso de cajas de coloración que permitan agilizar la cantidad de preparaciones elaboradas.

Se preparan 11 cajas de coloración con los siguientes reactivos (*Figura 6*).

CAJA 1	XILOL	5 MIN
CAJA 2	XILOL	5 MIN
CAJA 3	XILOL	5 MIN
CAJA 4	C X C	5 MIN
CAJA 5	C X C	5 MIN
CAJA 6	R OH 96 %	5 MIN
CAJA 7	R OH 96 %	5 MIN
CAJA 8	R OH 70 %	5 MIN
CAJA 9	R OH 70 %	5 MIN
CAJA 10	AGUA DESTILADA	5 MIN
CAJA 11	AGUA DESTILADA	5 MIN

Coloración

La coloración tiene por objeto proporcionar contraste a las estructuras observadas al microscopio, lo que permite una mejor interpretación del órgano en estudio.

Ahora bien, la aplicación de una técnica depende del estudio que se pretenda efectuar pero es recomendable iniciarlo con alguna(s) técnica(s) topográfica(s) que nos proporcione la estructura general de los tejidos, grupo al que per-

tenecen la Hematoxilina eosina (H E) y la tricrómica de Gallego descritas en este manual.

Técnica hematoxilina eosina

La hematoxilina es un colorante de tipo básico que tiñe núcleo, ribonucleoproteínas, citoplásmicas, mielina, etc.

La eosina es un colorante ácido que se usa para teñir el citoplasma.

1. Coloración con hematoxilina: (filtrar antes de usar) 1 min.
2. Lavar en agua de la llave hasta eliminar el exceso de colorante.
3. Diferenciar rápidamente en alcohol ácido (toma una coloración rosa).
4. Lavar con agua de la llave, dos veces (agitar).
5. Virar en agua amoniacal (toma coloración azul).
6. Lavar en agua de la llave, 2 cambios de 2 minutos.
7. Lavar en agua destilada, 2 cambios de 3 minutos.
8. Coloración con eosina 2 minutos.
9. Lavarlo rápidamente en alcohol acetona.
10. C X C, 2 cambios de 5 minutos.
11. Xileno, 3 cambios de 5 minutos.
12. Montar en bálsamo de Canadá o resina sintética.
13. Etiquetar o marcar con un lápiz diamante.

Técnica tricrómica de Gallego

La técnica tricrómica de Gallego es una de las tantas técnicas topográficas que permiten, además, poner de manifiesto y de manera especial a las fibras colágenas, ya que éstas destacan netamente sobre el resto de los componentes tisulares; por lo tanto, es una técnica de las denominadas especiales.

Esta técnica se basa en la utilización de una mezcla de dos colorantes, el ácido pícrico y el carmín índigo. El colorante de mayor poder de difusión (carmín índigo) se fijará sobre las estructuras menos densas.

La coloración nuclear se logra por medio de una fucsina fenicada de Zielh.

Método

1. Fijación en formol al 10% durante 24 hrs. o más.
2. Cortes por congelación o parafina.
3. Poner los cortes en agua formolada, por lo menos una hora antes de la coloración.
4. Fucsina acética durante 8 minutos.
5. Lavar en agua destilada, hasta eliminar el exceso de colorante.
6. Virofijación en formol acético, 4 minutos.
7. Agua destilada.
8. Picro Indigo carmín, 2 minutos.

9. Alcohol pícrico, lavado rápido.
10. Alcohol absoluto, lavado rápido.
11. Alcohol absoluto Xileno, 2 cambios de 1 minuto.
12. Xileno, 3 cambios de 2 minutos cada uno.
13. Montar con bálsamo de Canadá o resina sintética.
14. Etiquetar o marcar con lápiz diamante.

Resultados

núcleos	rojo violáceo
haces colágenos	azul verde
citoplasma	amarillo
queratina	amarillo
fibras musculares	amarillo y verde

IV. Preparación de reactivos y colorantes

Fijadores

1. Líquido de Bouin
Tiempo de fijación de 1-8 días.
Eliminación del fijador con varios cambios de alcohol del 70 %
Solución acuosa saturada de ácido pícrico 75 partes
Formol comercial (formalina o formol al 4 %) 25 partes
Acido acético 5 partes
2. F.A.A. (formol aceto alcohol)
Tiempo de fijación 24 horas mínimo
Eliminación del fijador con agua corriente o alcohol del 70 %
Formol comercial (formalina) 10 ml
Agua destilada 35 ml
Acido acético glacial 5 ml
Alcohol del 95-96 50 ml
3. Formol al 10 %
Eliminación del fijador con agua corriente
Formol comercial (formalina) 1 parte
Agua destilada 9 partes
4. Zenker
Tiempo de fijación 6-24 horas
Eliminación del fijador con alcohol yodado
Cloruro de mercurio 25 gr.
Bicromato de potasio 125 gr.
Sulfato de sodio 50 gr.
Agua destilada 500 ml
Acido acético glacial (agregar en el momento de usar) 125 ml
5. Alcohol yodado
Alcohol del 70 % 100 ml
Tintura de yodo 10 ml
6. Formol neutro:
Tiempo de fijación 24 horas mínimo

Eliminación del fijador con agua corriente
Formol al 10% saturar con Na CO₃ al 1%
(usar papel tornasol como indicador)

Desparafinación

1. Carbol Xilol Creosota (C X C)	
Fenol	10 gr
Xilol	10 gr
Creosota de la Haya	80 gr

Técnica hematoxilina eosina

1. Hematoxilina	
Hematoxilina cristalizada	1 gr
Alcohol etílico absoluto	10 ml
Alumbre de potasio o amonio	20 gr
Oxido mercurico	0.5 gr
Agua destilada	299 ml

Se disuelve la hematoxilina en el alcohol y el alumbre en agua caliente, se mezclan ambas soluciones, se lleva la mezcla a ebullición y se agrega poco a poco el óxido mercurico fuera de la parrilla para evitar la proyección del colorante. Se calienta la solución nuevamente hasta que la mezcla tome color rojo púrpura, se retira de la parrilla y se enfría. Filtrar antes de usar (mínimo 5 veces).

2. Alcohol ácido	
Alcohol del 70%	99 cc
HCL	1 cc
3. Agua amoniaca	
Agua destilada	80 ml
Hidróxido de amonio	4 gotas
4. Eosina	
Eosina	1 gr
Agua destilada o etanol al 75%	100 ml

Se recomienda añadir unos granos de Orange G. para obtener una mejor coloración. Se puede utilizar en solución alcohólica o acuosa, agregando unas gotas de cloroformo para la preservación del colorante.

5. Alcohol acetona	
partes iguales	

Técnica tricrómica de Gallego

1. Fucsina acética	
Agua destilada	10 ml
Fucsina fenicada	10 gotas
Acido acético	1 gota
2. Formol acético	
Agua destilada	10 ml
Formol puro	2 gotas
Acido acético	1 gota
3. Picro Indigo Carmín	
Carmin índigo al 1 %	1 parte
Acido pícrico solución acuosa saturada	2 partes
4. Fucsina fenicada de Ziehl	
Fucsina básica	1 g
Fenol cristalizado	5 g
Alcohol 96 %	10 ml
Agua destilada	90 ml
5. Alcohol pícrico	
Solución alcohólica (96 %), saturada de ácido pícrico	

Otros reactivos

Gelatina (baño de flotación)

Poner un matraz de 1 000 ml con 400 ml de agua destilada, cubrir la superficie de agua con gelatina y dejar reposar 5 minutos agregando 400 ml de agua caliente hasta que se disuelva. Se vierte en el baño de flotación y se le puede agregar el agua que se considere conveniente, para el montaje de los cortes en los portaobjetos, conservando la temperatura de 45-50° C.

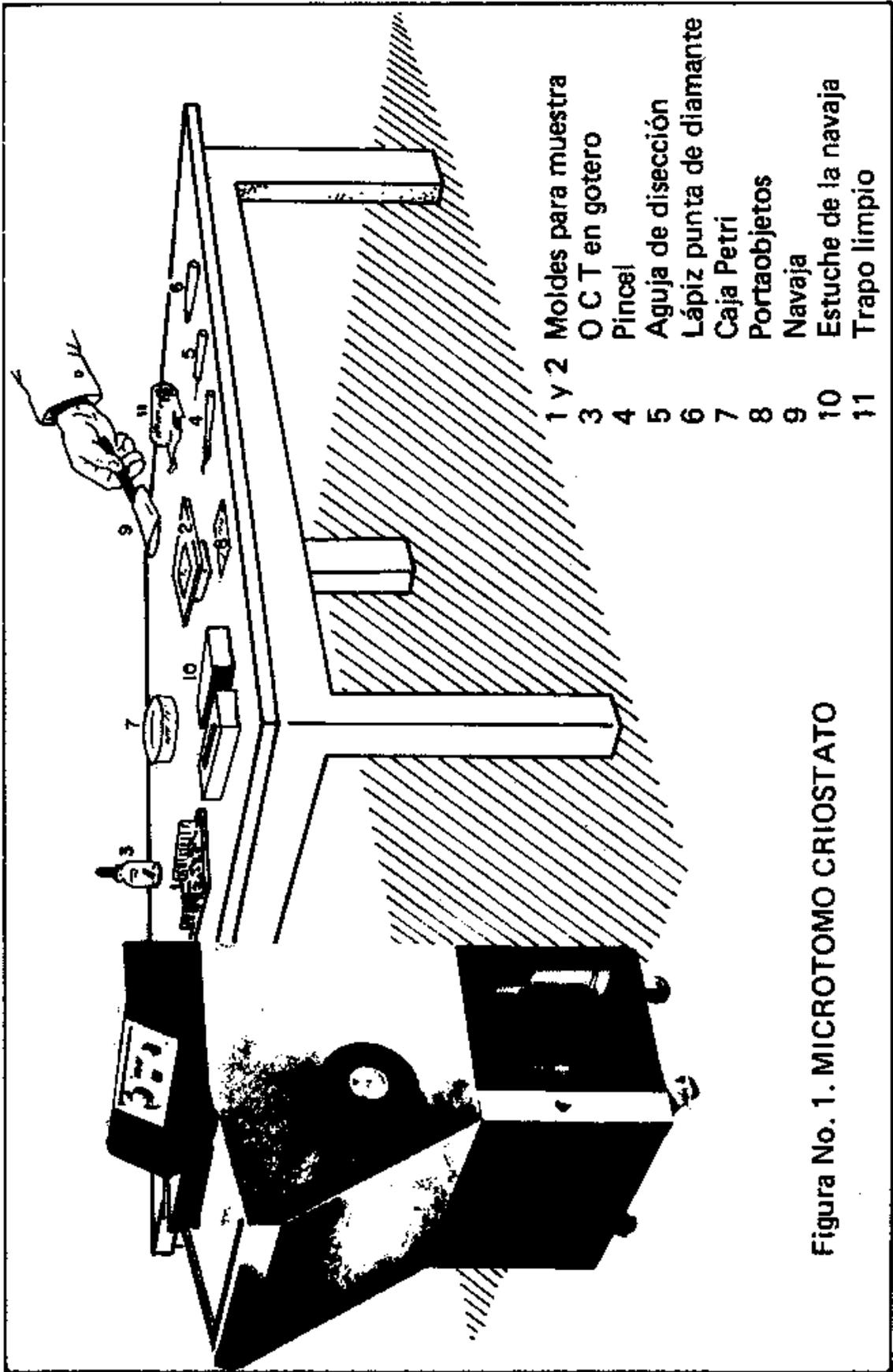
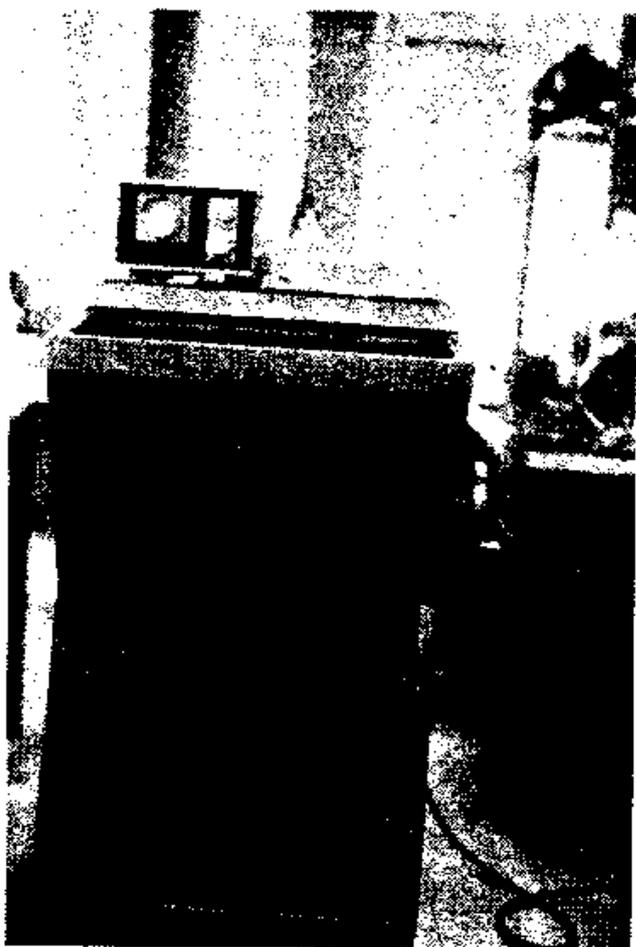
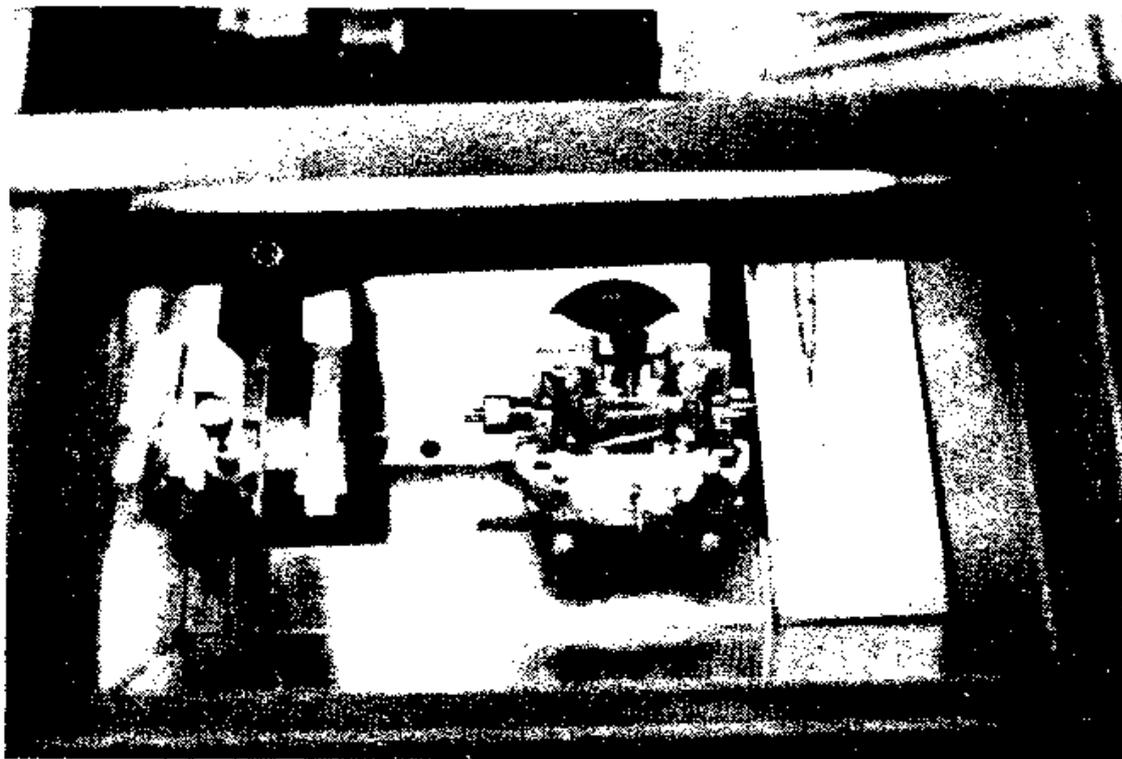


Figura No. 1. MICROTOMO CRIOSTATO



Fotografías Nos. 1 y 2
CRIOSTATO. Aparato
utilizado para la obtención
de cortes por congelación
en cámara fría.



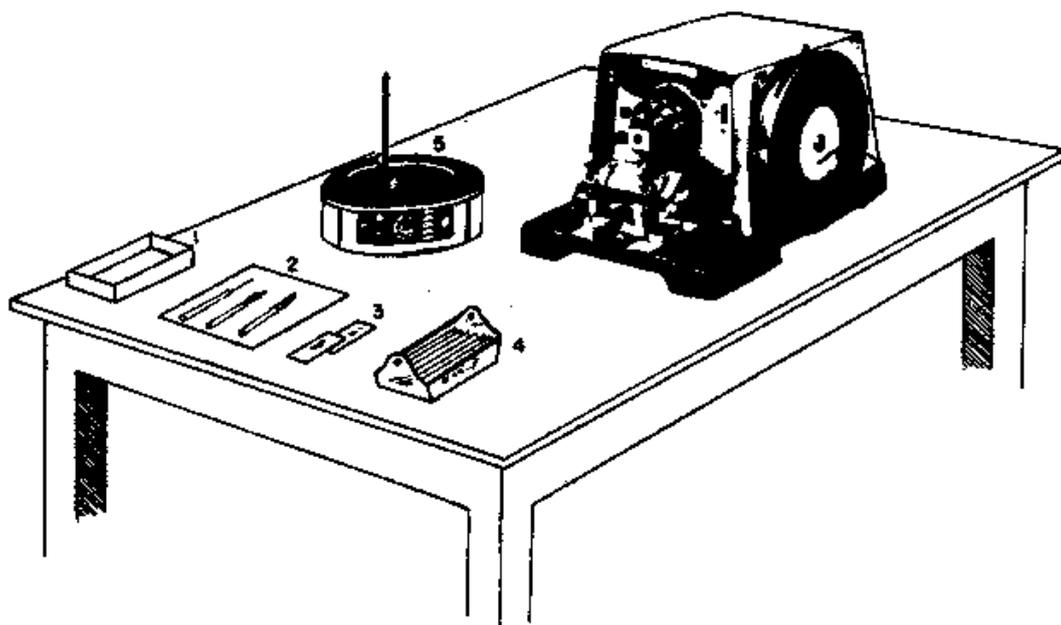


Figura No. 2. MICROTOMO PARA CORTES EN PARAFINA

Material indispensable para lograr una buena preparación

- | | | |
|---------------------------|----------------------|---------------|
| 1. Cartoncillo negro | 3. Portaobjetos | 4. Canastilla |
| 2. Aguja, pincel, bisturí | 5. Baño de flotación | |



Fotografía No. 3. Microtomo A. O. para órganos incluidos en parafina.

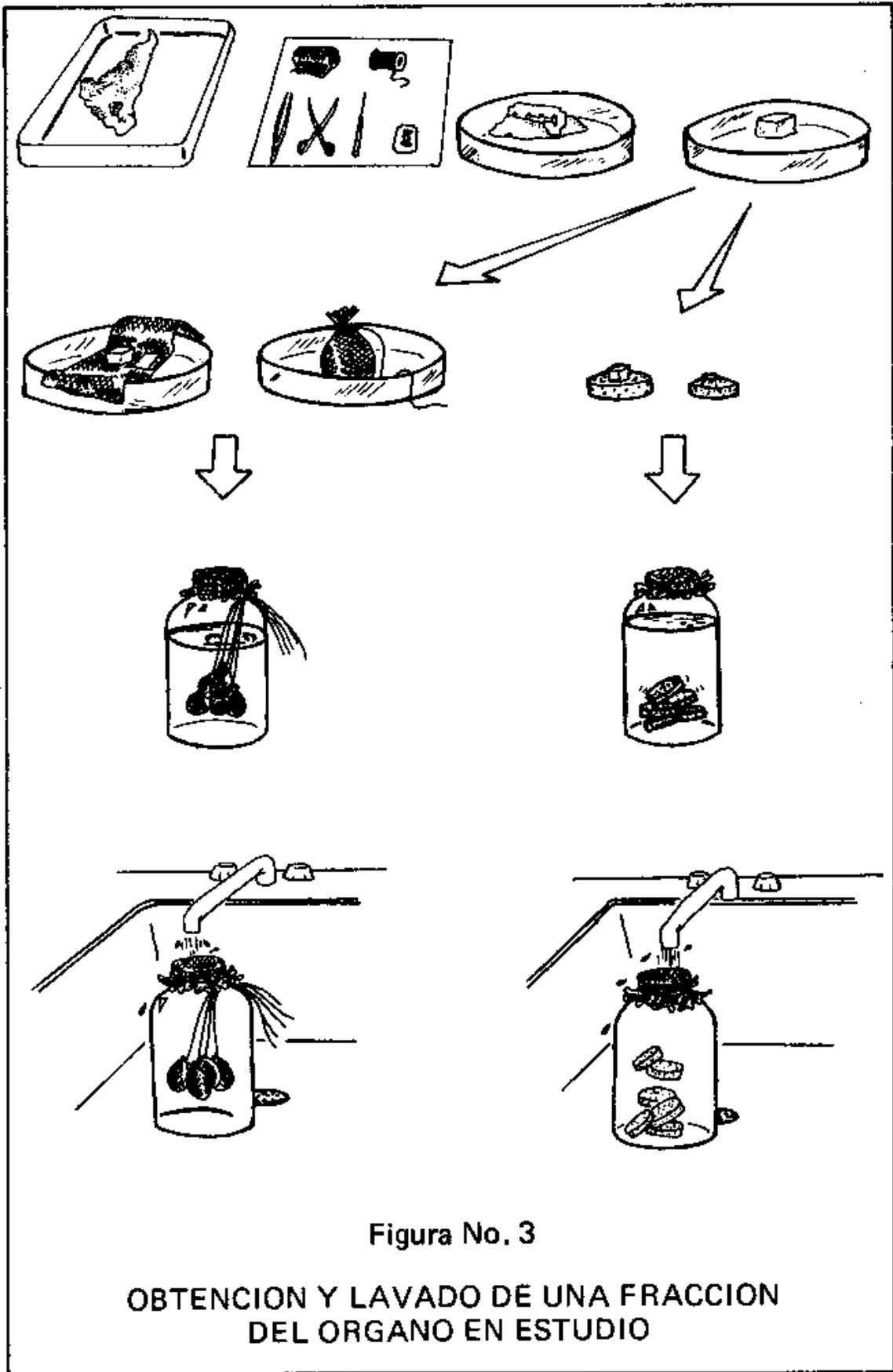


Figura No. 3

OBTENCION Y LAVADO DE UNA FRACCION
DEL ORGANNO EN ESTUDIO

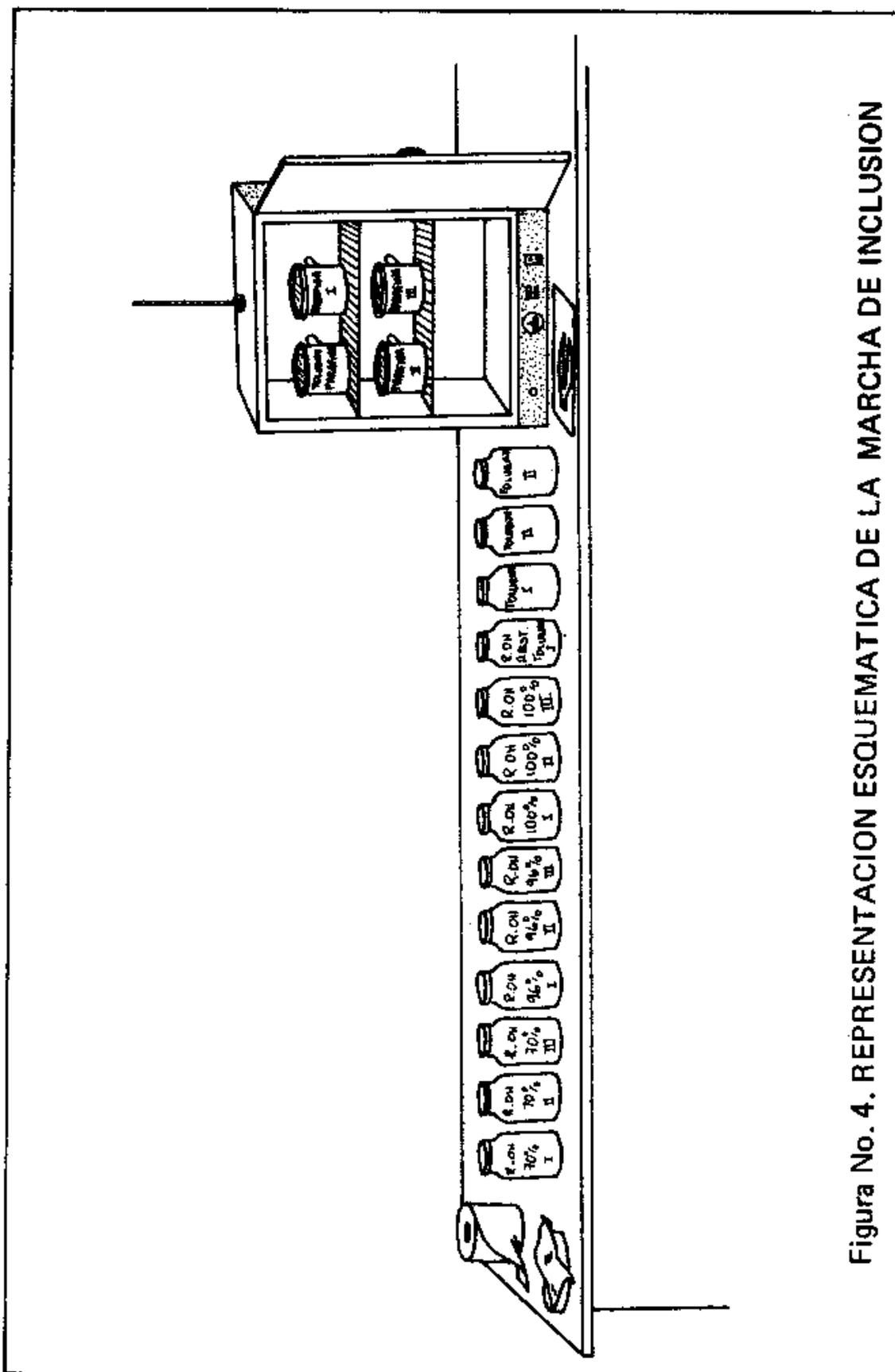
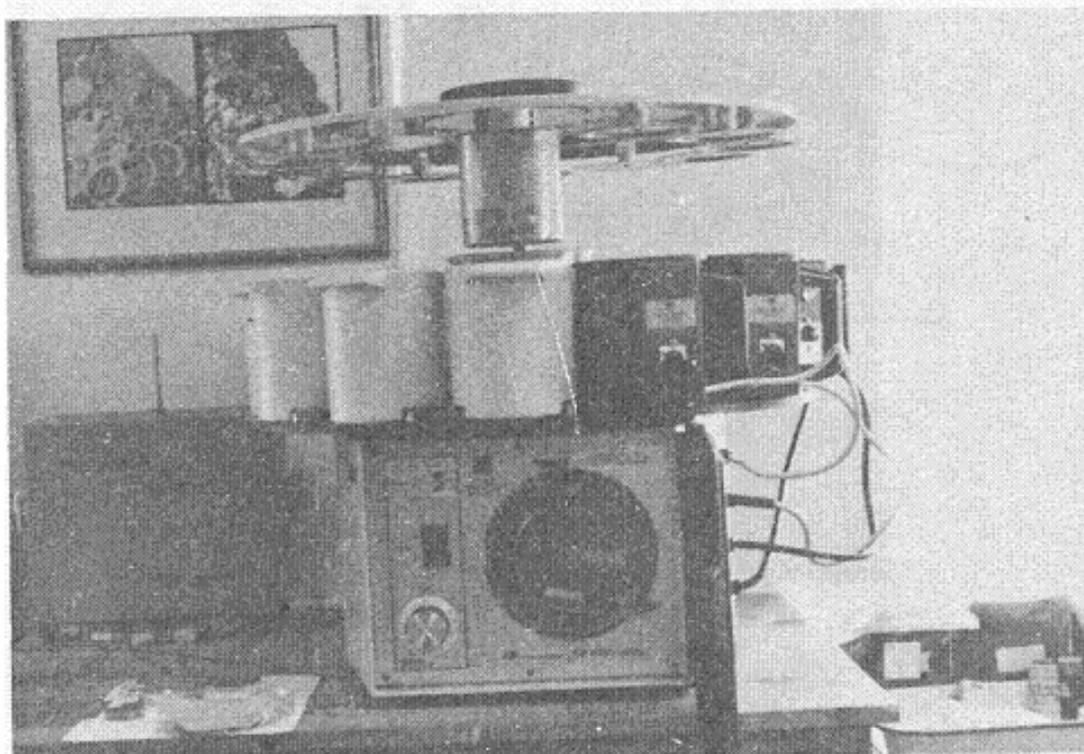


Figura No. 4. REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA MARCHA DE INCLUSION

Fotografía No. 4. Procesador automático de tejidos



Fotografía No. 5. Aparato que facilita la "marcha de inclusión" y prepara la muestra para la inclusión definitiva.

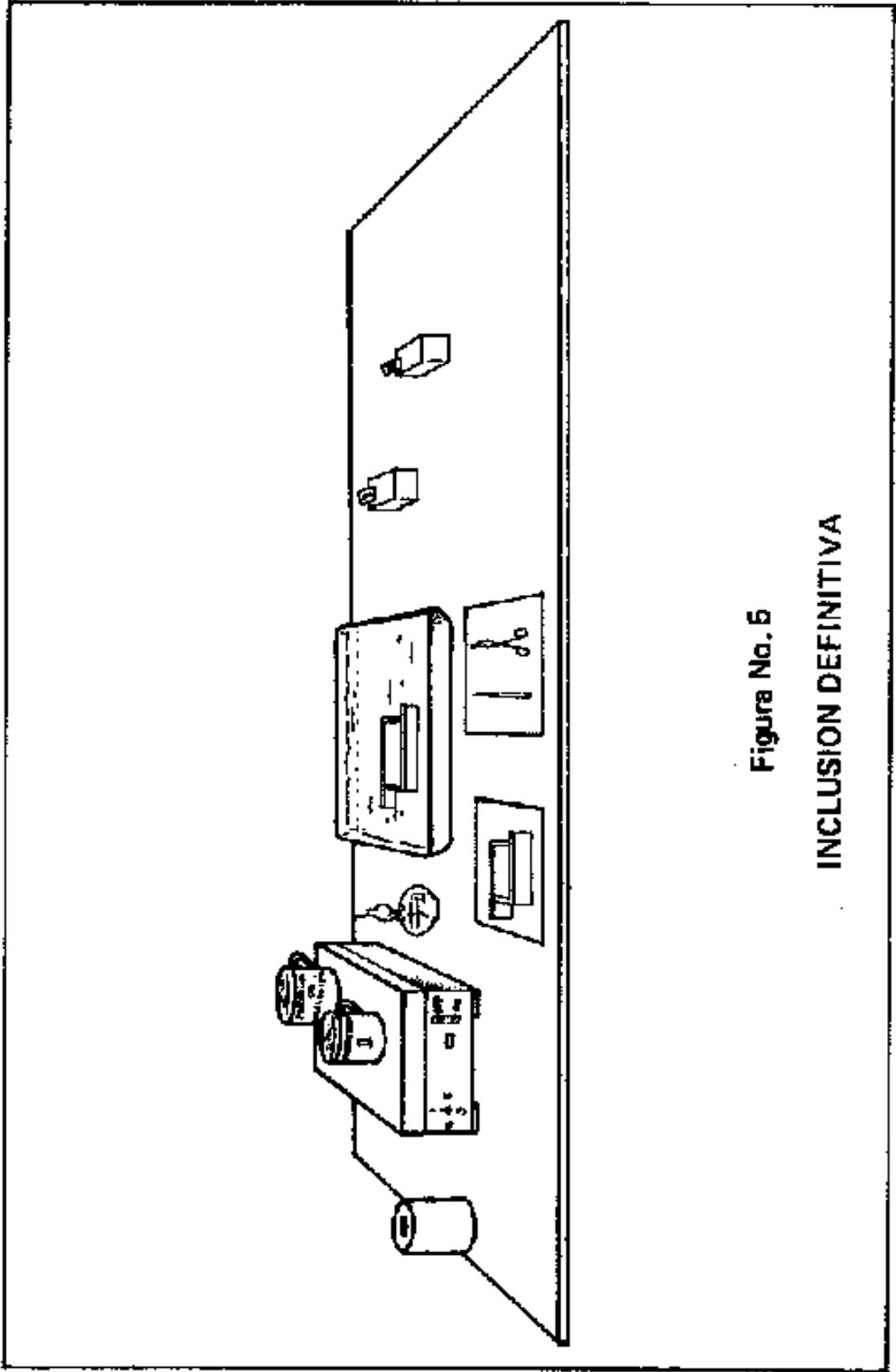
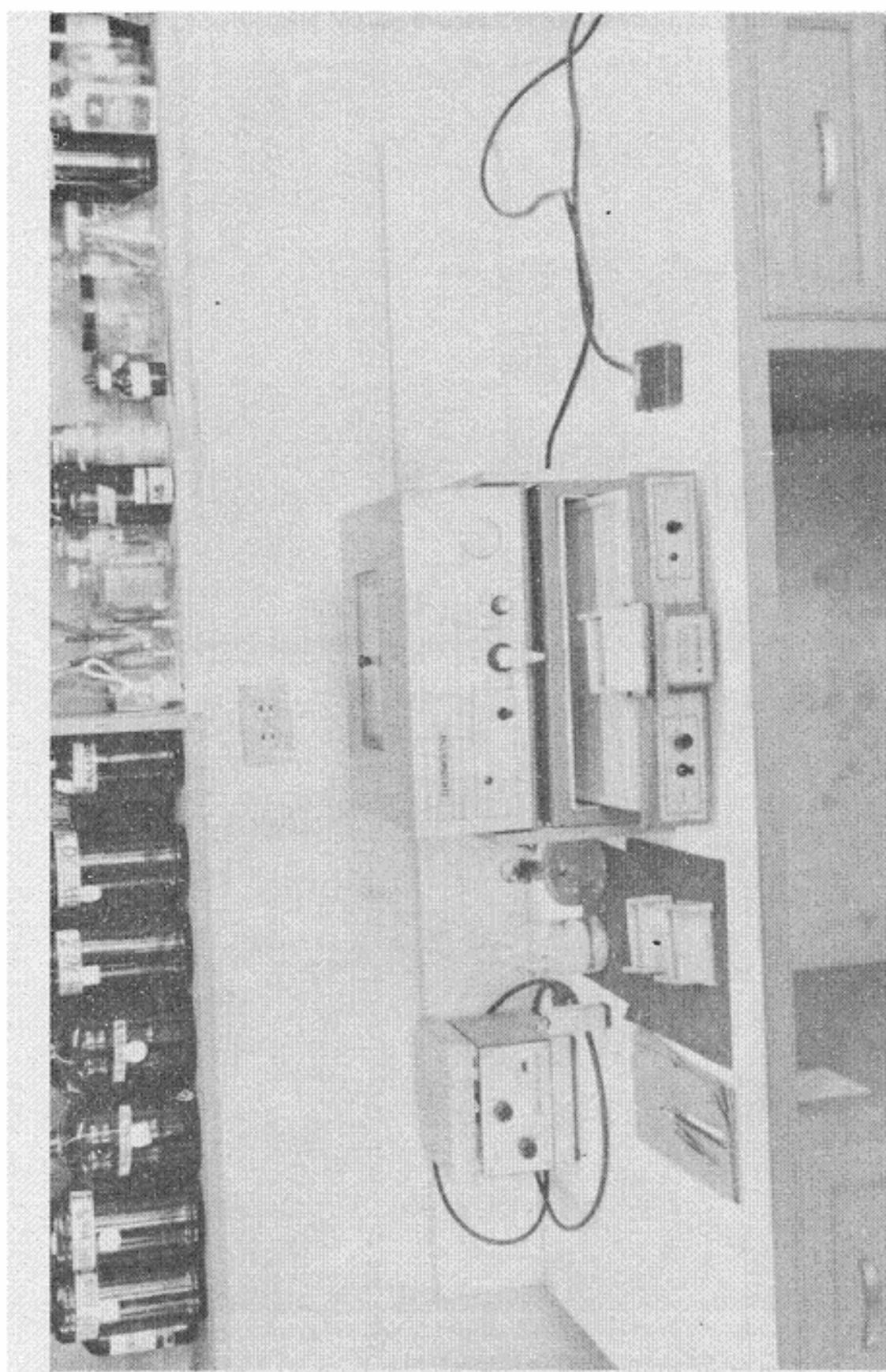


Figura No. 5

INCLUSION DEFINITIVA



Fotografía No. 6. Aparato de inclusión en parafina, de uso automático

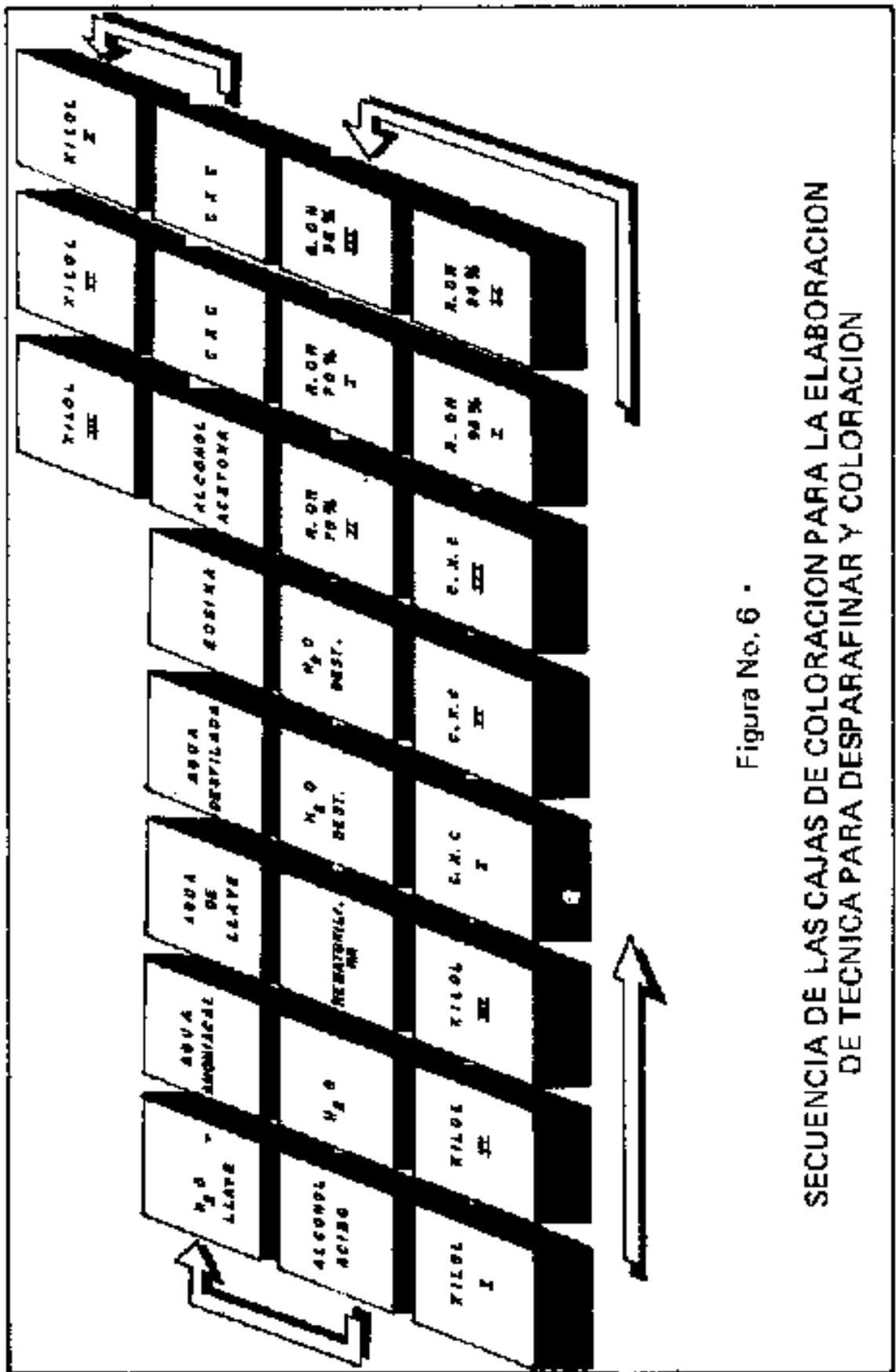
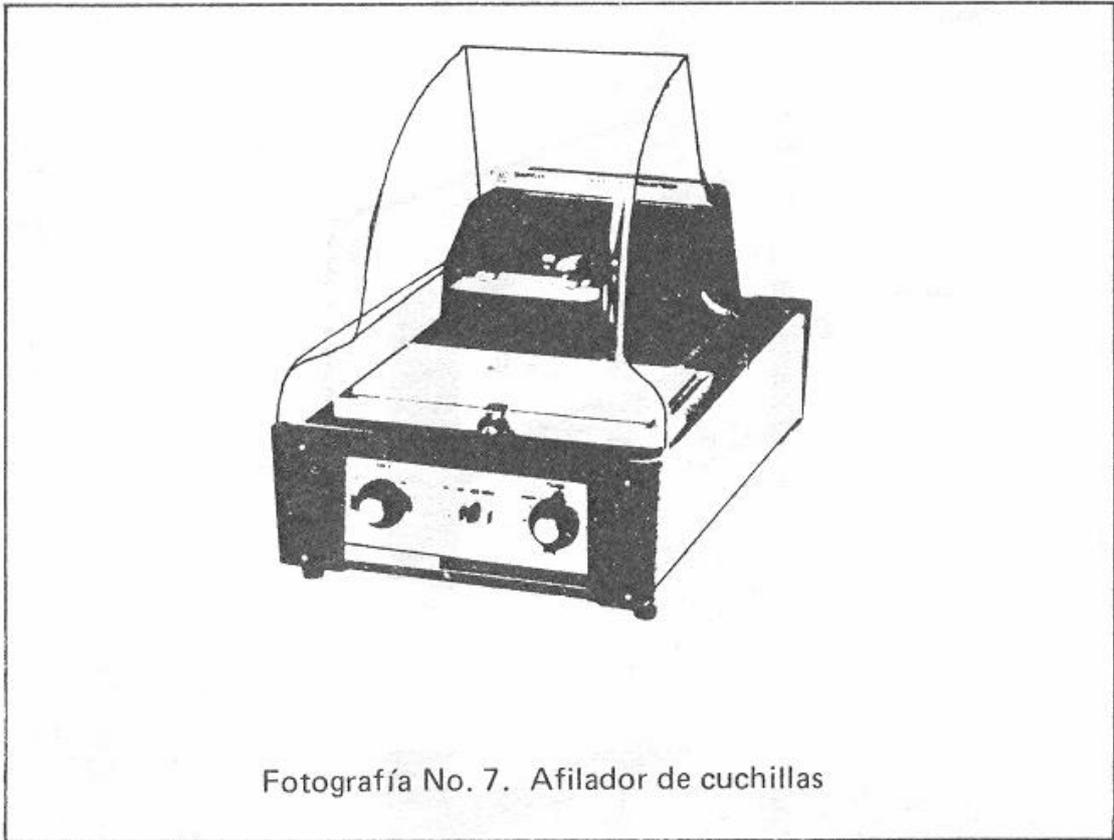


Figura No. 6 •

SECUENCIA DE LAS CAJAS DE COLORACION PARA LA ELABORACION DE TECNICA PARA DESPARAFINAR Y COLORACION



Fotografía No. 7. Afilador de cuchillas



Fotografía No. 8. Afilador de cuchillas

V. Recomendaciones

1. Después de usar las cuchillas, limpiarlas con xitol mediante el uso de un trapo que no suelte pelusa, y con movimiento hacia el filo de la misma.
2. Observar al microscopio el filo de las cuchillas y, de ser indispensable, afilar y asentar. (*Fotografía No. 5*).
3. Las cuchillas, antes y después de usarlas, deberán guardarse en sus estuches para evitar melladuras.
4. Dejar perfectamente limpios los aparatos.
5. Revisar periódicamente los aparatos para su mantenimiento adecuado.
6. Los reactivos destinados para un uso en particular (desparafinar, deshidratar, etc.) no deberán ser utilizados para otro fin.
7. Filtrar la hematoxilina antes de usar.
8. Filtrar los reactivos después de usarlos, y guardarlos en frascos para reactivos color ámbar.
9. Al realizar cualquier cambio de las fracciones de órgano de un reactivo a otro, eliminar el excedente del mismo mediante el uso de papel absorbente, evitando de esta manera la contaminación excesiva de las sustancias.
10. Antes de efectuar una coloración en serie, se deberán probar los reactivos y colorantes con dos o tres preparaciones.

Se agradece la elaboración de esquemas y colaboración a Juan A. Figueras J., Luis Alberto Juárez y Fidalia Caballero.

VI. Bibliografía

DIFIORE, M.S.H., 1971. An Atlas of Human Histology. Lea and Febiger Editions, Philadelphia.

FERNANDEZ A., TAPIA V. y URÍA G., 1979. Manual para el curso de Histología Animal. E.N.C.B. Inst. Politécnico Nal. México. México.

GAVIÑO G., JUAREZ y FIGUEROA H., 1979. Técnicas Biológicas selectas de laboratorio y de campo. Editorial Limusa. México.

HUMASON G. I., 1972. Animal Tissue, Techniques. Third Edition, W.H. Freeman and Co. U.S.A.

LINCH M. RAPHAEL STANLEY, MELLOR, SPARE P., INWOOD 1972. Métodos de laboratorio. Segunda edición, Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México.