

Sesión Teórico-Práctica 3

Manipulación de muestras para su estudio al microscopio óptico¹

PARTE TEÓRICA²

- 3.1. Naturaleza y origen de las muestras.
- 3.2. Fijación y conservación de las muestras.
- 3.3. Disección o extracción de partes de una muestra.
- 3.4. Tinción de las muestras.
- 3.5. Inclusión y montaje de la muestras.

Introducción

La preparación, o manipulación, adecuada de las muestras es fundamental para llevar a cabo su correcto estudio microscópico. Una deficiente preparación de la muestra puede llevarnos a su incorrecta visualización y, por tanto, a un mal estudio e interpretación, que ni el mejor de los instrumentos microscópicos nos podría solucionar. Las técnicas para la manipulación y la preparación de las muestras son muy numerosas y cada una está orientada a conseguir unos resultados concretos; pero el tipo de muestra y lo que queramos ver en ella también es determinante en la elección de una técnica u otra. Los procedimientos para la preparación de muestras se pueden dividir en diferentes fases, o pasos técnicos, aunque, dependiendo del tipo de muestra, no todos son necesarios. Estos pasos se pueden englobar en: fijación, conservación, disección o extracción de partes, tinción, inclusión, y montaje.

Naturaleza y origen de las muestras.

Conocer el origen y la naturaleza de la muestra es esencial para elegir el procedimiento técnico a seguir en su manipulación para el estudio microscópico. Básicamente, las muestras pueden tener dos orígenes: biológico e inerte. Cada uno de estos orígenes puede dividirse a su vez, dando lugar a numerosas subcategorías. La mayor parte de las técnicas para la preparación de muestras para su estudio al microscopio óptico se han desarrollado sobre muestras de origen biológico. Las muestras inertes, o inorgánicas de

¹ Este documento está sujeto a una licencia Creative Commons



² La procedencia y autoría de las imágenes y esquemas utilizados se encuentra al final del texto

origen no biológico, suelen presentar más dificultades para su estudio con este tipo de microscopía, aunque con una preparación específica el análisis puede ser totalmente satisfactorio. Debido a la naturaleza del haz luminoso usado en la microscopía óptica, los materiales opacos, o relativamente opacos, no suelen ser fácilmente observables con fuentes de luz diascópica (luz transmitida), a no ser que, o bien se utilicen instrumentos ópticos especialmente diseñados, o bien las muestras tengan pequeño tamaño o se hayan conseguido cortar en láminas muy finas. Un ejemplo de este último caso lo encontramos en el estudio de muestras geológicas, para las que existen tipos de microscopio específicos, denominados petrográficos (materiales transparentes o semitransparentes) y metalográficos o metalogénicos (materiales opacos), que combinan una iluminación diáscopica y/o episcópica (luz incidente) con la polarización del haz luminoso.

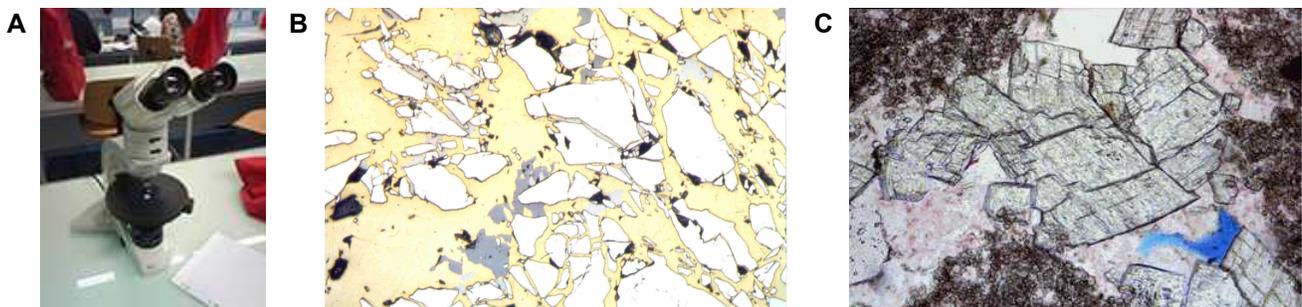


Lámina 1. A.- Aspecto de un microscopio petrográfico; B y C.- Imagen al microscopio petrográfico de una lámina de pirita, calcopirita y esfalerita obtenida por episcopía; C.- Imagen al microscopio petrográfico de una lámina de dolomita obtenida por diascopía

Fijación y conservación de las muestras

La fijación y conservación normalmente se aplica a muestras de origen biológico, aunque algunas inertes también necesitan ser conservadas en condiciones adecuadas. Ambos procesos, fijación y conservación, se pueden llevar a cabo en pasos distintos o de una sola vez. La elección de un fijador está relacionada con la procedencia de la muestra biológica y el tipo de estudio que se quiera realizar. Por ejemplo, en el estudio de la morfología externa de organismos con una cutícula resistente, como es el caso de los artrópodos, el fijador más utilizado es el etanol. De hecho, este reactivo es el que se utiliza normalmente en la fijación y conservación de muestras entomológicas de origen forense. En cambio, en los estudios morfológicos de organismos de cuerpo blando, como es el caso de

numerosos invertebrados, o en los estudios histológicos y organográficos la fijación más frecuente se suele realizar con reactivos aldehídicos, aunque su conservación posterior generalmente es en etanol. los reactivos fijadores aldehídicos pueden ser simples, como el formaldehído, el glutaraldehído o el paraformaldehído, o compuestos, es decir mezclas de distintos reactivos aldehídicos (Karnovsky o el McDowell) o que incorporar algún coadyuvante, como los ácidos acético y pícrico del Bouin. Los reactivos utilizados para fijar o conservar son muy numerosos, existen tantos como necesidades, por lo que sería una tarea ardua dar un listado completo.

Finalmente, la congelación es también un método de fijación en muestras de origen biológicos, existiendo un gran número de dispositivos específicos para su manipulación posterior.

Disección o extracción de partes de una muestra

Las muestras se pueden estudiar “in toto”, cuando por su tamaño se han de preparar en su totalidad, o parcialmente, cuando sólo es necesario extraer estructuras o hacer secciones finas de la misma. Por ejemplo, animales de pequeño tamaño, como los ácaros, se suelen estudiar “in toto”, mientras que otros de mayor tamaño es necesario extraer algunas partes esqueléticas para su examen. Por otro lado, en el estudio de tejidos es necesario para poder examinar las muestras realizar cortes, ya que de otra forma sería imposible su análisis. Los dispositivos que permiten cortar adecuadamente este tipo de muestras se denominan microtomos. El grosor de los cortes para el estudio de tejidos es variable y está en función de la técnica de microscopía que se vaya a utilizar posteriormente.

Inclusión y montaje de la muestras

Las muestras que se van a estudiar en secciones deben ser incluidas previamente, para facilitar que puedan ser cortadas. La inclusión consiste simplemente en embeber la muestra en una sustancia que se endurece posteriormente formando un cuerpo, de manera que la muestra se pueda manipular y cortar fácilmente. Actualmente, el material utilizado en las inclusiones es también muy amplio, aunque lo más normal es utilizar la parafina, para secciones no demasiado finas que van a ser estudiadas al microscopio óptico, o resinas

sintéticas, para obtener secciones más finas destinadas al estudio microscópico tanto óptico como electrónico. Algunas materiales inertes, como las fibras textiles, también tienen que ser incluidas cuando quieren estudiarse en secciones.

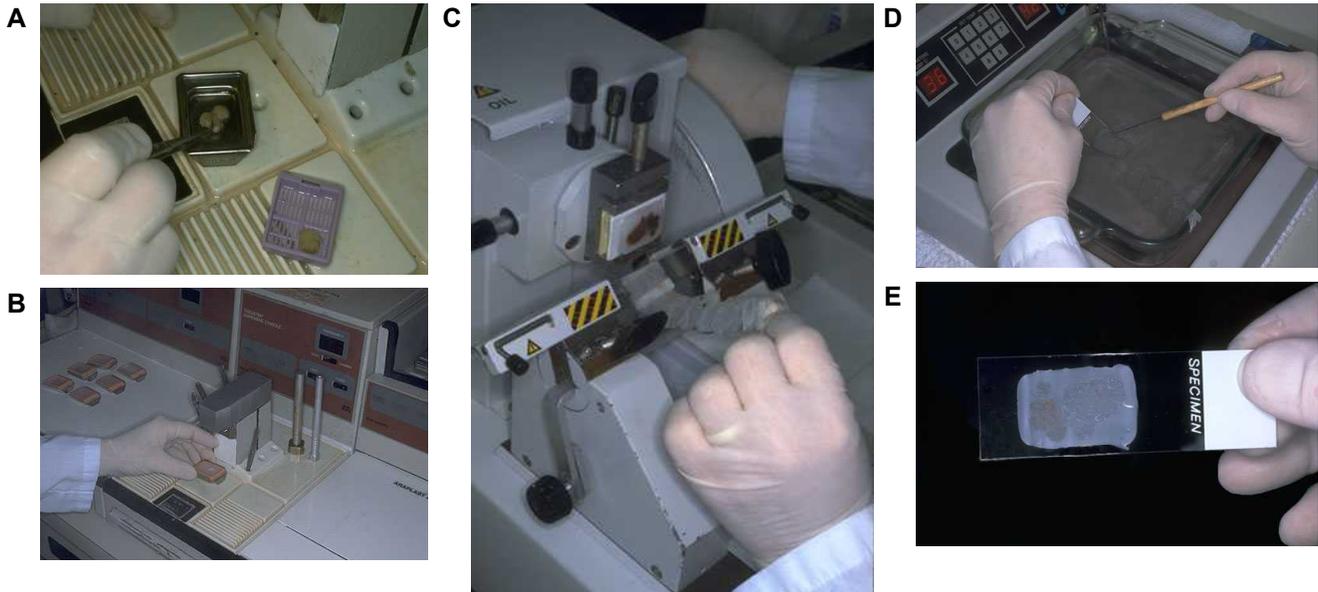


Lámina 2. Proceso de inclusión en parafina. A.- Disposición de la muestra en un molde; B.- Rellenado del molde con parafina para hacer un bloque; C.- Cortado del bloque en un microtomo, donde se observa la obtención de secciones seriadas; D.- Captura de las secciones que están depositadas en un baño de agua tibia; E.- Disposición de la sección capturada sobre un portaobjeto.

Tanto las secciones, como las muestras completas o despiezadas, para ser estudiadas al microscopio óptico deben disponerse sobre una pieza de cristal, o portaobjeto, y ser cubierta por otra pieza de cristal, o cubreobjeto, generalmente más fino. Para que la muestra quede bien sujeta y preservada es necesario embeberla en un medio de montaje, permitiendo, por otro lado, disminuir el fenómeno refractivo de la luz al atravesar la muestra. Las secciones obtenidas de los bloques de parafina se les ha de eliminar la parafina para su montaje final. Los medios de montaje puede ser hidrofílicos (miscibles en agua) o hidrofóbicos (no miscibles en agua), siendo las muestras montadas con este último tipo mucho más duraderas; pero tienen la desventaja que la muestra se ha de deshidratar. Medios de montaje también hay muchos, pudiendo destacar el Hoyer como hidrofílico y el Bálsamo de Canadá como hidrofóbico, aunque actualmente hay muchas resinas sintéticas que se asemejan bastante a este último (DPX, por ejemplo). Aparte de preservar la muestra,

el medio de montaje también debe tener un buen índice de refracción, no dar color a la muestra y no retraerse con el tiempo.

Tinción de las muestras

Las muestras se pueden estudiar directamente al microscopio una vez montadas, aunque en numerosas ocasiones es necesario contrastarlas. Para ello se pueden utilizar las técnicas indicadas en el capítulo anterior, o utilizar colorantes que nos permitan una buena diferenciación de los elementos que constituyen la muestra. Algunas muestras, como organismos que se quieren mantener vivos o las piezas esqueléticas de insectos que normalmente ya se encuentran suficientemente pigmentadas, no son necesarias teñirlas, a no ser que se quiera poner de relieve algún elemento que por si solo no se encuentre suficientemente contrastado. En cambio, los tejidos si deben ser teñidos para un mejor estudio. Tinciones hay de muchos tipos y, al igual que los fijadores, sería una labor interminable listar toda las posibilidades y para que se utilizan. Algunas tinciones son muy específicas, y sólo son utilizadas para poner de manifiesto algún tipo de estructura concreta, mientras otras son más generales. Así podemos citar tinciones simples de un solo colorante, como el azul de toluidina o multiples de dos colorantes, como la hematoxilina-eosina, o tres, como el tricrómico de mallory, que aprovechan las particularidades físicas y químicas de los colorantes para hacer un teñido diferencial de determinadas estructuras en una misma muestra, permitiendo así su fácil reconocimiento al microscopio óptico. Las tinciones también se consideran a veces como rutinarias, es decir las que se realizan de forma habitual tras la preparación y corte de la muestra (el azul de toluidina en semifinos de muestras preparadas al TEM, o la hematoxilina-eosina en cortes de bloques de parafina), o específicas, cuando se busca el contraste de algún tipo de estructura concreta.

En algunas muestras es necesario realizar el efecto contrario a la tinción, es decir una despigmentación y, en ocasiones, una eliminación de materia orgánica. Numerosos insectos deben ser aclarados utilizando bases o ácidos, como la sosa o el ácido láctico, para eliminar la materia orgánica o despigmentar ciertas partes de la cutícula.

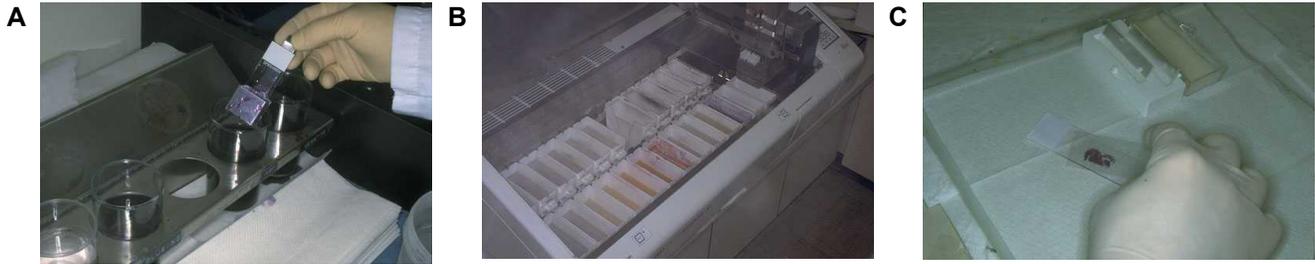


Lámina 3. Proceso de tinción y montaje de la muestra. A.- Teñido manual de la muestra; B.- Teñido automático de la muestra; C.- Colocación del cubreobjeto.

Figura 2.- Resumen de los pasos que se siguen para incluir una muestra en parafina

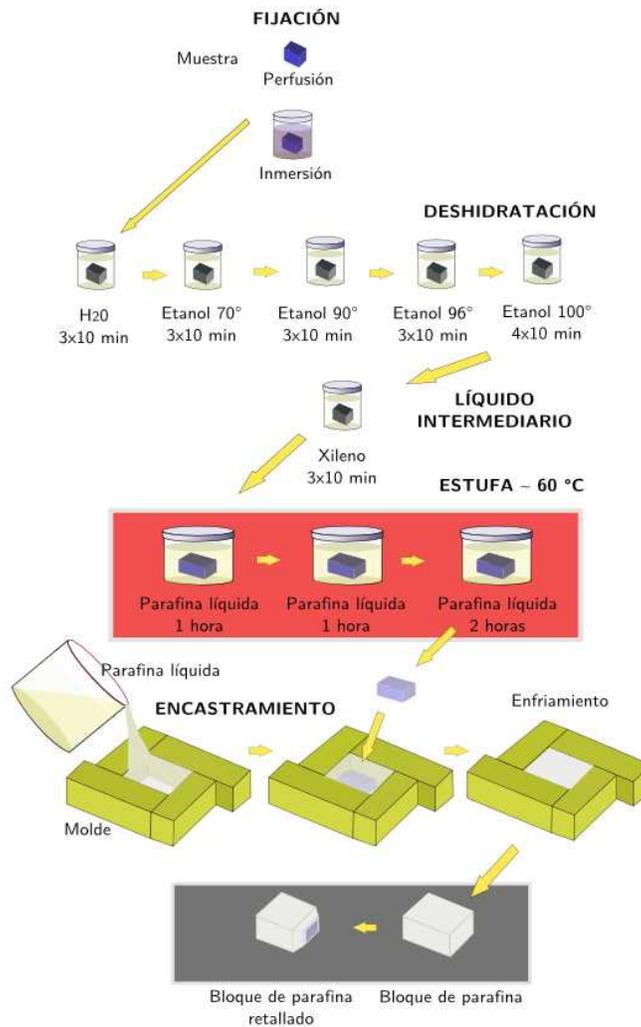
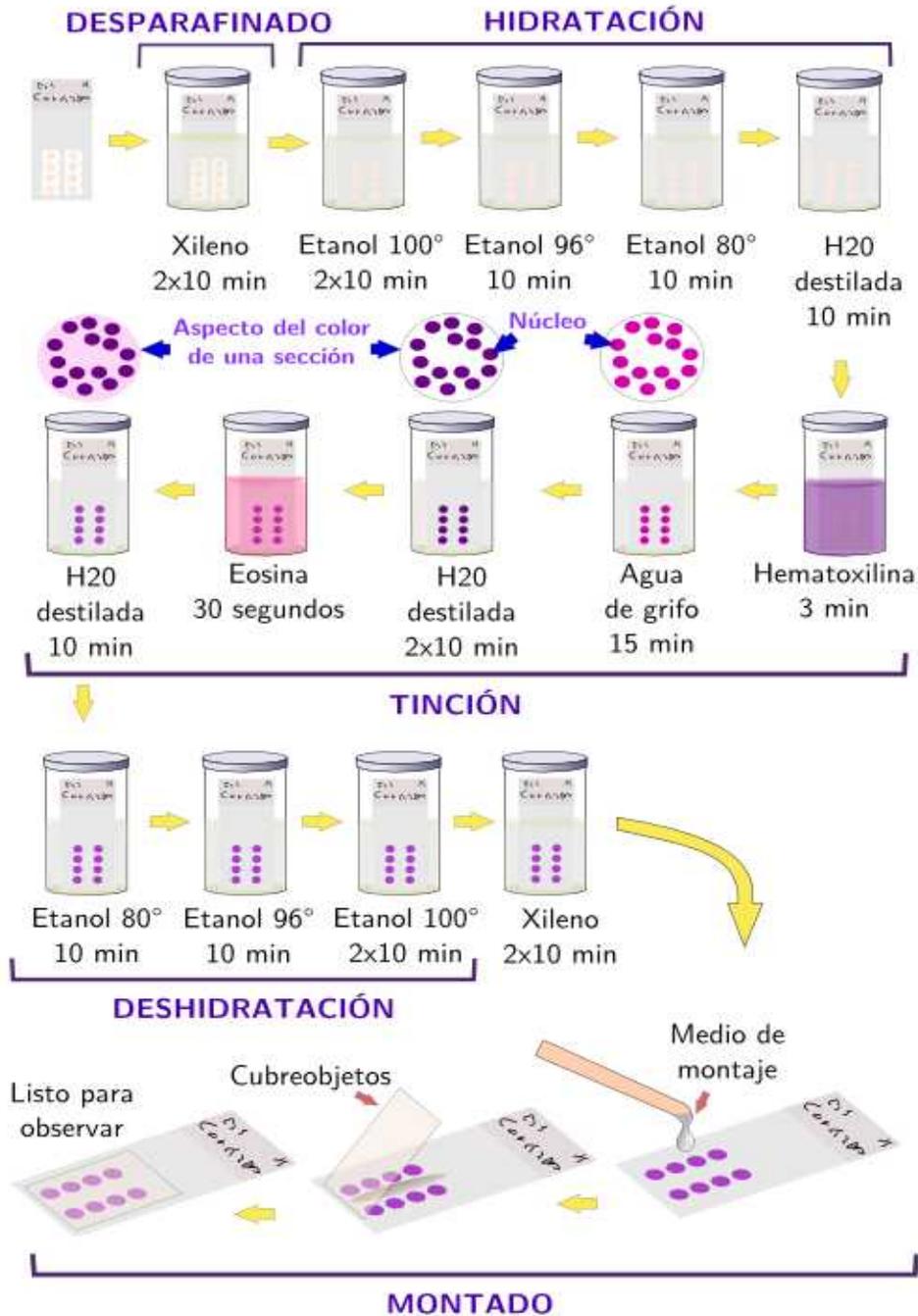


Figura 2.- Resumen de los pasos que se siguen para teñir un corte procedente de un bloque de parafina con la tinción de rutina de hematoxilina-eosina



Fuentes de información

1. Locquin, M. y Langeron, M. *Manual de microscopía*. Editorial Labor, S.A., Barcelona, 1985.
2. [Molist, P., Pombal, M.A. y Megías, M. Atlas de Histología Vegetal y Animal: Técnicas histológicas \(on line\). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Universidad de Vigo](#)
3. Paniagua, R., Nistal, M. Sesma, P., Álvarez-Uría, M. y Fraile, B. *Citología e histología vegetal y animal. Biología de las células y tejidos animales y vegetales*. McGraw-Hill-Interamericana de España, Madrid, 1993
4. [The Internet Pathology Laboratory for Medical Education. Mercer University School of Medicine. The University of Utah](#)
5. [Unidad de Histología. Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad Autónoma de Barcelona](#)
6. [Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada](#)
7. [Departamento de Cristalografía y Mineralogía de la Universidad Complutense de Madrid](#)
8. [Molist, P., Pombal, MA. y Megías, M. 2009. Atlas de Histología Vegetal y Animal \(On line\). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Vigo.](#)

Créditos de las figuras

- El logo del encabezamiento proceden de la página web <http://ocw.um.es/>
- La figura A de la lámina 1 es de "jd" y ha sido obtenida de la página [Wikimedia Commons: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leica_petrographic_microscope.jpg](#).
- Las figuras B y C de la lámina 1 han sido obtenidas de J. Luque y J. Sierra, "*Prácticas de Mineralogía (no Silicatos)*", [Departamento de Cristalografía y Mineralogía](#) de la Universidad Complutense de Madrid. Las fotografías se encuentran en la dirección: http://www.ucm.es/info/crismine/Mine_nosilicat/Guion_visu.htm.
- Las figuras de las láminas 2 y 3 han sido obtenidas en su totalidad de la página web "[The Internet Pathology Laboratory for Medical Education](#)", Mercer University school of Medicine de la University of Utah. Las fotografías se encuentran en la dirección: <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/HISTOTCH/HISTOTCH.html>.
- Los esquemas de las Figuras 1 y 2 se han obtenido de Molist, P., Pombal, MA. y Megías, M. 2009. [Atlas de Histología Vegetal y Animal \(On line\)](#). Departamento de Biología Funcional y Ciencias de la Salud. Facultad de Vigo. Los esquemas se encuentran en las direcciones: <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/3-resina.php> y <http://webs.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/5-general.php>