

**GUIA DE TRABAJOS PRACTICOS  
HISTOLOGIA Y EMBRIOLOGIA**

**UNCuyo**

**Nº 1.Año 2009**



***Walther David Zavala***

Esta guía de Trabajos Prácticos ha sido elaborada especialmente para alumnos del primer año, con la finalidad de complementar las clases teóricas y el estudio de los textos de Histología recomendados y aumentar de esa manera, la **apropiación de los contenidos** de la materia. Los docentes más experimentados de nuestra Cátedra llevan casi veinte años en la docencia por ello probablemente el mejor plan de estudios que te podemos aconsejar es:

1. Seguir atentamente las **clases de cada tema**
2. Leer los **libros de textos** aconsejados
3. Realizar tus **propios apuntes** y esquemas
4. **Escuchar** atentamente los detalles que te aporta en cada práctico tu **docente a cargo**, y aprovechar esa instancia para responder a tus dudas.
5. Dedicar el **tiempo suficiente** a estudiar cada tema, todas las semanas

Esta es la “receta mágica” que deberás seguir paso a paso, sin saltarte ninguno, como una receta de chef que mezcla los ingredientes con cuidado y deja el pastel en el horno el tiempo suficiente para que no salga crudo.

Nuestra materia abrirá tu mente hacia el fascinante mundo de la célula. Aprenderás como se cumple el misterio de la vida desde la concepción hasta la formación completa de las estructuras del nuevo ser viviente y, sin darte cuenta, ingresarás en increíble mundo de los tejidos orales.

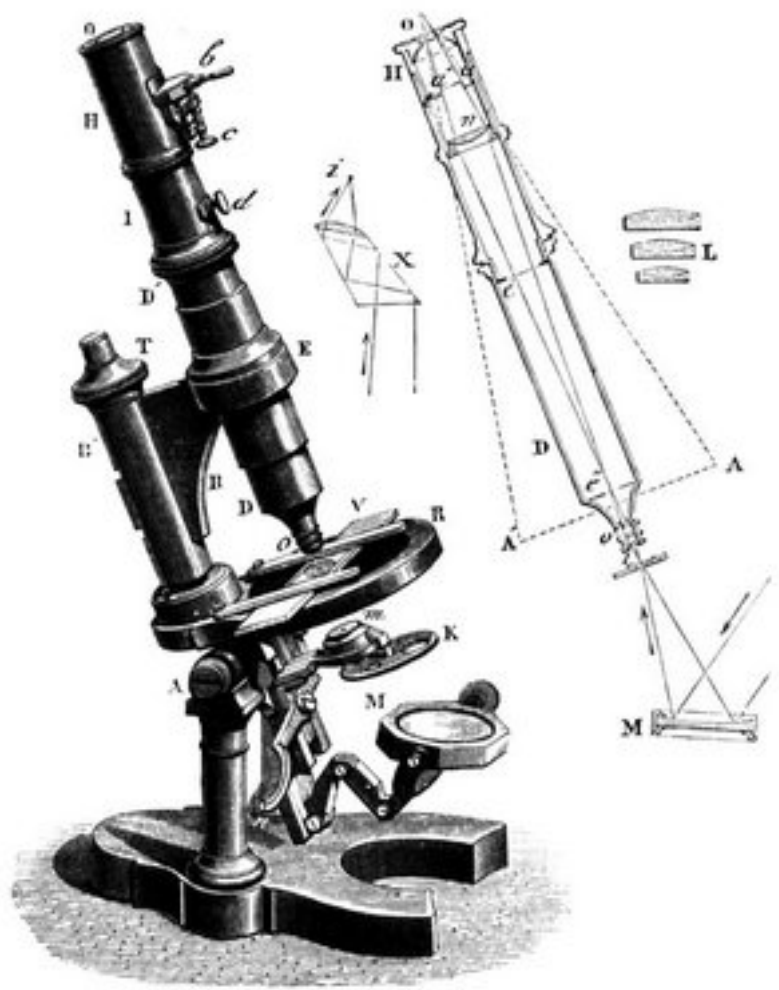
Solo si tienes el deseo y el interés natural del que ama la biología y la naturaleza, estarás listo para introducirte al mundo microscópico.

Mucha suerte.

**Dr. Walter Zavala.**

**Profesor Titular Cátedra Histología.**

**Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina**



# PRACTICA 1a

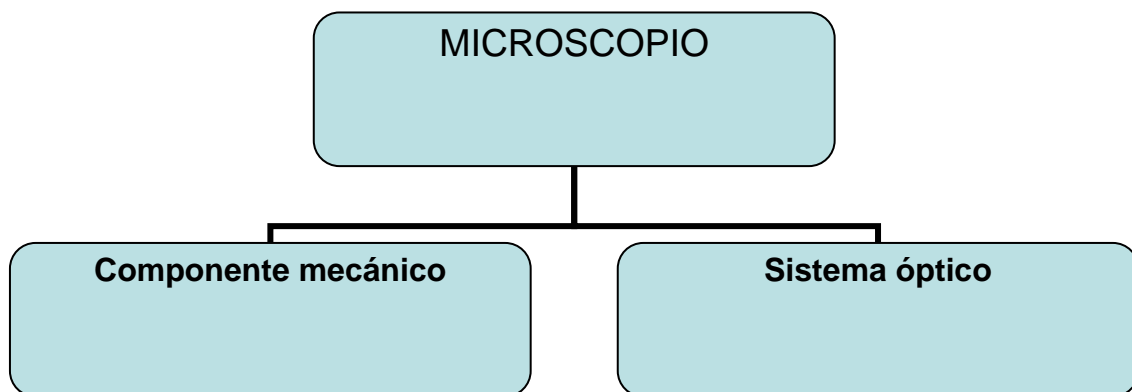
## MICROSCOPIA ÓPTICA: FUNDAMENTOS Y UTILIZACIÓN DEL MICROSCOPIO ÓPTICO.

### INTRODUCCIÓN

El objetivo de la primera práctica de la asignatura de Histología consiste en la adquisición de destreza en el uso del microscopio óptico como herramienta básica y fundamental para el estudio celular e histológico de las diferentes estructuras del cuerpo humano. Es importante, también, conocer las unidades de medidas utilizadas en microscopía, como el micrón ( $\mu\text{m}$ ) o el nanómetro (nm) y , especialmente, los fundamentos de la tinción o coloración con la que verán los preparados.

#### I Componentes y manipulación del microscopio óptico

El microscopio óptico es un complejo instrumento de precisión, de uso frecuente en los laboratorios biológicos. Este tipo de microscopio consta de dos partes fundamentales:



**Componente  
Mecánico**

**Sistema  
Óptico**



**Figura 1 El microscopio óptico y sus partes**

| <b>COMPONENTES DEL MICROSCOPIO OPTICO</b>   |  |
|---|--|
| <b>COMPONENTE MECANICO</b>  | <b>SISTEMA OPTICO</b>  |
| <p><b>TORNILLO MACROMÉTRICO:</b> dispositivo que modifica la distancia existente entre la platina y el objetivo permitiendo proceder al enfoque. Se utiliza para el enfoque inicial o de aproximación.</p> <p><b>TORNILLO MICROMÉTRICO:</b> dispositivo que, al igual que en el caso anterior, modifica la distancia existente entre la platina y el objetivo. En este caso, sirve para afinar el enfoque obtenido con el tornillo macrométrico, sobretodo cuando se trabaja a grandes aumentos (40x y lente de inmersión)</p> <p><b>PLATINA:</b> es una ménsula normalmente cuadrada sobre la cual se coloca la preparación. La platina está perforada en el centro para permitir el paso de la luz a su través y que ésta incida sobre la muestra. Posee unas pinzas o trabas que sirven para fijar la preparación sobre la platina, y dos tornillos pequeños para mover la muestra en sentido lateral y anteroposterior.</p> <p><b>ESTRUCTURAS DE SOPORTE:</b> son la base y la columna que sostienen todos los dispositivos del microscopio</p> | <p><b>OCULAR:</b> capta y amplifica en mayor la imagen de la lente objetivo. Amplifica la imagen procedente por el objetivo por un factor de 10. No aumenta el poder de resolución. Puede ser uno solo (monocular) o dos (binocular).</p> <p><b>OBJETIVO:</b> amplifican y aumentan el detalle de los objetos visibles en la imagen. De las lentes objetivo depende tanto el grado de amplificación de la imagen como el poder de resolución. Normalmente se puede elegir entre varios objetivos de distintos aumentos localizados en una sola torreta o revolver. El mas pequeño (4x) es la <b>lente de campo</b>, los <b>objetivos intermedios</b> de 10X, a 40X, y por último la <b>lente de inmersión</b> de 100X, la cual requieren aceites para su correcto funcionamiento (sólo será utilizada para ver sangre)</p> <p><b>CONDENSADOR:</b> Tiene como finalidad la de concentrar la luz sobre el preparado</p> <p><b>FUENTE LUMINOSA:</b> Se encuentra situado en la parte inferior del microscopio y como su nombre indica es el dispositivo que aporta luz al microscopio</p> |

## II. ¿Cómo funciona el microscopio óptico.

### **Aumento proporcionado por un microscopio**

Dado que el objetivo da lugar a una imagen real aumentada que es nuevamente aumentada por el ocular, el aumento total del microscopio compuesto será el producto del aumento proporcionado por el objetivo y el proporcionado por el del ocular. Los constructores de microscopios graban el aumento del objetivo y ocular sobre la propia montura de los mismos para su mejor utilización.

Ejemplo —Objetivo x40 con un ocular x10 dará un aumento de x400.

### **Poder de resolución de un microscopio**

Si bien es importante conocer el aumento del microscopio con el que se trabaja, no lo es tanto como saber el poder resolutivo del mismo.

El poder resolutivo se refiere a la capacidad máxima para ver separados dos puntos situados muy juntos. El poder resolutivo del ojo humano es de 0,2 mm., esto quiere decir que a simple vista somos capaces de distinguir como independientes dos puntos separados 0,2 mm entre sí, en tanto que si están más próximos los veremos como un solo punto.

Un microscopio óptico puede tener un poder de resolución de **0,2  $\mu$ m.**

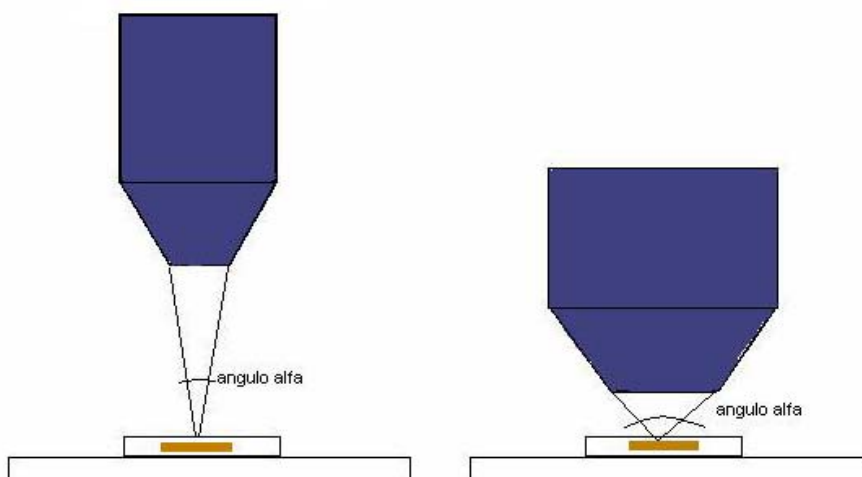
Si has visto una foto en la computadora grabada con formato de baja resolución: ¿Qué ocurre cuando la amplias?, se ve toda borrosa o pixelada; pero si la foto es guardada con otro formato de mayor calidad, al ampliar la foto mantiene la calidad de los detalles, o sea mantiene la resolución. Con el microscopio ocurre lo mismo, la resolución no depende del aumento sino de otros factores. La resolución, depende de la **longitud de onda de la luz** empleada y de la **apertura numérica** del objetivo (AN)

La AN está en relación con la calidad del objetivo. Los objetivos de mejor calidad poseen mayor apertura numérica. Normalmente la AN está indicada como un número grabado en el costado de la lente objetivo. Este número que se obtiene por una fórmula

$$AN = n \sin \alpha$$

En esta fórmula  $n$  es igual al índice de refracción del medio que se encuentra entre el objetivo y la preparación. Normalmente este medio es aire ( $n=1$ ) o aceite de inmersión ( $n=1,4$ ). Cuando vemos una muestra de sangre colocamos una gota de aceite de inmersión entre el preparado y el lente objetivo, esto permite aumentar la resolución y ver mejor los detalles de las células sanguíneas.

El otro elemento "seno del ángulo  $\alpha$ ": el ángulo  $\alpha$ , es el ángulo que se forma al acercar el objetivo al preparado. Mientras más podamos acercar el lente, mayor es el ángulo que se forma y por lo tanto mayor la resolución.



### III.- Usando el microscopio: ¿Como hago para hacer foco?

1º Retirar la funda y encender la fuente de luz

2º.- La platina debe colocarse en la posición más baja, lo más distante posible del objetivo. En esta posición se coloca el preparado en la platina.

3º.- Una vez colocado el preparado sobre la platina con la muestra en el centro, utilizando el revólver y sin tocar el objetivo se elige el objetivo de menor aumento, que es el lente de campo (4x).

4º.- Si el microscopio es binocular, se debe regular la distancia de las lentes oculares ajustándola a nuestros ojos.

5º.- Asegúrese de que la muestra coloreada está en el centro del campo, con los tornillos de desplazamiento horizontal y anteroposterior de la platina

6º.- Seguidamente procede al **enfoque**. El enfoque de la imagen se efectúa con los tornillos estriados (macro y micrométrico). El tornillo de enfoque grueso o macrométrico (el más grande), produce movimientos de la platina en incrementos mayores que el tornillo de enfoque fino o micrométrico. Para realizar el enfoque se procede de la siguiente forma:

Desplazar la platina con el tornillo macrométrico, mirándola desde fuera, hasta que esté cerca del objetivo. Mirando por los oculares, se empieza a mover muy lentamente el macrométrico hasta que se percibe la imagen borrosa. A partir de entonces, será el micrométrico el que se usará para apreciar los detalles de la preparación .

7º Cuando se cambia a un aumento mayor, repetir el paso 6º. Cuando llegue al aumento de **40x** es muy importante que **solo utilice el tornillo micrométrico**, de lo contrario podrá romper el preparado.

8º.- Terminado el examen de la muestra se baja la platina, se coloca el lente de campo y se retira la preparación. A continuación se desconecta de la fuente eléctrica y se cubre el microscopio con la funda protectora.

*En caso del uso del objetivo de inmersión (para ver muestras de sangre), se coloca previamente una gota de aceite de cedro (aceite de inmersión) sobre la preparación, desplazando la platina hasta que el objetivo se sumerge en el aceite. Este procedimiento lo realizará, exclusivamente, el docente a cargo.*

### IV.- Limpieza y conservación del microscopio.

1º.- Para la limpieza de los oculares y el condensador se debe usar papel para lentes (obtenerlo en casas de fotografías). En caso de que estas lentes se hubieran manchado con algún reactivo se usará el paño mojado con agua destilada y luego se secará totalmente. Para limpiar la platina se usará un trapo seco o poco mojado en agua destilada. En caso de que la mancha sea de aceite, hay que utilizar un poco de xilol.

2º.- Si se ha usado el objetivo de inmersión, se debe limpiar cuidadosamente el objetivo para retirar el aceite que lo impregna. Para ello se debe usar un paño fino mojado en xilol o etanol. A continuación, teniendo la debida precaución, se debe secar el objetivo, ya que el exceso de xilol disuelve los pegamentos entre las lentes y su montura.

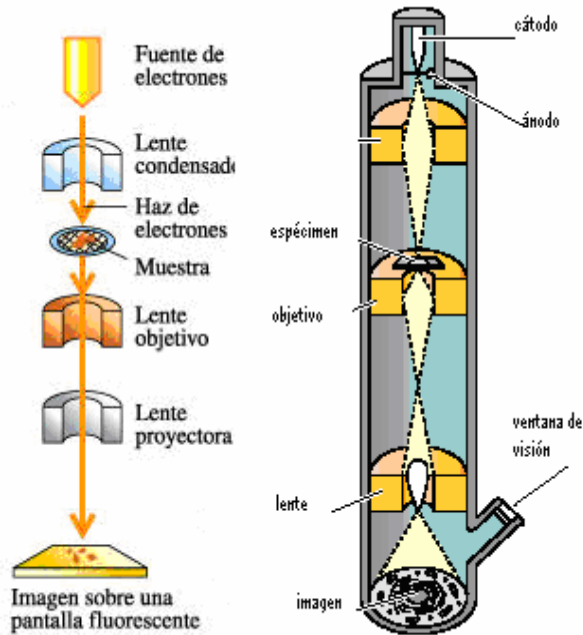
3º-**Nunca se debe mover el cabezal del ocular, ni el microscopio de forma brusca durante su uso ni después de haberlo usado pues, la bombilla caliente se funde con facilidad.**



## V-OTROS TIPOS DE MICROSCOPIOS

### Microscopio Electrónico

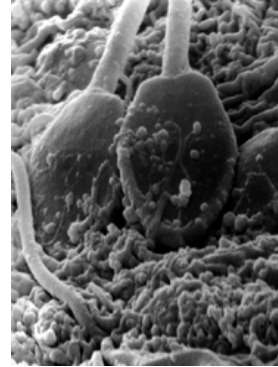
Se basa en una corriente de electrones, generados por un filamento, que atraviesan el espécimen y forman una imagen en la pantalla



Mitocondria observada con ME

### Microscopio de Barrido

Permite observar una imagen tridimensional



Espermatozoides ingresando al ovulo  
(Imagen Dr. De Rosas J.)

La muestra no se corta, sino que se cubre de una película metálica sobre la que chocan los electrones. La corriente de electrones no atraviesa la muestra, como en el ME, sino que choca o barre la superficie del preparado para formar la imagen.


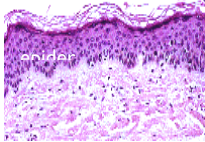
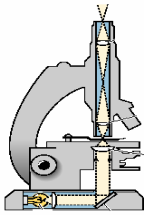
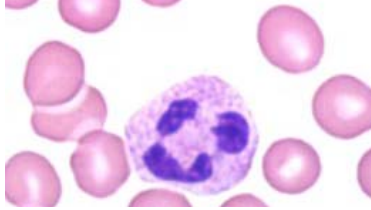
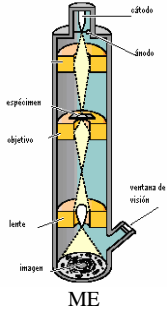
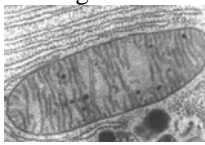
### Microscopio de contraste de fase (MCF)

Permite observar células vivas



Ameba en MCF

## VI-Magnitudes en Microscopia

|   | RESOLUCION | SE PUEDE OBSERVAR   |
|---|------------|---|
|  <p>Ojo humano</p> | 0,2 mm     | <p>Tejidos</p>      |
|  <p>MO</p>        | 0,2 μm     | <p>Células</p>     |
|  <p>ME</p>       | 0,2 nm     | <p>organelas</p>  |
| $1\text{mm} = 10^3 \mu\text{m} = 10^6 \text{nm} = 10^7 \text{A}^0$                                  |            |   |

## **PRÁCTICA 1 b.**

### **TECNICAS HISTOLOGICAS PROCESADO DE LA MUESTRA BIOLÓGICA PARA SU OBSERVACIÓN.**

#### **Resumen**

**P**ara que las muestras de los diferentes tejidos puedan ser observadas al microscopio, son necesarios una serie de pasos que se inicia con la toma de la muestra, que consiste en la extracción de un trozo de tejido u órgano desde un ser humano o un animal, el cual puede estar vivo (**biopsia**) o muerto (**necropsia**).

Para que el tejido se conserve lo mas parecido posible al que tiene en su estado original, se lo coloca, en forma inmediata, en un liquido denominado fijador, cuya finalidad principal es la de preservar el tejido evitando que se inicie su autodestrucción o autolisis, Posteriormente las muestras son deshidratadas en alcohol e incluidas en parafina derretida, que al enfriarse forma un bloque sólido, lo cual permite cortar el material en fetas muy delgadas con un instrumento denominado micrótomo. Una vez cortadas, se elimina la parafina de las muestras disolviéndola con alcohol, de esa manera queda lista para su coloración. Las muestras son introducidas en un recipiente con el colorante adecuado y después de uno minutos se retira el exceso de colorante y se las cubre con un vidrio delgado o cubreobjeto para que puedan observarse al microscopio.

#### **Procedimientos para la preparación de la muestra.**

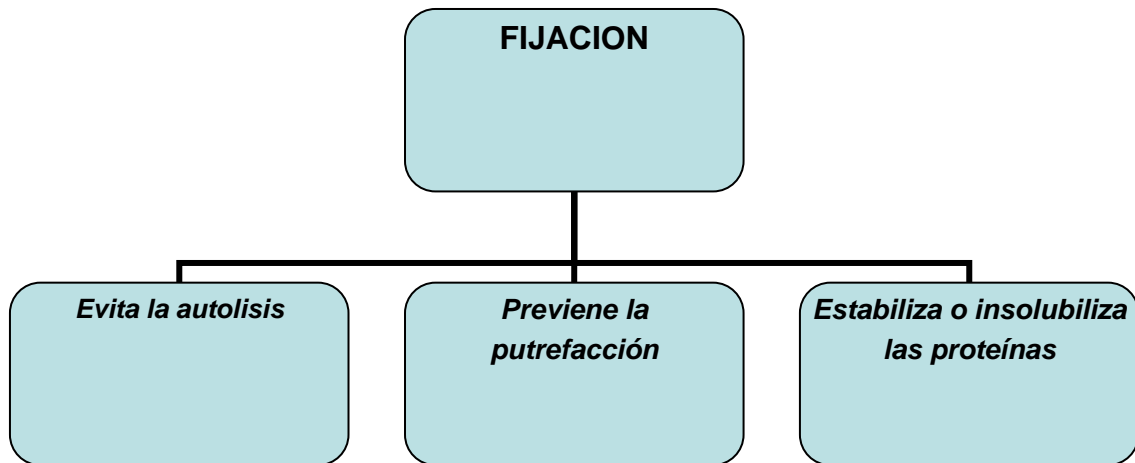
La muestra biológica no puede ser procesada directamente tal y como se obtiene del espécimen para ser observada al microscopio óptico. La muestra debe ser procesada de forma tal que mantenga condiciones lo más cercanas posible a las naturales y luego coloreadas para facilitar su observación.

##### **1. Toma de la muestra.**

Una condición básica en el estudio de muestras biológicas es la preservación de ésta durante todo el proceso. Es por ello que la obtención de la muestra debe ser lo más rápida posible a fin de evitar los inevitables procesos de degradación subsiguientes a la muerte del animal. Una vez que el espécimen ha muerto, en el caso de un animal, o ha sido extraído solo una porción de tejido u órgano, en el caso de una biopsia, comienzan a producirse procesos de autolisis y putrefacción que conducen a la destrucción de estructuras tisulares que impedirían o complicarían en demasía el estudio de la muestra. La autolisis sobreviene por la liberación de las enzimas lisosomales y su acción sobre los componentes celulares, dicha autolisis comienza prácticamente en el momento de la muerte del animal. La putrefacción es un proceso más tardío y se produce por la acción de bacterias que van a utilizar los tejidos muertos como alimento. Para evitar estos dos procesos, la recolección de la muestra y la fijación deben producirse lo antes posible.

##### **2. Fijación.**

La fijación consiste en el tratamiento de la muestra con agentes que retardan o evitan la aparición de alteraciones en ésta tras la muerte del organismo. Este procedimiento trata, por tanto, de evitar los procesos de autolisis y de putrefacción.



Los agentes fijadores pueden ser tanto físicos como químicos. La congelación y el calor son métodos físicos. Mientras que entre los químicos encontramos una gran variedad de productos que actúan desnaturalizando o precipitando las proteínas del tejido con lo que se evita la autólisis y en algunos casos la putrefacción por su efecto antibacteriano. No obstante, no existe un método universal de fijación y no todos los fijadores conservan el tejido indefinidamente.

Agentes físicos.

La congelación es la base de la fijación mediante agentes físicos. Es ideal para aquellos procedimientos que necesiten de la conservación intacta de la estructura antigénica y del contenido enzimático (histoquímica e inmunohistoquímica).

Agentes químicos

Existen numerosos agentes químicos (formol, acetona, etc).

*El fijador químico más utilizado es el formol al 10 % para las muestras que van a ser observadas con el microscopio óptico, y el glutaraldehído para las muestras que van a ser observadas con el microscopio electrónico*

En general cada uno tiene ventajas y desventajas, por ello para potenciar las ventajas de cada uno se prefiere utilizar mezclas de fijadores que generalmente tienen nombre propio (ej. Fijador de Bouin, que mezcla ácido pícrico, ácido acético y formol)

### **3-Deshidratación**

Después de varias horas de fijación, las muestras de tejidos son sumergidas en alcohol para eliminar el agua de los tejidos y facilitar la penetración del medio de inclusión.

### **4-Inclusión.**

Las muestras deben ser procesadas hasta obtener láminas delgadas de unas pocas micras de espesor. Estas láminas no pueden ser cortadas sin un endurecimiento previo de la muestra para que adquiera la consistencia adecuada.

Una vez deshidratado se introduce el tejido en parafina derretida que luego se deja enfriar para que forme un bloque sólido, el cual puede ser cortado en finas rodajas.

## 5-Corte

Una vez obtenido el bloque se procede al corte de la muestra

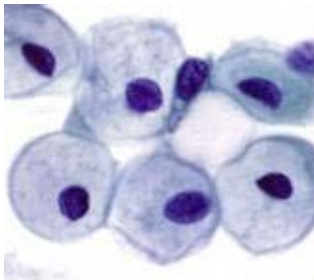
Los cortes para el MO se realizan en el micrótomo. El micrótomo es un aparato que permite la obtención de secciones tisulares de un espesor micrométrico por lo que son lo suficientemente delgadas para su posterior observación.. La microscopía óptica utiliza espesores de entre 5 y 10 micras.

## 6-Tinción

Ahora tenemos las secciones finas de 5 a 10 micras, pero antes de colorearlas se les retira la parafina sumergiéndolas nuevamente en alcohol (que disuelve la parafina) y se rehidrata sumergiendo las muestras en agua. Para colorear el tejido se suelen utilizar uno, dos o mas colorantes. Para un estudio general de los tejidos es esencial diferenciar entre colorantes básicos, ácidos.

**Colorantes ácidos:** Son sustancias ácidas como la **eosina** que tiñe estructuras básicas contenidas generalmente en el **citoplasma de la célula**. Los componentes de la célula que se tiñen con los colorantes ácidos se denominan acidófilos. Son ejemplos de componentes **acidófilos**, las estructuras membranosas del citoplasma como el REL o las mitocondrias.

**Colorantes básicos:** Son bases como la **hematoxilina** que es un colorante que tiñe estructuras ácidas como el **ADN** del núcleo celular o el **RER** en el citoplasma.

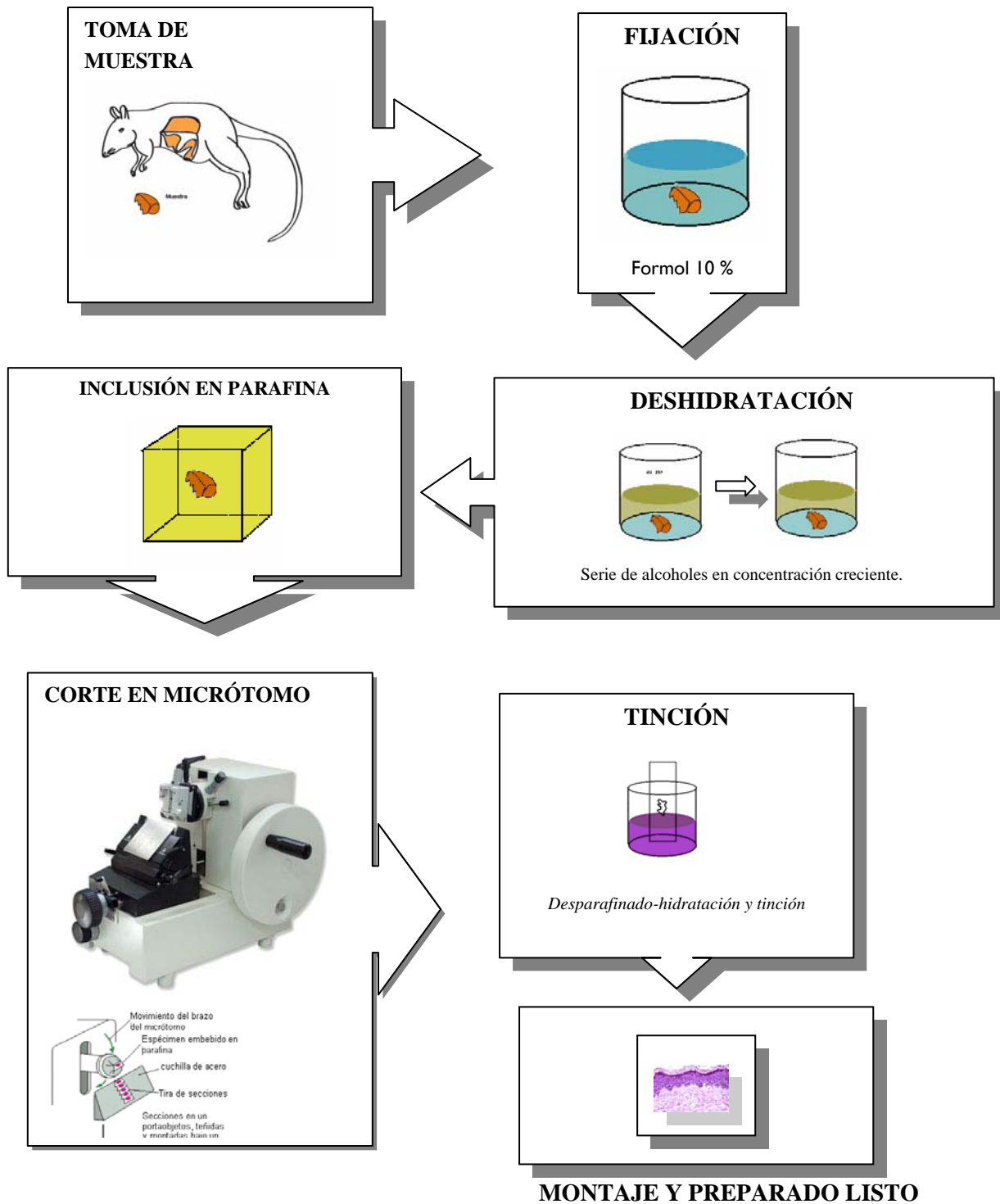


Núcleo y citoplasma basófilos

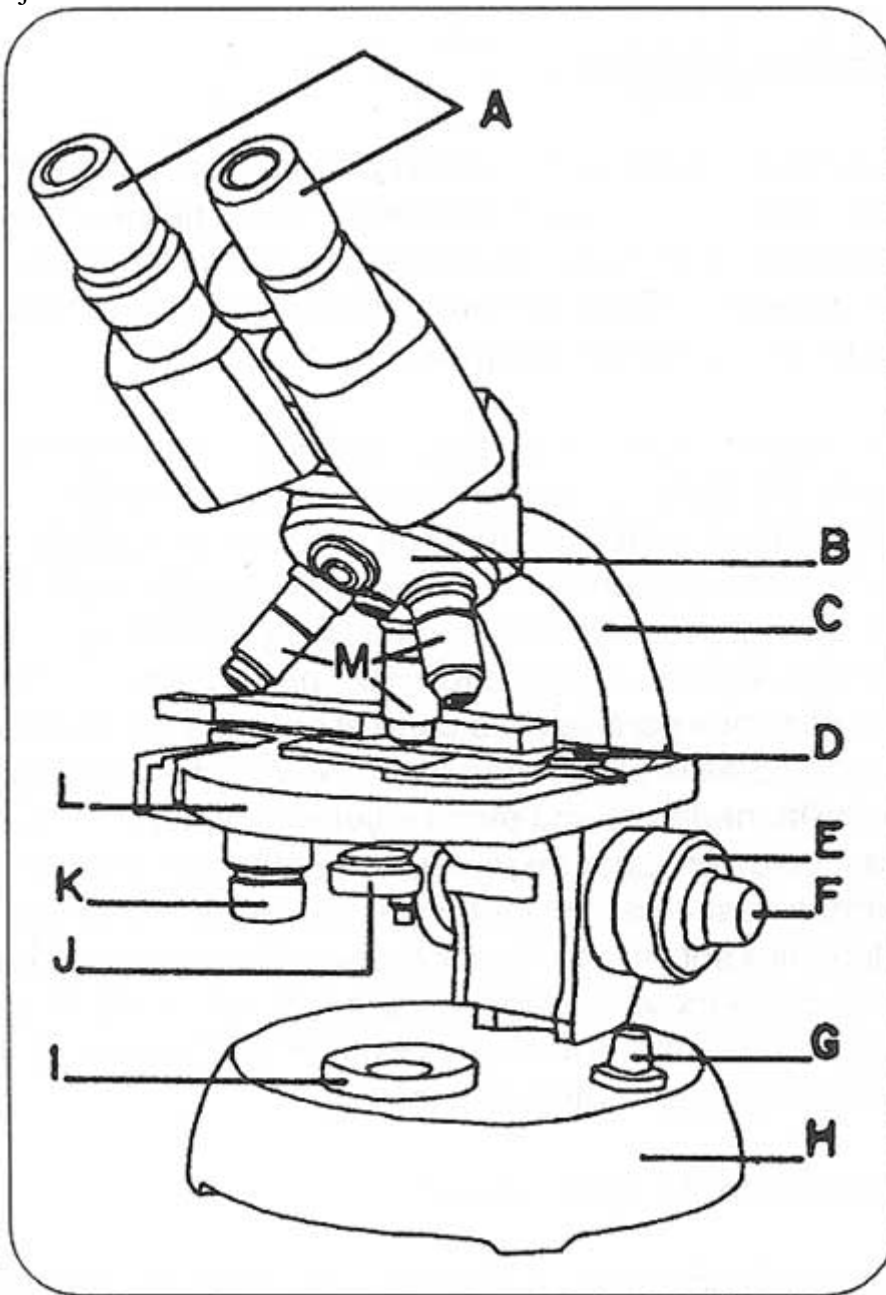


Núcleo basófilo y citoplasma acidófilo. Los glóbulos rojos carecen de núcleo y el citoplasma es intensamente acidófilo

# TÉCNICAS HISTOLÓGICAS: OBTENCIÓN DE UN PREPARADO



Ejercicio



Identifique los componentes del microscopio

## **BIBLIOGRAFIA:**

- 1-Histología Sobotta, Welsch, Editorial Panamericana, 2ª edición, 2009
- 2-Histología Geneser Editorial Panamericana, 3ª edición, año 2000
- 3-Histología y Embriología del ser humano Eynard, Valentich, Rovasio, Editorial Panamericana, 4ª edición, año 2008.
- 4- Histología Básica, Junqueira, Carneiro. Editorial Masson, 6ª edición, año 2006.
- 5- Cuaderno Practicas de Biología, 2006, Lopez Lunch G, Universidad Pablo Olavide, Sevilla, año 2006
- 6-Texto Atlas de Histología. Gartner y Hiatt,Ed. Mc Graw Hill, 2a edición, 2002.