

Atlas de Histología Vegetal y Animal

Técnicas histológicas AMPLIACIONES

Manuel Megías, Pilar Molist, Manuel A. Pombal

Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud.

Facultad de Biología. Universidad de Vigo.

(Versión: Agosto 2018)

Este documento es una edición en pdf del sitio
<http://mmegias.webs4.uvigo.es/inicio.html>.

Todo el contenido de este documento se distribuye bajo
la licencia Creative Commons del tipo BY-NC-SA
(Esta licencia permite modificar, ampliar, distribuir y usar
sin restricción siempre que no se use para fines comerciales,
que el resultado tenga la misma licencia y que se nombre
a los autores)

La edición de este documento se ha realizado con el software \LaTeX
(<http://www.latex-project.org/>), usando Texstudio
(www.texstudio.org/) como editor.

Contenidos

1	Artefactos	1
2	Hematoxilina	6
3	Tabla de colorantes	8
4	Desenmascaramiento de antígenos	14

1 Artefactos

Un artefacto se define como cualquier alteración indeseada introducida en una muestra de tejido debido a las técnicas de procesamiento que se realizan para su observación. Pueden ser espacios sin tejido, roturas, pliegues, colores anormales, precipitados, burbujas de aire, etcétera. En algunas ocasiones son inevitables, pero en la mayoría de los casos son consecuencia de un mal procesamiento histológico. Reconocer estas alteraciones es esencial para una buena interpretación y diagnóstico de la muestra, especialmente si tratamos con muestras patológicas.

Los artefactos se pueden introducir en cualquier paso del proceso histológico, desde la toma de la muestra hasta el montaje para su observación. Vamos a describir los artefactos cronológicamente según el momento de la técnica histológica donde pueden ser introducidos: obtención de la muestra, fijación, inclusión, corte, tinción y montaje.

Obtención de la muestra

Numerosos artefactos observados con el microscopio son consecuencia de un proceso de necropsia, es decir, ha transcurrido un tiempo excesivo entre el cese del flujo sanguíneo y la fijación del tejido. Por ejemplo, 3 minutos postmortem son suficientes para producir expansiones de las vellosidades intestinales. Además, se pierde nitidez en los límites de las membranas y descamación en epitelios, sobre todo prismáticos o columnares. Por tanto, hay que procurar que la fijación siga inmediatamente a la extracción del tejido, y que el tamaño de la pieza no sea muy grande. En el caso de muestras grandes o animales pequeños, es recomendable la fijación por perfusión.

Durante la obtención de las muestras de tejidos es recomendable evitar deformarla y/o perforarlas durante su manipulación, puestas que estas alteraciones no pueden ser corregidos durante la fijación. En la extracción de biopsias hay que tener en cuenta a qué tratamiento se ha sometido previamente a la muestra. Así, podemos encontrar restos de sutura, colorantes que han delimitado la región, polvos de talco de los guantes, demasiado anestésico, métodos de obtención que emplean calor, etcétera. Todo ello puede

introducir alteraciones que tendrán que ser tenidas en cuenta.

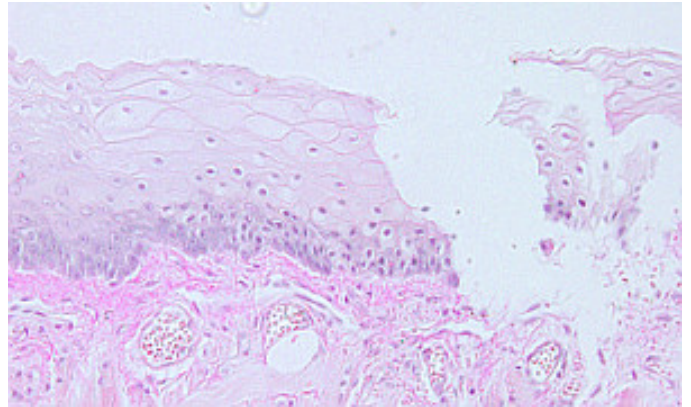


Figura 1. Daños provocados durante el proceso de extracción en la piel.

En algunos casos hay que tener en cuenta la diferente dureza entre partes de la muestra a obtener. Se pueden producir roturas o espacios sin tejido entre las partes duras y las blandas. Otro ejemplo son las muestras de retina, donde la dureza al corte de la esclerótica facilita que se desprendan los segmentos externos de los fotorreceptores del epitelio pigmentario (algo similar a lo que se produce en los desprendimientos de retina), creando un espacio artefactual.

Fijación

Durante la fijación se pueden producir diversas alteraciones del tejido consecuencia de una mala elección del fijador, formación de pigmentos de hemateína o de formalina ácida, adherencia de las muestras al recipiente de fijación, cantidad o tiempo inadecuados de fijador, muestras muy grandes, etcétera.

En la fijación por inmersión se recomiendan piezas no superiores a 6 mm, siendo el volumen de fijador unas 20 veces el volumen de la muestra. En histopatología, el fijador usado normalmente es la formalina al 10%. Una fijación muy prolongada dificulta la obtención de secciones por endurecimiento del tejido, pero además puede producir retracciones del mismo. Es recomendable usar el fijador en soluciones amortiguadoras de pH para evitar posibles retracciones o expansiones del tejido producidas por el uso de soluciones hipertónicas o hipotónicas, respectivamente. La fijación excesiva no sólo altera la consistencia del

tejido sino también sus características bioquímicas y reactivas, siendo posible por tanto los falsos positivos y/o negativos. Se puede producir contaminación con herrumbre cuando el frasco usado para la fijación tiene componentes metálicos, como puede suceder con la tapa del frasco.

Por otro lado, la elección del fijador ha de considerar el medio de inclusión, el método de corte y la técnica de tinción. Por ejemplo, hay fijadores que no son apropiados para inclusiones en parafina, como es una elevada concentración de glutaraldehído, tetróxido de osmio, acroleína y otros. Sin embargo, estos mismos fijadores sí son apropiados para inclusiones en resinas. Por otro lado, los fijadores con ácido pícrico no son los más adecuados para las técnicas inmunohistoquímicas.

Deshidratación-Inclusión

Si tras la fijación se ha de retallar la muestra para su inclusión hay que evitar que queden restos de tejido en la muestra que a incluir. Las muestras con partes que pueden desprenderse han de procesarse por separado para evitar que un bloque contenga tejidos de muestras diferentes.

La inclusión en parafina siempre tiene un paso previo de deshidratación, puesto que la parafina no es hidrosoluble. Este paso implica sustituir el agua de la muestra por alcohol, éste por la sustancia aclarante (normalmente xileno) y ésta última por la parafina. Si el agua permanece en el tejido, la parafina no penetrará y la inclusión será defectuosa. Los alcoholes pierden gradación por la incorporación de agua de la atmósfera y de las propias muestras. Por ello, siempre que sea posible, se han de usar alcoholes recién preparados o con pocos usos. En caso de encontrarnos defectos que supongamos consecuencia de una mala deshidratación, las muestras pueden volver a la estufa para licuar la parafina e hidratarse de nuevo, y así hacer una nueva inclusión.

Si la deshidratación no es adecuada pueden formarse cristales del fijador que permanecen en el tejido. Además, la presencia de restos de agua en la muestra acarrea problemas de corte, provoca a una mala tinción de esa zona y resulta en una mayor opacidad del tejido. Pero si la deshidratación es excesiva en el

tiempo, los tejidos se pueden volver frágiles y duros, lo que puede interferir con el proceso de corte y con los colorantes.

Es muy importante que las muestras no se sequen durante la deshidratación, especialmente en el paso de la sustancia de aclarado. De lo contrario, se pueden crear y retener burbujas de aire en la muestra que luego aparecerán como zonas comprimidas de tejido rodeando a espacios vacíos. Si el tiempo en el líquido aclarante ha sido largo, se producen retracciones del tejido.

Si la inclusión en parafina no fue buena, las secciones se estirarán muy rápidamente cuando se colocan en el baño con agua caliente, lo que puede provocar que las estructuras tisulares se separen unas de otras, como ocurre con epitelios, cartílagos, etcétera. También pueden aparecer grietas. La mala infiltración de la parafina puede estar causada por una mala fijación, deshidratación, aclarado o tiempo insuficiente en la propia infiltración.

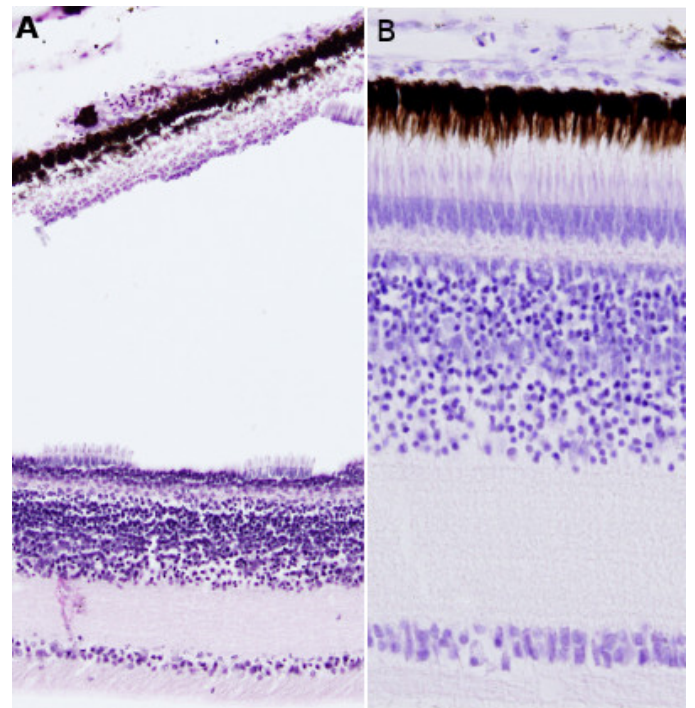


Figura 2. Imágenes de retina. A) Una deficiente deshidratación provoca densidades diferentes que al cortar provoca la separación de los tejidos con diferente consistencia. B) La inclusión fue adecuada y los tejidos permanecen guardando su organización inicial.

Trazas de los líquidos de deshidratación y aclarado en la muestra incluida pueden llevar a secciones con arrugas, que no se estirarán durante el estiramiento, ni cuando se monten en el portaobjetos. Además, ésta porción del tejido se teñirá más intensamente puesto que los colorantes tienen acceso al tejido por las dos superficies.

Si el medio de inclusión es más duro que la muestra se producen arrugas y grietas. Hay tener especial cuidado cuando se manipulan las muestras con pinzas calientes durante el proceso de inclusión, estos instrumentos no deben estar sobrecalentados.

Corte

Una mala sujeción de la cuchilla o de cualquier otra pieza del microtomo puede llevar a secciones con diferente grosor en diferentes partes de la muestra, o incluso a la pérdida de la muestra. También cuando el ángulo de la cuchilla es erróneo o la cuchilla no está bien afilada. El ángulo de inclinación posible de la cuchilla en los microtomos modernos puede oscilar entre 10°-15°. Si el ángulo es muy agudo la cuchilla comprime el tejido, normalmente donde el tejido es más blando. Igual compresión y arrastre del tejido ocurre en cuchillas mal afiladas.

Cuando se selecciona un grosor de corte muy delgado las secciones pueden salir arrugadas y a veces no es posible estirarlas en el agua. Se pueden producir secciones incompletas por una mala inclusión o porque se ha elegido un grosor de corte muy delgado. Si la cuchilla está mellada se producen roturas estriadas en las secciones. Conviene que la muestra esté completamente rodeada por medio de inclusión para que la cuchilla no “ataque” directamente a la muestra, lo cual podría deformarla o dañarla.

Estiramiento de los cortes

El agua que se emplea para estirar los cortes debe ser destilada, para que al evaporarse no queden cristales, y limpia para que no haya restos extraños. Además, durante el secado de los cortes, deben protegerse del polvo o partículas.

Cuando la temperatura del agua es muy alta o muy baja pueden generarse grietas en las secciones. Si está muy alta se producen expansiones del tejido y

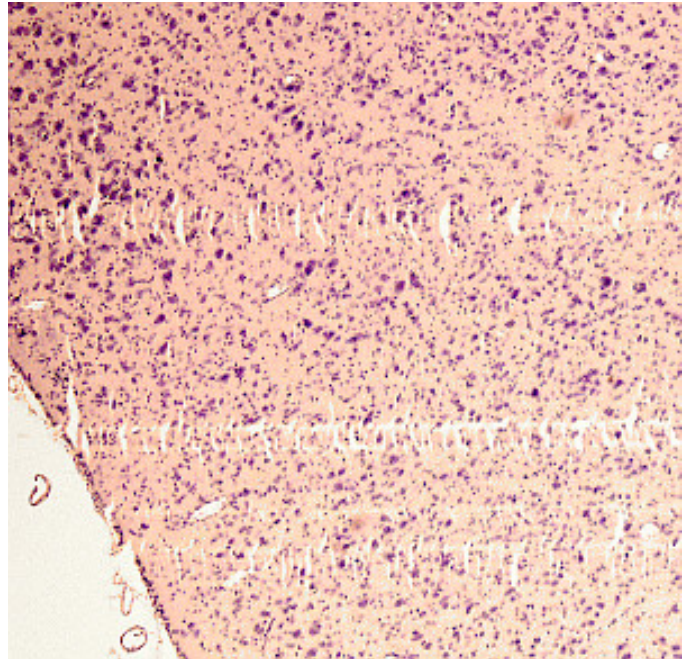


Figura 3. Estriás producidas en el corte por una cuchilla mellada.

pueden aparecer núcleos picnóticos y burbujas nucleares. También hay que tener en cuenta la distribución de las secciones para evitar que se solapen o se arruguen por falta de espacio durante el estiramiento.

Los portaobjetos tienen que estar completamente limpios y sin restos de ningún tipo. Si los portaobjetos se han cubierto con el adherente en el propio laboratorio (son muy comunes los portaobjetos recubiertos con gelatina y alumbre de cromo y potasio), se ha de tener especial cuidado en que no se produzcan grumos de la solución sobre el portaobjetos cuando se está secando en la estufa. Además, la solución debe ser transparente y, una vez sumergidos los portaobjetos, deben escurrirse muy bien. Por otra parte, si la calidad del adherente usado no es buena, los cortes podrían desprenderse total o parcialmente del portaobjetos durante el procesado posterior.

Tinción

La eliminación de parafina debe ser completa antes de la tinción porque los restos de parafina producen mala penetración de los colorantes, alterando la calidad de la tinción.

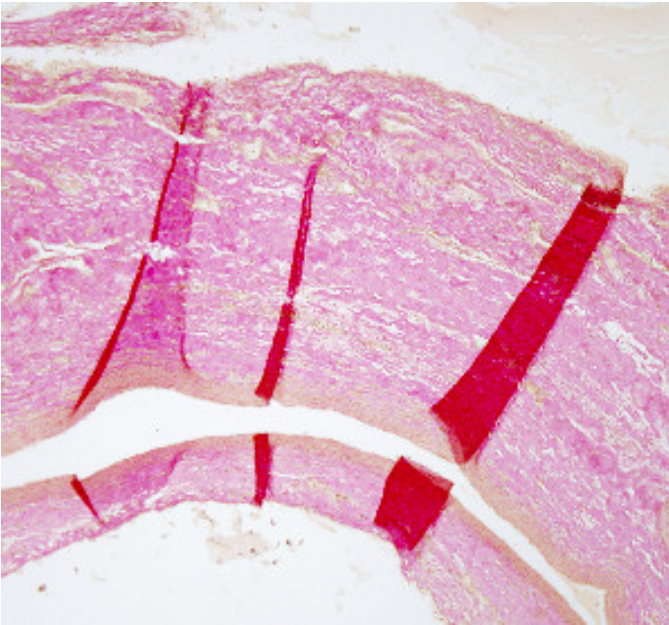


Figura 4. Zona muscular de delfín cercana al páncreas. Pliegues del tejido muscular, que se observan a ambos lados de una arteria, formadas por no extender los cortes de manera correcta. Van Gieson.

Las soluciones de colorantes han de estar limpias de microorganismos y filtradas para evitar artefactos como cristales o precipitados de colorante. Es una buena práctica filtrar la solución del colorante antes de su uso.

Cuando se tiñen las muestras mediante gota, no sumergiendo el portaobjetos en la solución, hay que procurar que todo el corte quede cubierto y que no se seque la solución durante el tiempo de tinción para que la tinción sea homogénea y evitar precipitados de colorante por evaporación local.

Los artefactos más frecuentes producidos durante la tinción suelen deberse a un aclarado incompleto del colorante y a la precipitación de cristales de colorante en el tejido. En algunos casos es necesario adaptar el tiempo de tinción a las características de la muestra (grosor, dureza, etc.), para que el tejido se tiña adecuadamente.

Montaje

Una vez teñidas las secciones, la deshidratación ha de ser completa para evitar la aparición de gotitas de agua en el medio de montaje. Si esto ocurre,

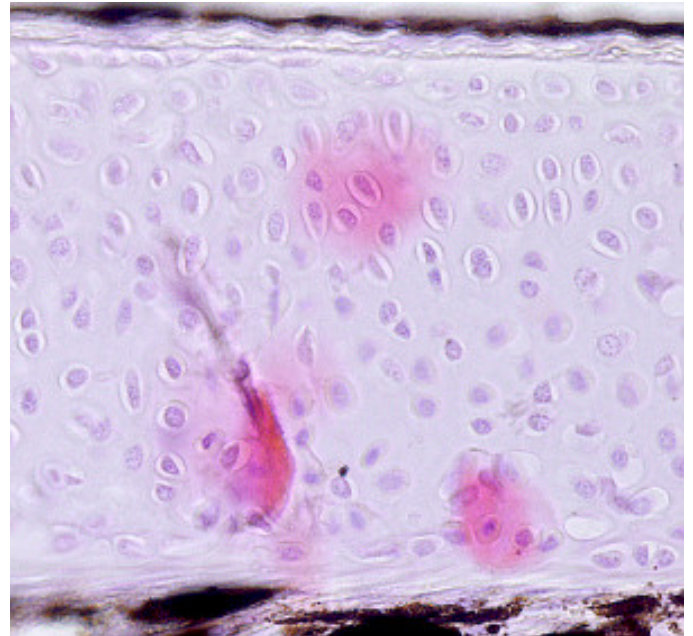


Figura 5. Tejido cartilaginoso con precipitados. Esto se debe a no filtrar los colorantes o por formación de precipitados en cortes que han estado almacenados durante cierto tiempo.

se puede solucionar sumergiendo otra vez las secciones en xileno, alcohol absoluto y en alcoholes de gradación decreciente, hasta su hidratación, y repitiendo la deshidratación en mejores condiciones (soluciones nuevas, alargar tiempos, etc.). Sin embargo, en algunos casos el tiempo en alcohol determina el grado de tinción, por lo que habría que volver a pasar de nuevo por las soluciones de colorantes.

El cubreobjetos tiene que estar limpio y hay que manipularlo cogiéndolo por los bordes. Además, no deben quedar burbujas de aire durante el montaje y hay que tener cuidado con la cantidad de medio de montaje a utilizar: si es poco podría no cubrir toda la sección cuando se evapore el xileno. Si se añade un exceso de medio de montaje se generará una capa tan gruesa que no se podrán utilizar objetivos de gran aumento, como el de 100x. Estos objetivos tienen una distancia focal muy corta, es decir, las lentes de estos objetivos deben estar muy próximas a la muestra para poder enfocarla, y el aumento del espesor normal del medio de montaje se lo impedirá. Del mismo modo, debe usarse un medio de montaje lo más parecido a cómo se obtuvo de la casa comercial puesto que con

el tiempo los medios de montaje suelen perder el disolvente y se vuelven más viscosos. Esto hace que sea más difícil conseguir una capa delgada y por tanto estamos en el mismo problema mencionado anteriormente.

El corte no se debe secar una vez que sale del último xileno y antes de añadir el medio de montaje puesto que se pueden generar burbujas. Si, tanto el portaobjetos como el cubreobjetos, se ensucian durante este proceso por un exceso de medio de montaje (lo cual dificultaría la visualización de la muestra en el microscopio), éste se puede eliminar lavando cuidadosamente la preparación con xilol o limpiando con una cuchilla afilada.

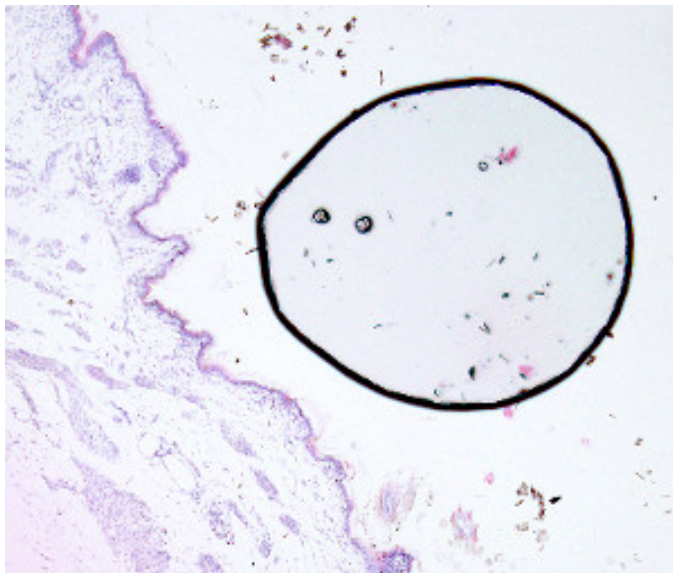


Figura 6. Durante el proceso de montaje final pueden quedar burbujas de aire entre el tejido y el cubre-objetos.

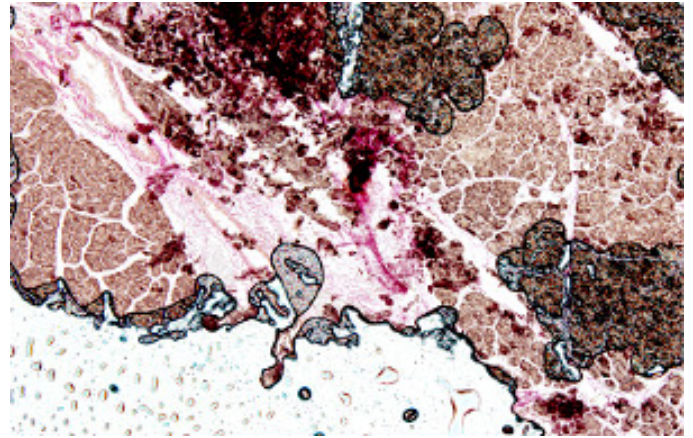


Figura 7. Páncreas delfín. Este artefacto se observa cuando se realiza una mala deshidratación del corte ya teñido. El agua acumulada no protege al tejido que se seca apareciendo zonas negras. Van Gieson.

Consejo general

Antes de realizar cualquier técnica histológica se deben hacer pruebas con diferentes tiempos de fijación, deshidratación, inclusión y tinción. Aunque hay establecidos unos tiempos estándar para cada uno de estos procesos hay que considerarlos orientativos porque cada tejido reacciona de diferente manera ante los distintos procedimientos histológicos.

Bibliografía

Jimson S, Malathi L, Kumar GMK, Balachander N. 2016. Artefacts in histological section. *Biomedical and pharmacology journal*. 9: 843-845.

McInnes E. 2005. Artefacts in histopathology. *Comparative clinical pathology*. 13: 100-108.

2 Hematoxilina

La hematoxilina es un colorante natural que se obtiene de la madera del árbol *Haematoxylum campechianum*. El nombre deriva del griego: haimatos: sangre y xylon: madera. La hematoxilina que se compra proviene directamente de estos árboles que son originarios de América Central y del Sur. Aunque se ha conseguido sintetizar en el laboratorio su producción sigue siendo natural. Para su obtención se astilla la madera y se hierve. Se obtiene una solución rojiza que luego se vuelve amarilla, y posteriormente negruzca cuando se vuelve a enfriar. El agua se evapora dejando la hematoxilina cruda con una pureza que puede llegar al 10 %. Es necesario purificar posteriormente con éter, secar y volver a cristalizar en ambiente acuoso.

Como colorante fue introducido independientemente por Böhmer (1865) y Fischer (1875). Wossowzky (1876) introdujo la mezcla hematoxilina y eosina en una tinción.

El colorante no es realmente la hematoxilina sino la hemateína, la cual se consigue durante la preparación del colorante mediante la oxidación química de la hematoxilina, aunque también se puede obtener por oxidación del oxígeno atmosférico dejándola madurar durante 6 a 8 semanas. El yodato sódico es el agente oxidante más comúnmente usado (0.2 g oxidarán a 1 g de hematoxilina). Otros son la iodina, el peróxido de hidrógeno, o el permanganato potásico. Esta oxidación continuará por la acción atmosférica y si el colorante es muy viejo se puede producir una sobreoxidación que resultará en malas tinciones. Esta tasa de oxidación se puede reducir añadiendo glicerol o un alcohol a la solución. Normalmente se añade la mitad del oxidante necesario para oxidar toda la hematoxilina de la solución por lo que con el tiempo se irá produciendo más hemateína sin riesgo de sobreoxidación, y el colorante se podrá usar durante mucho tiempo.

La hemateína en solución tiene un color rojo a pH menor que 1, amarilla a un pH entre 1 y 5, y violeta a un pH por encima de 6. Sin embargo, la hemateína no tiñe por sí sola, sino que necesita iones metálicos

cargados negativamente, y que actúan como mordiente. Normalmente estas sales son de aluminio (como el alumbre de amonio o de potasio) o de hierro (cloruro férrico o alumbre de hierro). Las soluciones que contienen aluminio y hemateína se llama hemalumbre. Otros mordientes menos frecuentes son el alumbre de cromo, y sólo en casos especiales se añade iones de plomo, cobre, zirconio, o ácido fosfotúngstico o ácido fosfomolibdico. La cantidad de iones ha de ser mayor que la de hemateína y debe ser una solución acidificada. La hematoxilina con mordiente de aluminio se usa para resalta núcleos, los mordientes de hierro permiten teñir núcleos en ambientes ácidos, para las estrías musculares. Con ácido fosfotúngstico se usa para las estrías musculares, fibrina y fibras gliales. El color de la tinción con hematoxilina se puede cambiar mediante su combinación con los mordientes. Así, cuando se mezcla con alumbre de aluminio se consigue un color azul, el alumbre de hierro da un color negro y las sales de estaño dan un color rojo.

La tinción con hemalumbre puede ser progresiva o regresiva. Se prefiere normalmente una tinción progresiva, pero si se ha sobreteñido se puede corregir con alcohol de 70° o 95°, con un poco de ácido clorídrico. También se puede usar una solución acuosa acidificada, pero el proceso es más lento. La sobretinción se puede prevenir añadiendo a la solución de colorante más aluminio o acidificándola más. El hemalumbre cambia de color marrón a azul a pH 6, eso es por lo que se pone en agua del grifo.

La hemateína-hierro da un color mucho más oscuro. En la hematoxilina de Heidenhain la hemateína y el hierro se aplican secuencialmente obteniendo una gran variedad de estructuras teñidas por diferenciación. Esta hematoxilina es recomendada cuando se aplican soluciones ácidas posteriores puesto que la tinción del núcleo es muy fuerte. Por eso, además, son técnicas progresivas.

Bibliografía

Kiernan JA. 2008. *Histological and histochemical methods. Theory and Practice.* Scio Publishing limited 4th Edition. Oxfordshire.UK. ISBN: 9781904842422.

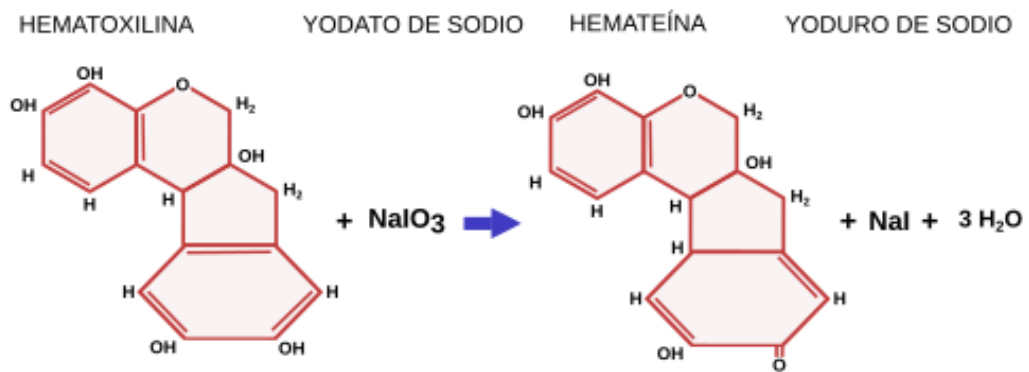


Figura 8. Conversión de hematoxilina en hemateína

3 Tabla de colorantes

Los colorantes son sustancias que se emplean para dar color a las estructuras que componen los tejidos animales y vegetales, es decir, para teñir las células, y sus compartimentos, y la matriz extracelular. Hay un número muy elevado de colorantes que se emplean en los laboratorios de histología con usos diversos, lo que depende de lo que queramos observar en nuestra preparación. Los colorantes se eligen en función de su color, forma y peso molecular, solubilidad y su capacidad para reaccionar con moléculas del tejido.

Los colorantes pueden ser previsibles en cuanto a qué estructuras van a teñir y con qué color lo van a hacer si consideramos su naturaleza química. Así, si tenemos en cuenta su carga eléctrica, que se puede deducir de su estructura molecular, podemos clasificarlos en catiónicos o ácidos que teñirán el núcleo

(el ácido desoxirribonucleico) y carbohidratos ácidos, aniónicos o básicos que teñirán el citoplasma y matriz extracelular. Mientras que los colorantes no cargados pueden ser reactivos que tiñen una gran variedad de estructuras, los liposolubles que tiñen depósitos lipídicos y los mordientes que tiñen principalmente mielina y núcleos. El tamaño de la molécula y su capacidad para formar agregados es a veces importante por la diferente capacidad de penetración en el tejido. Por ejemplo, se pueden usar dos colorantes aniónicos con diferente tamaño para teñir estructuras diferentes.

Bibliografía

Kiernan JA. 2008. *Histological and histochemical methods. Theory and Practice.* Scio Publishing limited 4th Edition. Oxfordshire.UK. ISBN: 9781904842422.

Tabla de colorantes (modificado de Kiernann 2009).

Nombre	Molécula	Tipo	Color	Tiñe	Protocolo
Iodina	Inorgánico		Azul	Cromosomas y depósitos de almidón y glucógeno. Bacterias Gram. Protozoos.	Solución de Lugol
Tetróxido de osmio	Inorgánico		Gris oscuro, negro	Es una reacción histoquímica: lípidos, proteínas, aparato de Golgi, nervios, neuronas, glía.	Método de Golgi, método de Marchi.
Sales de plata y de oro	Inorgánico		marrón oscuro, negro, amarillo.	Citoesqueleto, núcleos. Sistema nervioso. Tejido conectivo reticular.	Impregnaciones y virados. Impregnación de Cajal, Bodian, Gallyas, Bielchowsky, Campbell-Switzer, Gomory y técnicas de piridina de plata
Azul Prusia	Pigmento inorgánico		Azul	Hierro citoplasmático no unido a grupos hemo. Cisteína y cistina.	Método histoquímico.

Figura 9

Verde naftol	Nitroso	Complejo metal-colorante	Verde	Colágeno	Mezclas de colorantes aniónicos.
Ácido pícrico	Nitro	Aniónico	Amarillo	Citoplasma	Tricrómicos, actúa como mordiente.
Amarillo Martius	Nitro	Aniónico	Amarillo-naranja	Citoplasma	En conjunción con colorantes aniónicos.
Naranja G	Nitro	Aniónico	Naranja	Citoplasma	Papanicolaou, Tricómico de Mallory, tricómico de Heidenhain.
Amarillo metanilo	Azo	Aniónico	Amarillo	Citoplasma, tejido conectivo	Contrastes aniónicos
Escarlata de Biebrich	Azo	Aniónico	Escarlata	Colágeno, proteínas básicas	Tricómico de Masson (sustituye a fucsina ácida)
Amaranto	Azo	Aniónico	Rojo	Citoplasma, núcleos	Tricómico de Gabe
Marrón Bisckmarck	Azo	Catiónico	Marrón	Extensiones celulares	
Verde Jano B	Azo / azino	Catiónico	Verde	Mitocondrias, bacterias	
Amarillo alcian	Azo / tiazol	Catiónico	Amarillo / fluorescente	Bacterias	
Rojo brillante proción M2B	Azo	Reactivo	Rojo	Tinción vital para dientes y hueso	
Sudán IV	Azo	Solvente	Rojo	Gotas de lípidos	

Figura 10

Rojo aceite O	Azo	Solvente	Rojo	Gotas de lípidos	
Sudán negro B	Azo	Solvente / catiónico	Negro	Gotas de lípidos	
Rojo Congo	Azo	Directo	Rojo	Depósitos amiloides / indicador de pH	
Azul benzo BB	Azo	Directo	Azul	Fibras de colágeno (birrefringencia)	
Clorazol negro E	Azo	Directo	Negro	Para plantas, hongos y microorganismos	
Rojo sirio F3B	Azo	Directo	Rojo	Fibras de colágeno (birrefringencia)	
Auromina O	Arilmetano	Diarilmetano	Amarillo	Bacilo de la tuberculosis	
Pararosanilina	Arilmetano	Aminotriarilmetano			Para reactivo de Schiff
Fucsina básica	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Rojo	Núcleo	Para reactivo de Schiff
Rosanilina	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Magenta		No comercial
Magenta II	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Magenta		No comercial
Cristal violeta	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Violeta	Bacterias Gram +	
Verde metilo	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Verde azulado		No comercial
Verde etilo	Arilmetano	Aminotriarilmetano	Verde azulado	Núcleo, ADN, ARN	

Figura 11

Fucsina ácida	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Rojo		
Verde rápido FCF	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Verde-azulado	Conectivo	
Azul de anilina (azul de metileno)	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Azul	Conectivo	
Azul brillante de Comassie	Arilmetano	Aminotriarilmetano, aniónico	Azul	Proteínas en geles	
Fluoresceína de sodio	Xanteno	Aniónico	Fluorescente	Proteínas	
Eosinas	Xanteno	Aniónico	Rosa	Conectivo, citoplasma	
Pironina Y	Xanteno	Catiónico	Rojo	ADN	
Rodamina B	Xanteno	Catiónico	Fluorescente		
Verde oregón	Xanteno	Catiónico	Fluorescente		
Acridina	Acridina	Catiónico	Amarillo, Fluorescente	ADN	
Naranja de acridina	Acridina		Fluorescente	ADN, carbohidratos, vital	
Rojo neutro	Azina	Catiónico	Rojo	Núcleos, lisosomas, vacuolas, colorante vital	
Safranina O	Azina	Catiónico	Rojo	Lignina de plantas y núcleos	
Azocarmín G y B	Azina	Aniónico	Rojo	Citoplasma.	

Figura 12

Violeta de cresilo	Oxacina	Catiónico	Violeta	Núcleos	
Galocianina	Oxacina	Catiónico	Verde-azulado	ADN	
Azul Nilo	Oxacina	Aniónico	Azul	Colorante vital	
Orceína	Oxacina	Catiónico	Rojo	Elastina, cromosomas	
Tionina	Tiazino	Catiónico	Azul		
Azur A, B y C	Tiazino	Catiónico	Azul	Sangre	
Azul de metileno	Tiazino	Catiónico	Azul		
Verde metileno	Tiazino	Catiónico	Verde-azulado	Núcleos	
Azul de toluidina	Tiazino	Catiónico	Azul, metacromático		
Violeta de metileno de Bernthsen	Tiazino	Catiónico	Azul	Extensiones de sangre	
Calcofluor blanco	Polieno		Fluorescente	Celulosa	
Indigo	Carbonil	Antroquinona			
Rojo alzian	Carbonil	Antroquinona			
Rojo rápido nuclear	Carbonil	Antroquinona			
Azul turquesa sirio pálido	Phtalocianina				
Azul alcian 86	Phtalocianina				

Figura 13

Azul cuprolínico	Phtalocianina				
Azul rápido Luxol	Phtalocianina				

Figura 14

4 Desenmascaramiento de antígenos

Éste un resumen del trabajo fin de grado de Clara Leboreiro Babé, defendido en 2017 en la Universidad de Vigo.

Numerosas enfermedades son detectadas y evaluadas mediante técnicas inmunohistoquímicas. La calidad de los resultados de estas pruebas es a menudo esencial para tomar una decisión sobre el tratamiento o el estadio en el que se encuentra dicha enfermedad. Una de las precauciones a la hora de emplear técnicas inmunohistoquímicas es tener en cuenta la posible alteración de los antígenos debido a la fijación y procesamiento de los tejidos.

En la mayoría de los laboratorios de patología clínica se procesan los tejidos mediante la fijación en formol y posterior inclusión de los mismos en parafina. Este fijador es una disolución acuosa de formaldehído, normalmente a una concentración del 4%. Se ha demostrado que el formaldehído provoca numerosas y complejas reacciones entre las proteínas del tejido, principalmente enlaces cruzados entre dichas proteínas. En soluciones acuosas el formaldehído forma metileno hidratado que reacciona con una gran cantidad de cadenas laterales de las proteínas para formar grupos reactivos hidroximetilo, los cuales se unen a otras proteínas presentes en el tejido formando puentes de metileno. Las cadenas laterales de las proteínas que presentan mayor reactividad con este compuesto contienen los aminoácidos cisteína, lisina, histidina y tirosina.

Las proteínas entre las que se producen los enlaces cruzados incluyen algunas que actúan como antígenos y que se emplean en la detección de numerosas patologías mediante técnicas inmunohistoquímicas. Estos enlaces impiden en ocasiones que el anticuerpo pueda reconocer a la proteína porque los sitios de unión o epítomos quedan enmascarados. Como consecuencia se pueden generar falsos negativos en los resultados, es decir, se dan casos en los que el antígeno se encuentra en el tejido y debido a este enmascaramiento antigénico no se detecta inmunohistoquímicamente.

Además de las modificaciones descritas, la for-

mación de complejos de calcio, la modificación de la conformación de las proteínas y la variación de la carga electrostática de las mismas se consideran fenómenos causantes de enmascaramiento de antígenos por efecto del formol. Se cree que las modificaciones proteicas se producen en la cadena aminoacídica, o estructura primaria de la proteína, siendo menos relevante las alteraciones en las estructuras secundarias y terciarias, aunque en ocasiones también se pueden modificar estas últimas alterándose de este modo los epítomos conformacionales. La unión antígeno-anticuerpo depende sobre todo de fuerzas electrostáticas y la fijación con formaldehído modifica también la carga electrostática superficial del antígeno completo y del epítomo específico a detectar, impidiendo la interacción antígeno-anticuerpo.

Los enlaces cruzados formados por el formaldehído son estables a ciertos niveles de pH, temperatura y según el medio en el que se encuentre el tejido. Sin embargo, tienen la particularidad de ser reversibles y si estos factores son modificados se podrían romper dichos enlaces y los epítomos de interés quedarían expuestos. El proceso por el que se consigue desenmascarar los epítomos para ser reconocidos por anticuerpos se conoce como recuperación de antígenos o recuperación antigénica. La recuperación de antígenos se podría llevar a cabo mediante la eliminación de barreras moleculares que impiden el reconocimiento del antígeno por parte del anticuerpo; de este modo la técnica de recuperación antigénica revertiría la mayoría de las modificaciones generadas por la fijación, restableciéndose una conformación proteica casi idéntica a la original, restaurando la carga electrostática de las proteínas y recuperando su inmunoreactividad previa a la fijación con formol.

La recuperación antigénica ha mejorado la técnica inmunohistoquímica para su uso en el diagnóstico de patologías. Se definen dos etapas en la historia del empleo de la inmunohistoquímica en histología, pre-antigen-epitope retrieval y post-antigen-epitope retrieval, debido a la importancia que supuso su introducción en los laboratorios. El formol es el fijador más común en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica, así como en los bancos de tejidos, y en ambos casos es habitual realizar el proceso de desenmascaramiento antigénico antes de emplear

inmunohistoquímica en los tejidos. Una ventaja adicional que conlleva el uso de esta técnica es que consigue un menor umbral de detección del antígeno, permitiendo emplear diluciones mayores de anticuerpo; esto, además de suponer una ventaja económica, reduce el ruido de fondo y se aumenta la señal del marcaje. Los tejidos que se encuentran en los denominados bancos de tejidos han adquirido un enorme valor gracias al uso de esta técnica, ya que se posibilita que tejidos fijados décadas atrás y en diferentes laboratorios se empleen para investigaciones clínicas. Además, es posible la combinación de la técnica de recuperación de antígenos junto con la proteómica para la búsqueda y uso de biomarcadores en medicina personalizada.

El origen de la técnica de recuperación de antígenos consistió en hervir secciones de tejido en agua. Posteriormente se comenzaron a emplear tampones en sustitución del agua con el fin de mantener la conformación de las proteínas. A día de hoy, hay una gran diversidad en cuanto a métodos de recuperación antigénica que combinan el uso de diversas fuentes de calor, tampones y actividad enzimática. El uso de enzimas se introdujo como un método alternativo para desenmascarar antígenos que puedan perder antigenicidad si son expuestos a calor, como las citoqueratinas.

Los métodos de recuperación de antígenos se dividen según se aplique calor, en cuyo caso se emplean las siglas HIER (Heat-Induced Epitope Retrieval), o si se basa en el uso de enzimas proteolíticas, conocido como PIER (Proteolytic-Induced Epitope Retrieval). El método HIER es el más común, con variaciones en cuanto a las fuentes de calor utilizadas. La mayoría de los investigadores utilizan el microondas o un recuperador de antígenos de funcionamiento similar a un autoclave. Como alternativa, se puede emplear un baño caliente o una estufa. Cada fuente de calor presenta una serie de ventajas y desventajas (Tabla 1).

En el método PIER las enzimas más comunes son la proteinasa K y la tripsina, las cuales degradan los puentes metileno. La duración de la aplicación enzimática debe ajustarse en función del tiempo de fijación al que ha estado sometido el tejido. Debido a

que un tiempo inadecuado de exposición a la actividad enzimática puede dañar el tejido no es un método empleado en muchos laboratorios. Se ha sugerido la utilización combinada de ambos métodos, PIER y HIER, en aquellos casos en los que no se obtienen buenos resultados empleando uno de estos dos métodos por separado.

Los principales factores que afectan a la recuperación de antígenos en el método HIER son la temperatura y el pH de la solución tampón en la cual se sumerge el tejido durante el proceso de recuperación antigénica. El efecto de la temperatura depende de dos variables, la temperatura alcanzada y el tiempo de exposición al calor. A medida que aumenta la temperatura alcanzada se debe disminuir el tiempo de exposición, y viceversa. Por otra parte, la composición del tampón no parece tener tanta importancia como su pH. Así, determinados antígenos se recuperan con mayor facilidad a pH básicos mientras que otros precisan de pH ácidos. El tampón que se suele usar en pH ácidos es el tampón citrato, mientras que a pH básicos es más común el tampón Tris.

Se ha estudiado el efecto que podría tener el Ca en la recuperación antigénica ya que su presencia en los tejidos parece promover el enmascaramiento antigénico, mediante la formación de complejos moleculares en los que participa el calcio endógeno durante el procesamiento del tejido. Para tratar de solucionar este problema son numerosos los estudios que emplean EDTA como componente de los tampones en la recuperación antigénica. El EDTA es un compuesto que se emplea como quelador de calcio con el fin de eliminar el calcio presente en el tejido. Sin embargo, hay controversia respecto al papel que podría tener este elemento pues algunos resultados sugieren que el EDTA no afecta a la recuperación antigénica de determinados antígenos.

La evaluación de una tinción inmunohistoquímica mediante métodos cuantitativos no está muy extendida a día de hoy, pues todavía se siguen evaluando las tinciones por observación directa al microscopio, es decir, cualitativamente. El análisis de imagen permite una evaluación cuantitativa de una imagen digital. Depende de dos factores: los equipos para la adquisición de imágenes digitales y los programas de

	Baño caliente	Microondas	Olla a presión
Rango de temperatura	25 a 100 °C	85 a 95 °C	25 a 125 °C
Regulación de la temperatura	Buena	Buena	Óptima
Evaporación potencial de la solución tampón	Significativa	Significativa	Mínima
Desbordamiento potencial por ebullición	Nulo	Significativo	Nulo

Figura 15. Resumen de las características más importantes de las fuentes de calor comúnmente empleadas en el método HIER:

análisis de imagen. A continuación se describen los aspectos a tener en cuenta:

Adquisición de imágenes. Éstas pueden ser tomadas en escala de grises o en formato RGB. Se deben tener en cuenta los efectos que compensan las cámaras digitales como la compensación de color, iluminación, balance de blancos y óptica del microscopio. Por tanto, las condiciones de captura de imágenes han de ser exactamente iguales para todas las muestras.

Tipo de sensor de la cámara. Existen dos tipos de sensores, los CCD (Charge Coupled Device) y los CMOS (Complementary Metal Oxide Semiconductor). La tecnología de los CCD es más avanzada, se considera superior y más adecuada para el análisis científico de imagen ya que los píxeles son más grandes. Además, los equipos con tecnología CMOS normalmente generan imágenes con más ruido, especialmente cuando se trabaja con fluorescencia.

Formato de imagen. Determinados formatos de imagen comprimen las fotografías perdiendo calidad y, por lo tanto, información. La calidad de la imagen depende también de su resolución. Por tanto, hay que encontrar el balance entre el grado de compresión y el tamaño de la imagen.

Análisis de imagen. Para analizar una imagen digital tomada de un tejido procesado inmunohistoquímicamente se presupone que hay una relación directa entre la señal y la cantidad de antígeno, y que por lo tanto una mayor intensidad de tinción corresponde con una mayor concentración antigénica. A pesar de que el análisis de imagen reduce el error a la hora de evaluar una tinción inmunohistoquímica, es necesario que las muestras a comparar sigan exacta-

mente el mismo protocolo antes de tomar la imagen digital: recolección, fijación, inclusión, tratamiento de recuperación de antígenos, e inmunotinción. De otra manera se pueden obtener resultados erróneos.

Debido a que la formación de puentes cruzados por el formol depende en gran medida de la estructura primaria de las proteínas, la recuperación antigénica va a estar determinada por la secuencia de aminoácidos de cada antígeno. Se ha demostrado que determinados antígenos necesitan de unas condiciones específicas para su recuperación. Algunos antígenos precisan ser recuperados para poder detectarse en una tinción inmunohistoquímica, mientras que para otros antígenos la técnica de recuperación antigénica no es esencial para su detección pero su aplicación aumenta la señal de marcaje. En algunos casos la recuperación antigénica ha dado lugar a falsos positivos, pero también a falsos negativos, por lo que el correcto ajuste de las condiciones de recuperación es de vital importancia. Esto significa que una aproximación incorrecta a la técnica de recuperación de antígenos puede no mejorar la señal de marcaje, e incluso disminuir la misma. Por tanto, es recomendable elaborar un protocolo de recuperación de antígenos particular para el antígeno en el que se esté interesado.

Bibliografía

Alelú-Paz, R., Haroutunian, V., Iturrieta-Zuazo, I., Byne, W., García-Villanueva, M., Rábano, A., García-Amado, M., Prensa, L., Giménez-Amaya, J.M. (2008). A new antigen retrieval technique for human brain tissue. *PLOS ONE*. 3: e3378.

Balgley, B.M., Guo, T., Zhao, K., Fang, X., Tavassoli, F.A., Lee, C.S. (2009). Evaluation of archival

time on shotgun proteomics of formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J. Proteome. Res.* 8: 917-925.

Battifora, H. (1991). Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am. J. Clin. Pathol.* 96: 669-671.

Boenisch, T. (2006). Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J. Histochem. Cytochem.* 54: 961-964.

Bogen, S., Vani, K., Sompuram, S. (2009). Molecular mechanisms of antigen retrieval: antigen retrieval reverses steric interference caused by formalin-induced crosslinks. *Biotech. Histochem.* 84: 207-215.

D'Amico, F., Skarmoutsou, E., Stivala, F. (2009). State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *J. Immunol. Methods.* 341: 1-18.

Elias, J.M., Rosenberg, B., Margiotta, M., Kutcher, C. (1999). Antigen restoration of MIB-1 immunoreactivity in breast cancer: combined use of enzyme predigestion low temperature for improved measurement of proliferation indexes. *J. Histotechnology.* 22: 103-106.

Eltoum, I., Fredenburgh, J., Myers, R.B., Grizzle, W.E. (2001). Introduction to the theory practice of fixation of tissues. *J. Histotechnology.* 24: 173-190.

Ezaki, T. (2000). Antigen retrieval on formaldehyde-fixed paraffin sections: its potential drawbacks optimization for double immunostaining. *Micron.* 31: 639-649.

Floyd, A.D. (2010) Image analysis in immunohistochemistry. En: Shi, S-R., Taylor, C.R. Antigen retrieval immunohistochemistry based research diagnostics. New Jersey: John Wiley & Sons Inc, pp. 165-185.

Fowler, C.B., Evers, D.L., O'Leary, T.J., Mason, J.T. (2011). Antigen retrieval causes protein unfolding. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 366-381.

Fox, C.H., Johnson, F.B., Whiting, J., Roller, P.P. (1985). Formaldehyde fixation. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 845-853.

Fraenkel-Conrat, H., Cooper, M., Olcott, H.S. (1945). The reaction of formaldehyde with proteins.

J. Am. Chem. Soc. 67: 950-954.

Frost, A.R., Sparks, D., Grizzle, W.E. (2000). Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* 8: 236-243.

Gown, A.M., Willingham, M.C. (2002). Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 449-454.

Gown, A.M. (2004). Unmasking the mysteries of antigen or epitope retrieval formalin fixation. *Am. J. Clin. Pathol.* 121: 172-174.

Kahveci, Z., Minbay, F., Noyan, S., Çavusoglu, I. (2003). A comparison of microwave heating proteolytic pretreatment antigen retrieval techniques in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Biotech. Histochem.* 78: 119-128.

Long, D.J., Buggs, C. (2008). Microwave oven-based technique for immunofluorescent staining of paraffin-embedded tissues. *J. Mol. Histol.* 39: 1-4.

Namimatsu, S., Ghazizadeh, M., Sugisaki, Y. (2005). Reversing the effects of formalin fixation with citraconic anhydride heat: a universal antigen retrieval method. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 3-11.

Rait, V.K., O'Leary, T.J., Mason, J.T. (2004). Modeling formalin fixation antigen retrieval with bovine pancreatic ribonuclease A: I-Structural functional alterations. *Lab. Invest.* 84: 292-299.

Ramos-Vara, J.A., Beissenherz, M.E. (2000). Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12: 307-311.

Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R. (1997). Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, future. *J. Histochem. Cytochem.* 45: 327-343.

Shi, S.R., Cote, R.J., Taylor, C.R. (2001). Antigen retrieval techniques: current perspectives. *J. Histochem. Cytochem.* 49: 931-937.

Shi, S.R., Cote, R.J., Yang, C., Chen, C., Xu, H.J., Benedict, W.F., Taylor, C.R. (1996). Development of an optimal protocol for antigen retrieval: a “test battery” approach exemplified with reference to the staining of retinoblastoma protein (pRB) in formalin-fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 179: 347-352.

Shi, S.R., Imam, S.A., Young, L., Cote, R.J., Taylor, C.R. (1995). Antigen retrieval immunohistochemistry under the influence of pH using monoclonal antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 43: 193-201.

Shi, S.R., Key, M.E., Kalra, K.L. (1991). Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 741-748.

Shi, S.R., Shi, Y., Taylor, C.R. (2011). Antigen retrieval immunohistochemistry: review future prospects in research diagnosis over two decades. *J. Histochem. Cytochem.* 59: 13-32.

Taylor, C.R., Shi, S.R., Chen, C., Young, L., Yang, C., Cote, R.J. (1996). Comparative study of antigen retrieval heating methods: microwave, microwave pressure cooker, autoclave, steamer. *Biotech. Histochem.* 71: 263-270.

Yamashita S., Okada Y. (2005) Mechanisms of heat-induced antigen retrieval: analyses in vitro employing SDS-PAGE immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 53: 12-21.