

# Histología, cómo hacer posible la observación con el microscopio

Texto y fotos



Manuela  
Gallardo



Montaña  
Monsalve



Cabeza de trucha, *Salmo trutta*, que muestra resultado de la aplicación del protocolo de doble coloración del esqueleto. / Servicio de fotografía del MNCN.

Detrás de toda investigación hay muchos procesos técnicos que hacen posible la observación y el estudio. Preparar las muestras para el microscopio es una de las principales funciones del laboratorio de histología del MNCN

### Qué es la histología

La histología es la ciencia que estudia los tejidos orgánicos. Los animales y las plantas están compuestos por tejidos, que a su vez, están formados por otras estructuras más pequeñas; las células. Estas últimas forman una trama conjunta de distribución muy variada en formas y tamaños. Las diferentes agrupaciones de células son las que dan lugar a nuestros órganos, nuestra piel, nuestros huesos y hacen posible el funcionamiento general de nuestro organismo.

Para poder estudiar los tejidos y las células hay un instrumento imprescindible: el **microscopio**. Estamos hablando del aparato óptico que más ha contribuido al progreso de la investigación científica, producto de una serie ininterrumpida de ensayos y un perfeccionamiento continuo. Los modelos de microscopio se pueden clasificar en dos grandes grupos: El microscopio óptico que trabaja con luz visible al ojo humano y el electrónico que desarrolla su tarea mediante un haz de electrones que o atraviesan la muestra (microscopio electrónico de transmisión) o bien se

reflejan en su superficie (microscopio electrónico de barrido), proporcionando imágenes de su estructura interna o de su aspecto externo respectivamente.

*“A lo largo de la historia de la histología se ha ensayado en diferentes tejidos biológicos con colorantes que han permitido el estudio detallado de su morfología”*

en la que se sigue la receta de un guiso.

El tejido que se quiere estudiar será cortado en láminas muy finas y se colocarán entre dos cristales llamados porta y cubre objetos respectivamente. Tras esta meticulosa rutina, la muestra se trasladará al microscopio óptico, para su examen detallado. En algunas ocasiones solo se necesita una lámina de tejido, en otras se corta la

### El trabajo previo

En el laboratorio de histología del MNCN nos encargamos de preparar los tejidos animales para poder examinarlos en el microscopio óptico. Para lograrlo sometemos a los tejidos a una serie de procesos químicos y físicos con los que pretendemos hacerlos lo suficientemente finos como para que sean translúcidos y, por lo tanto, observables en el microscopio. El proceso se asemeja a la preparación de una comida



Vista de la sala central del laboratorio de Histología.

muestra completa para tener imágenes de todas sus secciones y, como si de una resonancia magnética se tratara, poder visualizar su estructura y organización internas.



Primeros tratamientos químicos en la preparación de los tejidos



El corte de estas finas películas de tejido es posible endureciendo la pieza. Unas veces nos valemos de la congelación a  $-22^{\circ}\text{C}$  y otras utilizamos sustancias como resinas y parafinas que, gracias al calor, son capaces de infiltrarse dentro del tejido y endurecerlo. Así, obtenemos un molde que llamamos bloque que cortamos con el micrótopo, un magnífico aparato con el que conseguimos cortar láminas de solo 4 micras. (Una micra es la milésima parte de un milímetro)

Este proceso, que puede parecer rutinario, es en realidad muy diferente en función del tejido que vayamos a tratar y el objetivo que persigamos. Quizá necesitamos hacer el recuento de una determinada célula (ovocitos, espermatozoides, etc.), conocer el número de capas de calcio que se depositan en algunos huesos (dedos, dientes, etc...), la forma y tamaño de alguna es-

tructura interna de un animal minúsculo (tardígrados, ácaros, insectos. Etc.), distinguir parásitos tan pequeños que viven en los glóbulos rojos de la sangre de las aves o la forma y medida de la cutícula de las plantas de las que se alimentan algunos animales.

Como sucede con las comidas, para cada elaboración necesitamos una receta diferente. En histología estas 'recetas' se llaman protocolos e, igual que en gastronomía, existen tratados completos con los protocolos que se han desarrollado hasta la fecha.

#### Desarrollo de los protocolos

El primero de estos protocolos fue publicado por Robert Hooke<sup>1</sup> en el que fue el primer tratado de microscopía óptica *Micrographia*. El Libro incluye observaciones de una gran variedad de

*“La preparación de una muestra es diferente en función del tejido y el objetivo que persigamos. Quizá necesitamos hacer un recuento de un tipo de célula o conocer la forma de la estructura interna de un animal”*

Archivo de porta objetos con todas las secciones de un pequeño invertebrado completo.



Preparación histológica de un tardígrado, *Macrobiotus macrocalix*, que muestra el cuerpo completo del animal y uno de sus huevos. / Noemí Guil

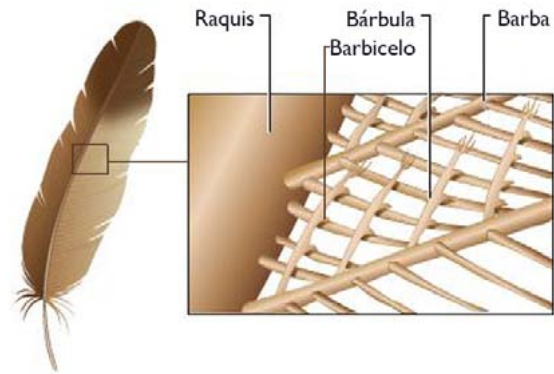


Imágenes captadas al microscopio, mostrando el trabajo final de todo el proceso.

objetos, tejidos, piedras, cristales, vegetales y animales y explicaciones detalladas no sólo de aquello que se observa, sino también de las indicaciones para la preparación óptima de las muestras.

La mayor parte de los protocolos histológicos finalizan dando color a las preparaciones. Con las tinciones, que abren la puerta al uso de una enorme variedad de procedimientos de coloración, se consigue diferenciar partes del tejido o de las células. A lo largo de la historia de la histología se ha ensayado en diferentes tejidos biológicos con colorantes utilizados en la antigüedad como el carmín, hasta llegar a las sofisticadas coloraciones obtenidas a través de procesos de inmunología (sistema que consiste en teñir un anticuerpo específico). Estas tinciones se emplean para identificar distintos ti-

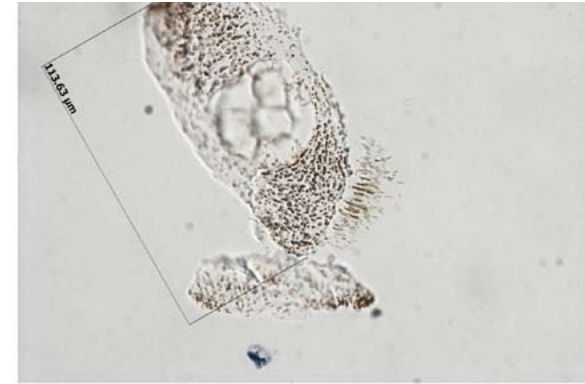
*“En el laboratorio de histología del MNCN hemos ensayado un protocolo para cortar y teñir las plumas de las aves con la misma facilidad que un tejido blando”*



Morfología de las plumas que muestra el raquis, dos barbas, las bárbulas y los barbicelos

pos de cáncer, leucemias, virus, bacterias, etc. o conocer la ubicación exacta de una determinada proteína dentro de un orgánulo celular.

Pero el gran desarrollo de la histología como ciencia vino de la mano del Dr. Paul Ehrlich, que hacia 1880 comenzó a aplicar las anilinas a los tejidos vivos. Las anilinas son compuestos orgánicos que descubrió el Dr. Runge en 1834 y sintetizó por primera vez Perkin en 1853<sup>2</sup>. Las moléculas de anilina se oxidan con facilidad y dan lugar a otras moléculas derivadas similares y muy estables que absorben parte de la luz visible dando distintos colores. Hasta ese momento se había experimentado con la afinidad que presentaban los materiales orgánicos por determinados colorantes, pero su número era escaso, sin embargo la aplicación de

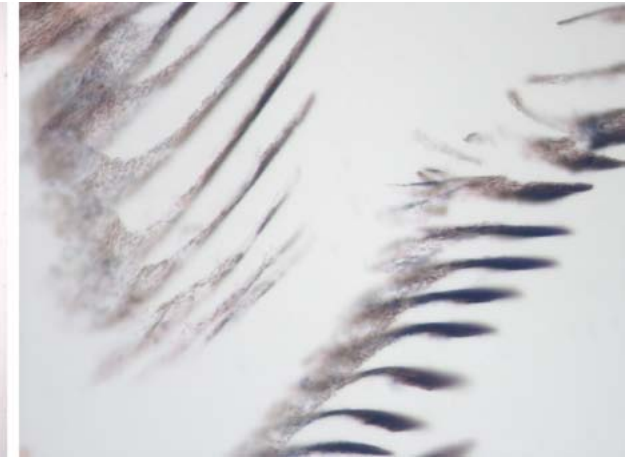
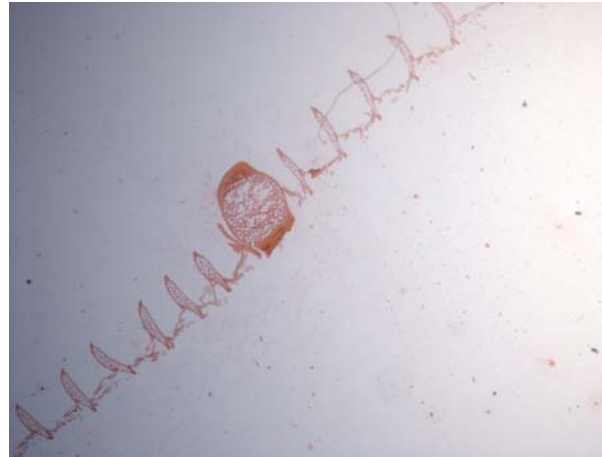
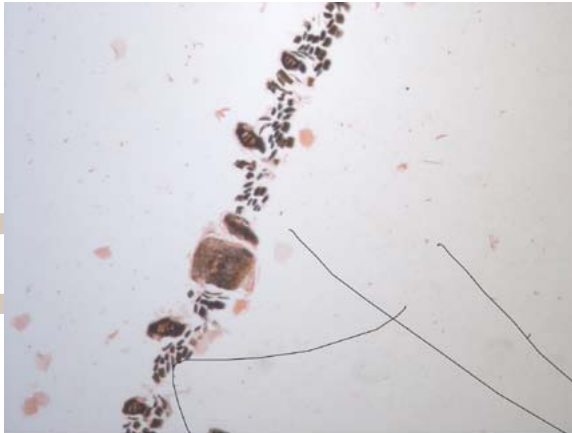


Detalles de una pluma de contorno de un estornino subadulto, *Sturnus unicolor*. Arriba) Corte trasversal del raquis. Abajo) Corte trasversal que muestra el final de una barba 100X.

las distintas anilinas a los tejidos naturales, jugando con variantes de pH en el medio, presencia de sales de cobre, o de hierro, o cloratos alcalinos y su fijación específica a distintas microestructuras permitía el estudio detallado de la morfología de los distintos órganos<sup>3</sup>.

Simultáneamente médicos como Freud, Ramón y Cajal o Golgi emplearon las coloraciones a base

“La posibilidad de estudiar la estructura interna de las plumas facilitará futuros trabajos relacionados con la morfología, patología y paleontología de las aves”



Detalles de una pluma contorno de paloma, *Columba livia*. Izquierda) Corte transversal que expone la estructura del raquis, barbas y bárbulas 10X. Derecha) Corte oblicuo que muestra la disposición tridimensional de bárbulas y barbicelos. 100X.

de sales de plata, oro y hierro, en los tejidos cerebrales. Reactivos que hasta ese momento se utilizaban en las primeras técnicas fotográficas. Sus trabajos hicieron posible la descripción detallada del Sistema Nervioso y las células que lo forman, las neuronas. A finales del siglo XIX se asistía al alumbramiento de una nueva ciencia la **Neurología**.

Hay protocolos de resultados muy vistosos, como la doble coloración de hueso, en la que el animal, un pequeño vertebrado, no se corta en láminas sino que es tratado de forma completa tiñendo su esqueleto. Está técnica ha sido ampliamente utilizada en este laboratorio, de hecho, algunos ejemplos forman parte de las colecciones de nuestro museo.

Detalle de una pluma de contorno de estornino, *Sturnus unicolor*. Arriba) Corte transversal del raquis que muestra la disposición del raquis, barbas y bárbulas 10X. Abajo) Corte transversal de una barba 40X.

Con este protocolo se consigue hacer transparente el músculo y colorear el hueso óseo en rojo y el cartílago en azul. Este procedimiento se usa para averiguar el estado de desarrollo de los individuos en estudios de anatomía, embriología o sistemática<sup>4</sup> y también como material didáctico para mostrar el sistema esquelético. Asimismo, trabajamos en protocolos para detectar patologías y parásitos en la sangre de aves, que nos envían de todas partes del mundo<sup>5</sup>. Otros nos permiten calcular la edad de animales como osos o zorros, tiñendo sus dientes<sup>6</sup> o la de anfibios y reptiles mediante la tinción los pequeños huesos de las patas que hacen visibles las capas de crecimiento<sup>7</sup>.

#### Nuevas aportaciones

Últimamente en este laboratorio hemos ensayado un protocolo para cortar y teñir las plumas de las aves

*“Médicos como Freud, Ramón y Cajal o Golgi emplearon técnicas fotográficas en los tejidos cerebrales haciendo posible la descripción detallada del sistema nervioso y las neuronas”*

con la misma facilidad que cualquier otro tejido. Las plumas no forman parte de los tejidos blandos de un animal sino que su corte ofrece mucha resistencia lo cual dificultaba considerablemente su estudio en el microscopio óptico.

Para desarrollar éste protocolo fue necesario que nos metiéramos en una aventura de meses de prueba ensayo error. Buscamos información en libros, revistas e internet y fuimos probando todos los pasos que diversos autores recomendaban, revisando una y otra vez los procedimientos pero sin obtener el resultado deseado. Un día, en una conversación doméstica, surgió la orientación hacia el enlace covalente (S-S) de la queratina. La queratina es una proteína esquelética, por eso es muy rígida. Su molécula lleva incorporado un gran porcentaje de cistina, que es un aminoácido con un enlace químico fuertemente cohesionado, el enlace disulfuro<sup>3</sup>.

Nos dimos cuenta de que teníamos que intentar neutralizar los enlaces disulfuro, sin destruir el resto de la molécula. Como todo está en los libros, ahora sabíamos qué buscábamos y adaptamos un procedimiento recomendado por Ricardo Martínez<sup>8</sup> a base de yoduro potásico. Finalmente logra-

mos cortar con el micrótopo la dura pluma como si fuera blanda manteca y a continuación mostrar el aspecto tridimensional que ofrece la asombrosa estructura de estas faneras, que son las plumas de las aves, así cómo hacer visibles los melanosomas (orgánulos que contienen melanina) revelando su color oscuro, tamaño y distribución.

La posibilidad de estudiar tan fácilmente su estructura interna facilitará posteriores trabajos en diversos campos relacionados con la morfología, sistemática, patología y paleontología de las aves.

**Referencias**

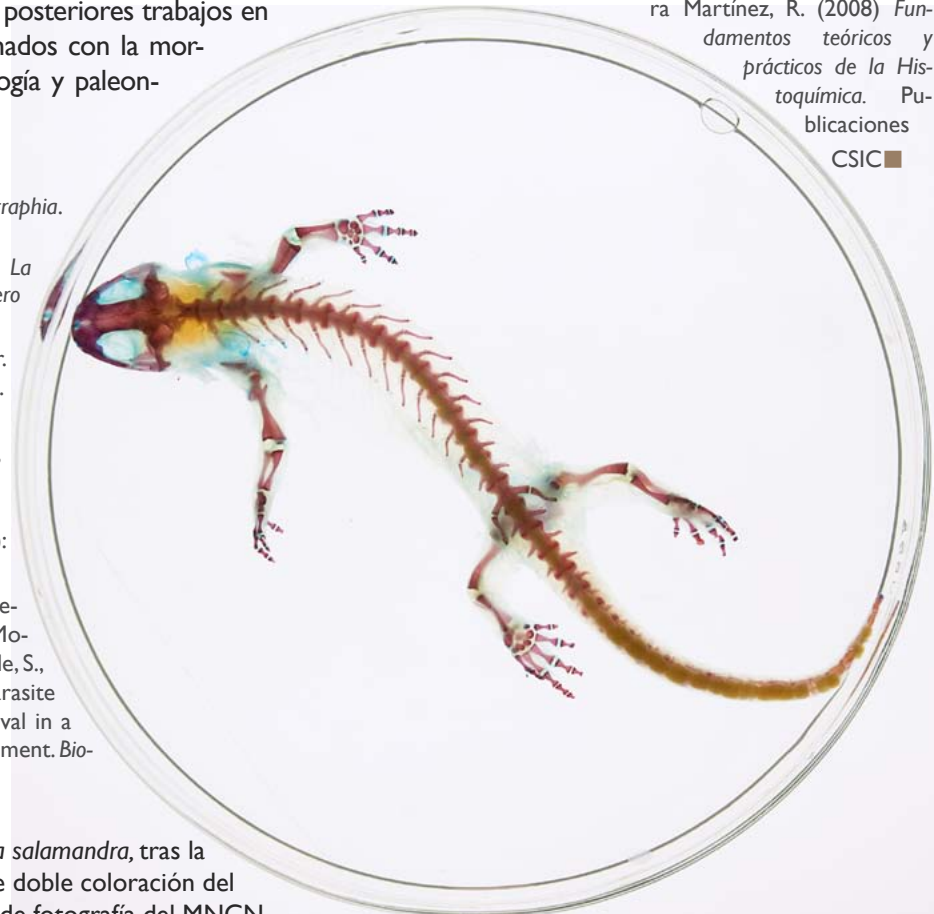
1. Hooke, R. (1665) *Micrographia*. Royal Society London
2. Juan García, Diego. (1998) *La Industria Química y el Ingeniero Químico*. U.M.Murcia.
3. Stermitz and Weininger. (1988). *Química Orgánica*. A.P.I. Orlando.Florida.
4. Valladolid, M. and Przybylski, M. (2000). Some cases of fin abnormalities in *Cobitis paludica*. *Folia Zool.* -49(Suppl.1): 199-203.
5. Martínez de la Puente, J., Merino, S., Tomás, G., Moreno, J., Morales, J., Lobato, E., García-Fraile, S., Belda, E.J. 2010. The blood parasite *Haemoproteus* reduces survival in a wild bird: A medication experiment. *Bio-*

*logy Letters*, 6: 663-665.

6. Zapata, S.C., Funes, M.C., Novaro, A.J. (1997) Estimación de la edad en el zorro colorado patagónico (*Pseudalopex culpaeus*). *Mastozoología Neotropical*; 4(2):145-150

7. Caetano, M.H., Castanet, J., Francillon, H. (1985). Détermination de l'âge de *Triturus marmoratus marmoratus* (Latreille 1800) du Parc National de Peneda Gerês (Portugal) par squeletteochronologie. *Amphibia-Reptilia* 6 : 117-132

8. Martínez Rodríguez, R. y Gragera Martínez, R. (2008) *Fundamentos teóricos y prácticos de la Histología*. Publicaciones CSIC ■



Una salamandra, *Salamandra salamandra*, tras la aplicación del protocolo de doble coloración del esqueleto. / Servicio de fotografía del MNCN