

TPH1 - TRABAJO PRÁCTICO Nº 1: MICROSCOPIA. TÉCNICA HISTOLÓGICA. INTERPRETACIÓN DE IMÁGENES MICROSCÓPICAS. HISTOQUÍMICA.

OBJETIVOS DEL TP

- Adquirir la habilidad del manejo del microscopio óptico
- Entender el fundamento y la utilidad de las diferentes técnicas de tinción.

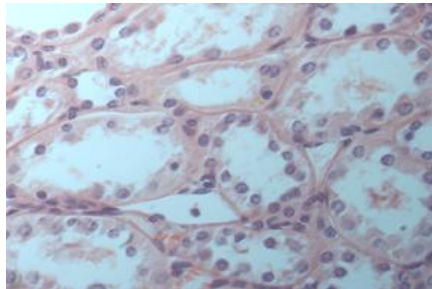
A) MANEJO DE MICROSCOPIO ÓPTICO

- Reconocer los componentes ópticos y mecánicos de un microscopio óptico.
- Manejar adecuadamente un microscopio óptico binocular y monocular.
- Realizar una correcta iluminación. Enfocar correctamente con las distintas lentes objetivo.
- Explicar las diferencias entre un microscopio óptico y un microscopio electrónico de transmisión

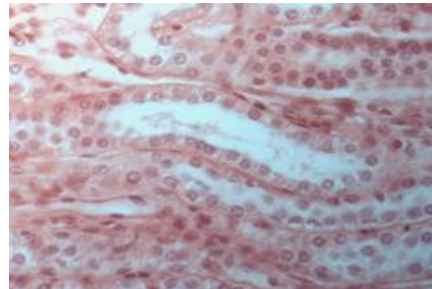
B) TÉCNICA HISTOLÓGICA DE RUTINA E INTERPRETACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS

1) Tinción de rutina: hematoxilina y eosina (H&E) – preparados de distintos órganos.

- Reconocer en base a su forma y a su afinidad tintorial: el núcleo (tipo de cromatina, presencia de nucléolo), citoplasma (distintas intensidades de tinción acidófila y basófila), matriz extracelular (distintas intensidades de tinción acidófila y basófila). Interpretar las diferentes incidencias de cortes de una estructura histológica (oblicuo, longitudinal y transversal) y reconocer la relación entre la imagen bidimensional observada en un corte histológico y su estructura tridimensional original.



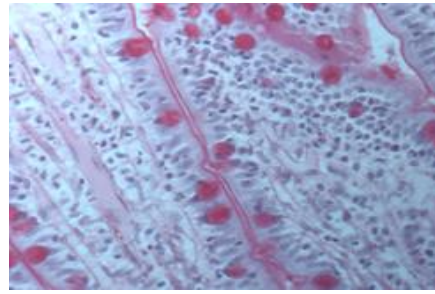
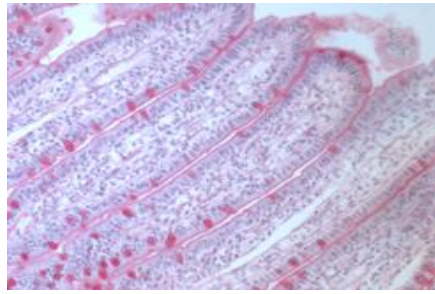
cortes transversales



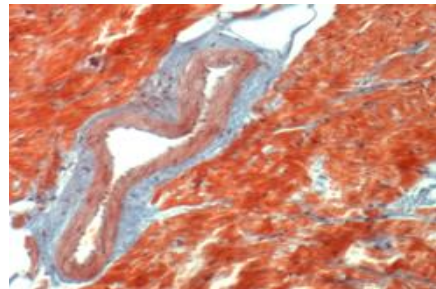
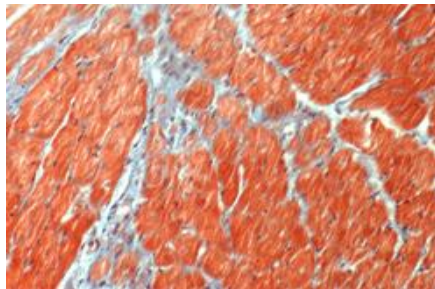
cortes longitudinales

C) TÉCNICAS HISTOLÓGICAS ESPECIALES

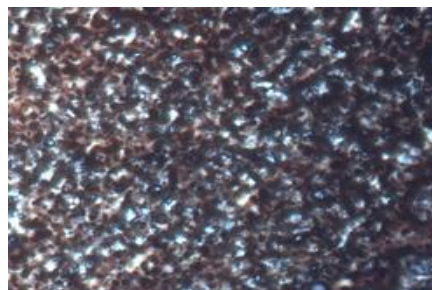
- **Tinción de H&E con PAS** - preparado fijo de intestino delgado:
 - Reconocer la membrana basal del epitelio, el glucocáliz de especializaciones de membrana apical y el citoplasma de células de secreción mucosa. Comparar con H&E.



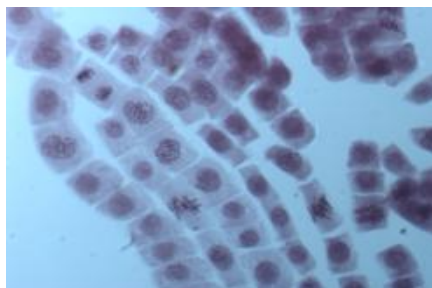
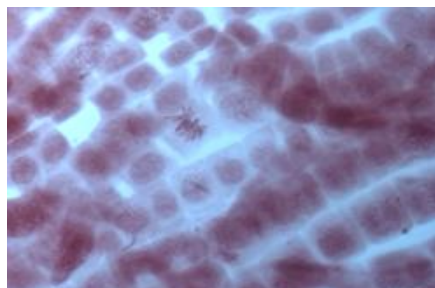
- **Tricrómico de Masson** – preparado fijo de corazón de rata:
 - Reconocer las fibras colágenas de la matriz extracelular (celeste), el citoplasma de las fibras musculares esqueléticas cardíacas (rojo), núcleos (azules) y los eritrocitos (naranja). Comparar con H&E.



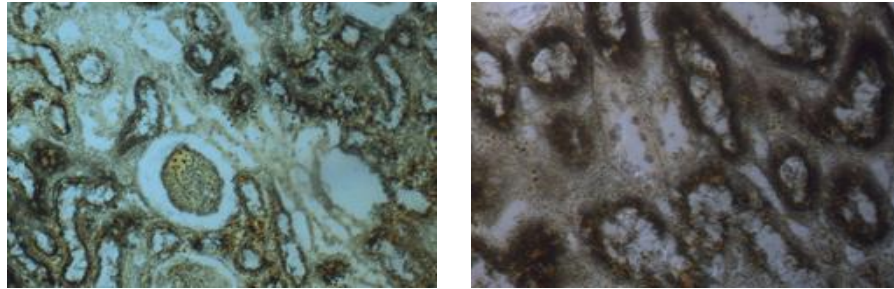
- **Técnica de Sudán** - preparado fijo de glándula suprarrenal:
 - Reconocer las células de secreción esteroidea con inclusiones lipídicas.



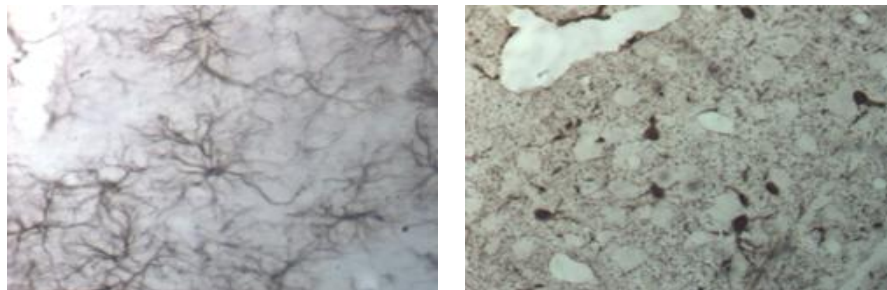
- **Técnica de Feulgen** – preparado fijo de células de cebolla:
 - Reconocer la cromatina de células en interfase y en división celular.



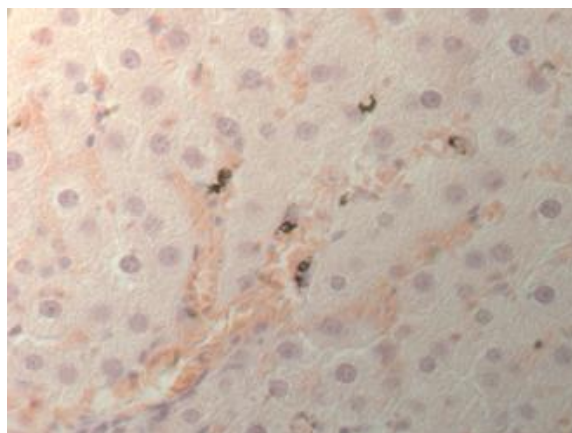
- **Técnica de localización de actividad enzimática** – preparado fijo de riñón:
 - Reconocer la localización de la enzima fosfatasa alcalina en el ribete en cepillo de los túbulos contorneados.



- **Inmunohistoquímica** – preparado fijo de cerebro de rata – GFAP o S100 β .
 - Reconocer la expresión de proteínas específicas.



- **Técnica de H&E con infusión de tinta china previa a la fijación (tinción vital)** – preparado fijo de hígado:
 - Reconocer los macrófagos (células de Kupffer) con partículas de tinta china fagocitadas en su citoplasma.



Fotomicrografías de MET

- 1) Reconocer en una fotomicrografía de MET la ultraestructura de los distintos componentes celulares: núcleo (membrana nuclear, heterocromatina, eucromatina, nucléolo), organelas

citoplasmáticas (aparato de Golgi, RER, REL, mitocondrias), ribosomas libres, inclusiones lipídicas, vesículas endocíticas, gránulos de secreción, membrana plasmática, citoesqueleto.

APOYO TEÓRICO

Partes del microscopio óptico

1. ÓPTICA

- **Objetivos:** sistema de lentes biconvexas que proporciona una imagen real, aumentada e invertida del preparado. Pueden ser secos (si sólo hay interpuesto aire entre éste y el preparado) o de inmersión (si hay otro medio distinto al aire por ejemplo aceite), su aumento puede ser de 4 o 5 X, 10X, 40X y 100X.
- **Oculares:** están ubicados en el extremo superior del microscopio y proporcionan una imagen virtual, aumentada y derecha del preparado. Su aumento suele ser de 10X.
- **Sistema de iluminación:** los microscopios más antiguos (monoculares) presentan un espejo que es necesario moverlo para hacer incidir la luz de la lámpara de luz de la mesada de trabajo con el fin de poder iluminar la totalidad del campo. En los más modernos (binoculares) la fuente luminosa está incorporada a la base del mismo.
 - a) **Condensador:** enfoca la luz sobre el preparado proporcionando un cono de luz.
 - b) **Diafragma:** limita el haz de luz, eliminando los rayos más desviados.
 - c) **Filtros:** seleccionan las longitudes de onda de los rayos que van a incidir sobre el preparado.

2. MECÁNICA

- **Pie**
- **Columna**
- **Platina**
- **Tubo**
- **Revólver**
- **Tornillo macrométrico**
- **Tornillo micrométrico**

INDICACIONES PARA EL CORRECTO USO DEL MICROSCOPIO ÓPTICO

Iluminación: en los microscopios monoculares colocar el espejo tal que ilumine TODO el campo del preparado. La cara plana se emplea cuando la fuente luminosa es concreta (lámpara) mientras que la cara cóncava se utiliza cuando se emplea luz difusa. En los microscopios binoculares bastará con encender la luz y regular la intensidad de la iluminación. Luego usar el condensador y el diafragma para lograr una correcta incidencia y cantidad de luz.

Enfoque:

- a) Colocar el preparado en la platina con el **cubreobjetos hacia arriba** (*si seco fuerte (40X) no logrará enfocar adecuadamente*).
- b) Para orientarse en el preparado utilice el objetivo de menor aumento que Ud. disponga. Acerque el objetivo hasta que esté casi en contacto con el preparado, esto se realiza mirando desde **AFUERA Y NO POR LOS OCULARES**.

- c) Una vez realizado el paso (b) observe por los oculares y comience a subir lentamente con el **tornillo macrométrico** hasta que aparezca la imagen. Para lograr un mejor foco mueva el tornillo micrométrico.
- d) Luego de recorrer todo el preparado, cambie el objetivo a seco fuerte desde el revólver y **NO DESDE LOS OBJETIVOS** ya que se pueden desatornillar y perder luego el foco normal.
- e) Terminada la observación, ubicar nuevamente el objetivo de menor aumento, elevar el tubo y retirar el preparado. **NUNCA** retirar el preparado en seco fuerte (40X) porque podría romper el vidrio de la preparación.

CONSIDERACIONES IMPORTANTES

- Con el objetivo de campo, panorámico (4X o 5X) y con el objetivo seco débil (10X) usar el tornillo MACROMÉTRICO, luego de haber logrado un enfoque aceptable puede utilizar el MICROMÉTRICO para realizar el enfoque “fino” solamente.
- Con el objetivo seco fuerte (40X) use solamente el tornillo MICROMÉTRICO.
- Ajuste la silla a una posición cómoda de observación.
- No apoye los dedos o cara sobre los oculares, ya que se engrasan y no permite luego la correcta observación. De hacerlo o encontrarlo sucio, limpiarlo con una carilina.

TÉCNICA HISTOLÓGICA DE RUTINA (HEMATOXILINA Y EOSINA – H&E)

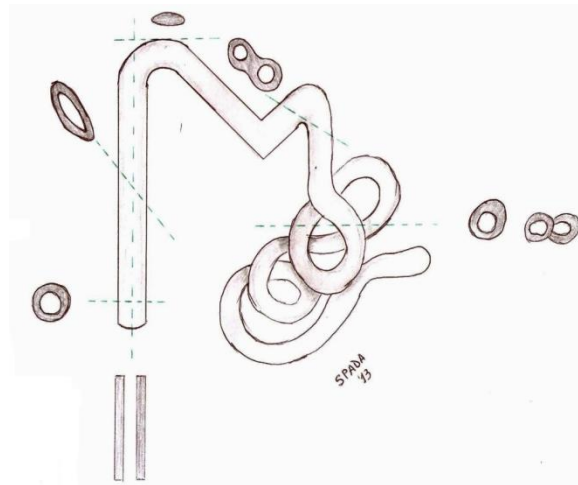
Son los pasos a seguir en el procesamiento de la muestra que permiten observar las características histológicas de la misma.

- 1) Obtención de la muestra: puede tener distintos orígenes:
 - a) biopsias
 - b) autopsias
 - c) raspajes
 - d) extendidos
- 2) Fijación: Paso fundamental en la técnica que tiene por objetivo preservar la estructura y ultraestructura de los componentes tisulares de la muestra, evitando la autólisis del tejido. Los fijadores pueden ser físicos o químicos y dentro de éstos últimos podemos clasificar fijadores simples y mezclas fijadoras. El más usado es el formol al 10% (formaldehído al 4%) como fijador simple y el líquido de Bouin como mezcla fijadora. En estos casos como la muestra se sumerge en el fijador se habla de fijación por inmersión. Cuando la fijación se realiza por perfusión, ésta precede a la obtención de la muestra que luego recibe una fijación de inmersión de refuerzo.
- 3) Deshidratación: Es la completa eliminación del agua del tejido para luego poder embeberlos en medios de inclusión no hidrosolubles. Se pasa la muestra por concentraciones crecientes de alcohol (50%, 70%, 80%, 95% y 100%) para eliminar lentamente el agua y evitar la retracción del tejido.
- 4) Aclaración: Es la sustitución del deshidratante elegido por una sustancia miscible con el medio de inclusión. El aclarante o líquido intermediario más utilizado es el xilol.

- 5) Inclusión: Tiene como objeto endurecer la muestra para permitir su corte posterior. El medio de inclusión más usado en MO es la parafina. Para muestras destinadas a microscopía electrónica se utilizan resinas epoxi.
- 6) Corte: Se realiza con instrumentos especiales llamados micrótomos. Éstos varían si el corte es para microscopía óptica (secciones de micrómetros, μm , de espesor) o electrónica (secciones de nanómetros, nm, de espesor). El corte se coloca sobre un portaobjetos de vidrio (este paso suele denominarse montaje inicial)
- 7) Desparafrinar: pasar la muestra por xilol para retirar la parafina.
- 8) Rehidratación: debido a que los colorantes son hidrosolubles. Se pasa la muestra por concentraciones decrecientes de alcohol (100%, 95%, 80%, 70%, 50%) y luego por agua.
- 9) Coloración: primero se colorea con hematoxilina y luego con eosina.
- 10) Montaje final: se cubre la muestra ya coloreada con un cubreobjetos de vidrio y se utiliza un medio de montaje (por ej: bálsamo de Canadá sintético)

EJERCICIOS

a. Interprete la incidencia de los diferentes cortes en la siguiente estructura



- b. Defina los conceptos de poder de resolución, límite de resolución y aumento.
- c. Señale en qué fotografía de un preparado histológico se pueden apreciar más detalles: LR (límite de resolución), A (aumento)
 - a. LR: $0,4 \mu\text{m}$, A: 1000
 - b. LR: $0,3 \mu\text{m}$, A: 1000
 - c. LR: $0,4 \mu\text{m}$, A: 1500
 - d. LR: $0,8 \mu\text{m}$, A: 2000

d. Señale con qué filtro se obtiene mayor resolución de imagen en un MO: rojo, azul o amarillo. Justifique su respuesta.

e. Mencione los pasos de la técnica de rutina y explique brevemente el fundamento de cada uno de éstos. Realice un cuadro comparativo sobre el procesamiento de una muestra para MO y MET.

f. Explique el fundamento de la técnica de H&E. Defina los conceptos de acidofilia y basofilia.

g. Mencione con qué técnica histoquímica identificaría cada uno de los siguientes componentes tisulares. Mencione y justifique si en alguno de estos casos debe realizarse algún cambio específico en los pasos de la técnica histológica:

- Triglicéridos de un adipocito,
- Glicoproteínas de secreción de una célula mucosa,
- Peroxidasa de los peroxisomas de un macrófago,
- ADN de células que proliferan en cultivo,
- Molécula de colágeno de la matriz extracelular.

h. Complete el siguiente cuadro:

Tinción	Fundamento de la técnica	Utilidad
H&E		
Tricrómico de Mallory		
PAS		
Sudán		
Inmunohistoquímica		
Tinción vital		
Técnica de actividad enzimática		

i. Complete el siguiente cuadro:

Características	MO	MET
Radiación empleada		
Fuente de radiación		
Longitud de onda		
Medio presente en el tubo		
Lentes		
Tipo de imagen		
Límite de resolución		
Aumento		
Tamaño del campo observado		
Profundidad de foco		
Nivel de información morfológica obtenida		
Fijador empleado		
Sustancia de inclusión empleada		
Espesor del corte		
Instrumento de corte empleado		
Obtención de contraste (colorantes empleados)		
Ventajas		
Desventajas		