

Este documento pertenece al INECC citar como:
INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico
en organismos acuáticos. México, p, 22.

Universidad Autónoma Metropolitana



Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos.

Guzmán-García, X., Ramírez-Romero, P. y López-Vite, S.

I. Ámbito de aplicación.

Este manual describe los procedimientos para el procesamiento de muestras de tejidos de organismos acuáticos, con el objetivo de analizar su estado de salud, para posteriormente relacionarlo con la presencia/ausencia de contaminantes orgánicos persistentes y bioacumulables de su entorno.

II. Principio del procedimiento.

Los organismos acuáticos como los peces y los crustáceos son considerados como buenos indicadores de la calidad del medio; su diversidad y abundancia pueden indicar que tan sano es un ambiente para las demás formas de vida. Contrariamente una elevada mortandad o un porcentaje alto de peces y crustáceos enfermos puede ser causado directa o indirectamente por la presencia de contaminación. Por lo anterior, los programas de monitoreo pueden utilizar la presencia/ausencia de alteraciones tisulares para determinar la salud de un ecosistema acuático y asociarlo a la presencia de contaminantes.

III. Materiales.

- Formalina amortiguada al 10%
- Acido nítrico al 5%
- Alcohol absoluto
- Alcohol 96° R.A
- Xilol R.A. (Xileno)
- Parafina para infiltrar e incluir punto de fusión 56-58°C
- Medio de montaje (Entellan)
- Aceite de inmersión
- Hematoxilina de Harris
- Eosina amarillenta
- Lápiz punta diamante
- Casete para inclusión con tapa
- Cuchillas desechables o estándar
- Moldes metálicos
- Juego de canastillas para tren de tinción
- Caja coplin de cristal con tapa
- Canastilla de acero inoxidable
- Porta y cubreobjetos
- Cajas para preparaciones
- Frascos con tapa de plástico/bolsas
- Alcoholímetro

IV. Equipo.

- Procesador de tejidos Leica modelo EG1140H o similar
- Incluido de tejidos
- Placa de enfriamiento Leica modelo EG1140C o similar
- Micrótopo Zeiss HM315 o similar
- Afilador de cuchillas
- Sistema de transferencia de tejidos (STT)
- Tren de tinción automatizado o manual
- Microscopio para el análisis histológico
- Cámara para la digitalización de imagen

V. Procedimiento.

Las siguientes consideraciones deben ser tomadas en cuenta para la toma y el seguimiento de los tejidos a analizar.

Se recomienda una serie de formatos para registros diarios de: preparación de soluciones, material y equipo a utilizar etc. El material de los envases de colecta debe ser químicamente inerte, fácil de lavar, resistente al calor y al congelamiento. La norma ISO 5667-16 recomienda considerar la duración del período de almacenamiento y la eficiencia de los modos de conservación.

Se deben considerar los formatos para el registro del lugar de colecta, de los parámetros fisicoquímicos así como la recepción y salida de muestras, información de referencia, resultados preliminares y finales con la firma del responsable.

Las muestras traídas del campo vendrán acompañadas de una forma de Cadena de Custodia, la cual fue llenada durante la toma de muestras en el campo. Estas formas incluyen una lista de las muestras, con su código de identificación y toda la información pertinente, así como el nombre(s) y firma(s) de la(s) persona(s) involucradas en la toma, preservación y transporte de las mismas.

En cuanto las muestras sean traídas al laboratorio, se debe verificar que se están recibiendo todas las muestras enlistadas en la forma de Cadena de Custodia, para asegurarse que todos los contenedores están presentes y evaluar la condición

Este documento pertenece al INECC citar como:
INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.

general de las muestras. El sitio en el que las muestras serán guardadas y todos los movimientos subsecuentes de las mismas deberán ser registrados en el formato.



Fig 1. Registros de datos de las muestras colectadas.

VI. Precauciones durante la toma de las muestras

Dependiendo del organismo y sus características morfológicas se debe aplicar una técnica de sedación o anestesia, fijación y conservación más adecuada para evitar la sensación de dolor y estrés.

Existen diferentes agentes o sustancias narcóticas, métodos físicos como el aturdimiento eléctrico, la hipotermia o por percusión, en la mayoría de los casos, la muerte sucede tan rápidamente que los cambios electro-microscópicos son inexistentes o minúsculos, sin embargo deberán respetarse las consideraciones éticas para el uso de organismos acuáticos (UAM, 2010). La guía de animales en experimentación (US Public Health Services, 1996) sugiere que “el investigador debe considerar que los procedimientos que causan dolor y estrés en los humanos, son los mismos que causan dolor y estrés en los animales”.

VII. Fijación de las muestras o cambio de fijador.

La fijación es el proceso mediante el cual los elementos constitutivos de las células, y por tanto de los tejidos, son fijados en su estado físico y parcialmente en su estado químico, lo cual permite resistir el tratamiento sucesivo con diversos reactivos sin que ocurra pérdida, distorsión o descomposición significativas. El objetivo es detener el proceso autolítico de las células y conservarlas, lo mejor posible, en el estado en que se encontraban durante la vida.

Existen diversos fijadores (apéndice 1), sus cualidades deben de ser consideradas, ya que la fijación de las muestras es el paso más importante para la obtención de buenos cortes histológicos. En términos generales se recomienda para tinciones de rutina, que las muestras deben haber sido fijadas con formalina al 10% (apéndice) por 24 h para evitar su deterioro y porque esta solución no endurece los tejidos. La formalina penetra 2 mm en 4 h y 10 mm en 24 h, por lo que se recomienda que para una buena fijación las muestras no excedan los 3 mm de espesor y que la muestra tenga la proporción adecuada de formol (5 a 1).

Una segunda opción es el uso del fijador de Davidson, el cual contiene ácido acético, sin embargo este causa descalcificación y cierta hinchazón de los tejidos y no debe ser usado si se pretende analizar la morfología de las células rojas de la sangre.

Los tejidos deben ser transferidos a etanol al 70% después de 12 a 24 h, previo lavado del exceso de fijador, ya que esto evita que los tejidos se endurezcan excesivamente y facilita su manejo.

Para estudios histológicos es necesario utilizar fijadores que conserven al máximo la estructura de la muestra que se pretende estudiar; dado que se trabajará con un alto poder de resolución.

VIII. Preparación de las muestras para su procesamiento.

Las muestras fijadas son transferidas utilizando pinzas de disección a los casetes, esto debe hacerse con mucho cuidado para no romper los tejidos. También se

Este documento pertenece al INECC citar como:
INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico
en organismos acuáticos. México, p, 22.

debe cuidar de no amontonar las muestras, estas deben quedar con buen espacio entre ellas como se muestra en la figura 2.



Fig 2. Preparación de los casetes

IX. Deshidratación e infiltración de los tejidos.

El objetivo de los siguientes pasos es proveer a los tejidos con una matriz que les de soporte durante el corte. Los tejidos son deshidratados con alcoholes de diferente concentración, y aclarados (se hacen translucidos) para su mejor observación bajo el microscopio una vez teñidos. Para la deshidratación, aclarado e infiltrado de los tejidos se utiliza un procesador de tejidos marca Leica modelo TP1020 o similar (Fig. 3).



Fig 3. Procesador de tejidos.

Las muestras se pasan por una serie de mezclas de alcohol/agua, para acabar solo en alcohol. Posteriormente se pasan por un aclarador, que es el Xileno o algún otro sustituto, para finalmente ser incluidos en parafina derretida. El colado de bloques se realiza en un centro de inclusión de Leica modelo EG1140H o similar acoplado a una placa de enfriamiento (Leica modelo EG1140C) para que la parafina solidifique (Fig. 4).

Para comprender la organización de un órgano o tejido, es necesario su estudio en diferentes planos de manera que se produzcan cortes longitudinales o transversales (anteroposterior, dorsalventral, oral-aboral ó radial). Antes de aplicar la parafina asegurarse de que las muestras están orientadas y posteriormente permitir que se endurezca la parafina (Fig. 4).

Este documento pertenece al INECC citar como:
INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico
en organismos acuáticos. México, p, 22.



Fig 4. Placa de enfriamiento y centro de inclusión

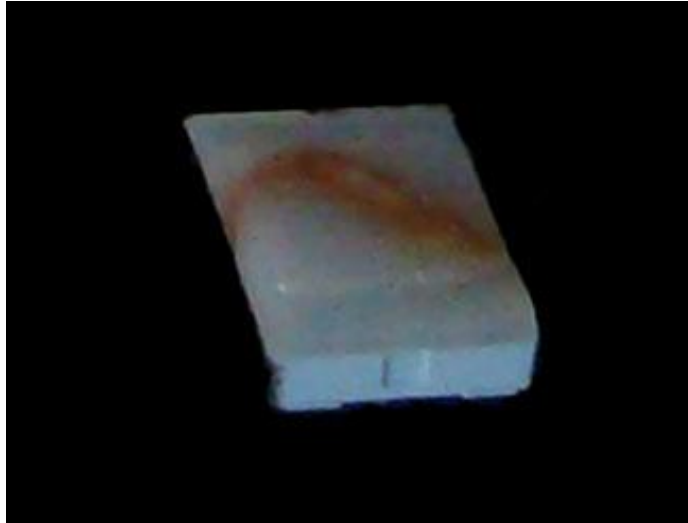


Fig 5. Muestras en parafina

X. Corte de los tejidos.

Una vez que los bloques de parafina se han endurecido, estos pueden ser cortados con un micrótopo (Fig. 5). El técnico debe asegurarse que la cuchilla este en buen estado y bien afilada antes de comenzar el proceso. Los tejidos deben ser **orientados** en el bloque respecto a la cuchilla del microtopo para no desgarrar los tejidos. Los cortes se realizan en series de 3, de 5 a 9 μm los cuales se observan como listones, que flotan sobre agua (Fig. 6).

Durante el corte también se deberán cuidar algunos aspectos técnicos (apéndice 4).

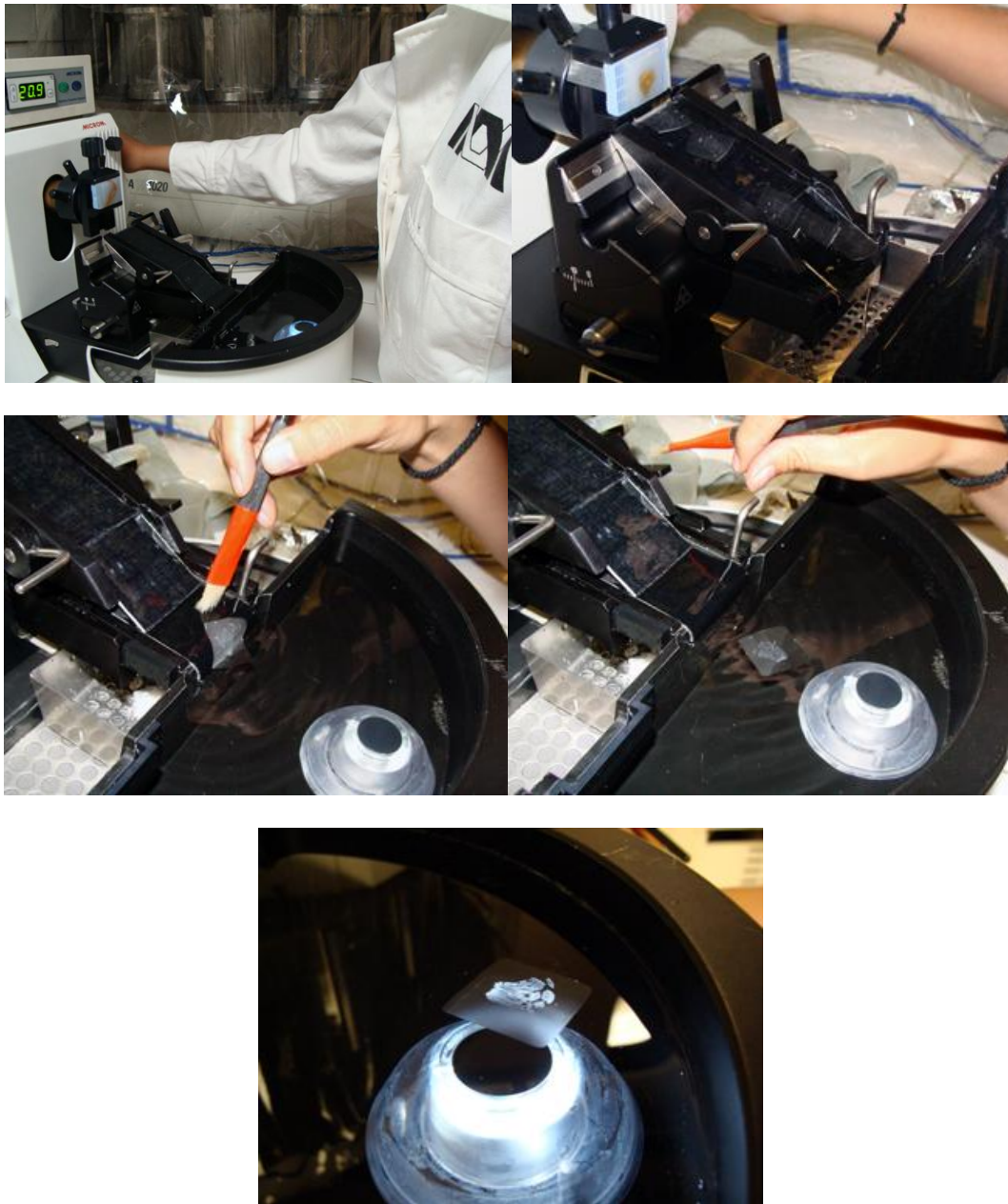


Fig 6. Uso de microtomo y sistema de transferencia de tejidos.

XI. Montaje, desparafinación, re-hidratación y teñido.

Los cortes obtenidos y que se encuentran en el baño de flotación o en el STT son levantados con ayuda de un portaobjetos (fig. 7) en el cual permanecerán por el resto del procedimiento. El corte deberá colocarse de manera centrada cuidando que el portaobjetos lo cubra adecuadamente, si el corte quedo mal orientado este se puede mover con ayuda de un pincel fino o de unas pinzas, teniendo cuidado de no dañarlo.

A continuación el tejido se somete a un proceso para quitar la parafina, rehidratar los tejidos y teñirlos (Fig. 8). La selección del tipo de tinción dependerá del tipo de estructura que se quiere observar.



Fig 7. Tejido en portaobjetos



Fig 8. Tren de tinción hematoxilina-eosina

La hematoxilina-eosina (H&E) es la tinción más común en histología y sirve para mostrar una variedad de componentes de los tejidos incluyendo el núcleo, las estructuras mitóticas, las mitocondrias, etc. (Fig. 9). Otra opción es la tinción Geimsa, la cual es muy útil para evidenciar bacterias y parásitos, aunque existen una gran variedad de colorantes, lo importante es conocer el fundamento de las reacciones (Fig. 10).

Con la técnica de coloración de rutina como es hematoxilina-eosina (H&E) el objetivo es identificar los componentes del tejido por sus reacciones a diversos colorantes. Relaciones generales entre células, tejidos y órganos son demostradas con la H&E, la cual generalmente se usa como base, ya que el 90% de los diagnósticos se hacen con ese método. La hematoxilina es un colorante natural el cual, al ser combinado con sales de aluminio y otras tienen propiedades excelentes para teñir el núcleo. De manera contraria la Eosina es el colorante que se emplea para teñir las estructuras citoplasmáticas, este colorante se puede usar en base acuosa o alcohólica.

La combinación de la hematoxilina con la eosina es una reacción de afinidad acida-base respectivamente. Es decir la hematoxilina es de naturaleza básica con afinidad nuclear y la eosina es de naturaleza acidófila con afinidad por el citoplasma (apéndice 5).

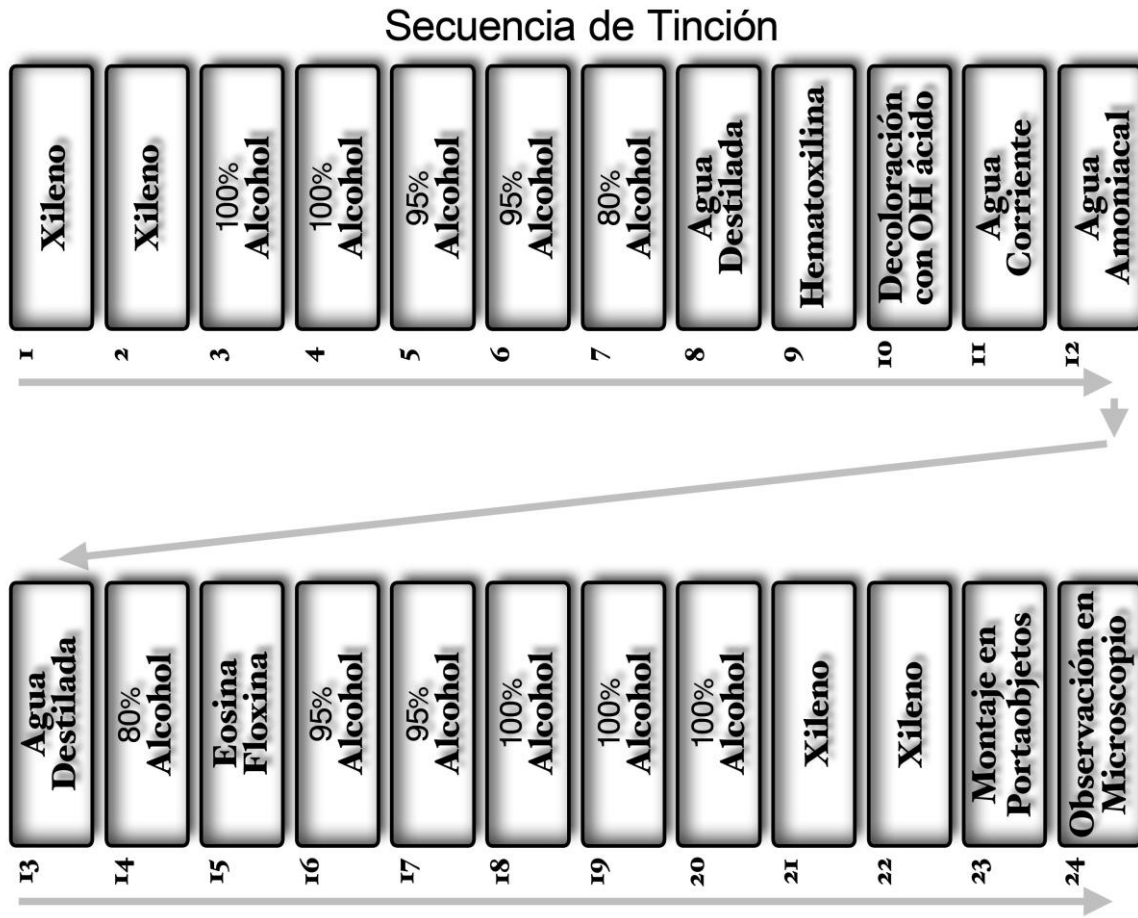


Fig 9. Secuencia de tinción con H&E.

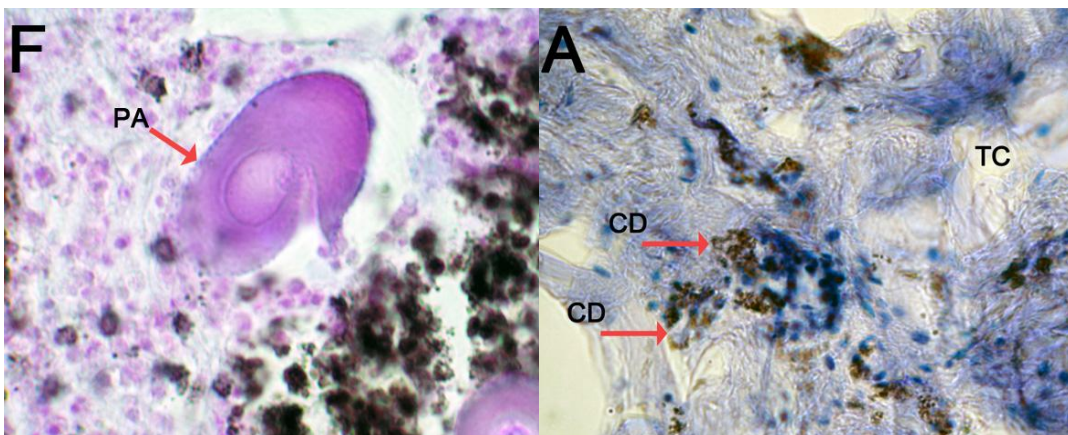


Fig 10. Ejemplo de contraste en la coloración.

Este documento pertenece al INECC citar como:

INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.

El último paso es cubrir el tejido ya teñido con un cubreobjetos para así poder conservar los tejidos procesados indefinidamente, para este paso se utiliza medio de montaje entellan o resina sintetica. Para facilitar el montaje se recomienda el usos de fondo blanco evitando la generación de burbujas dentro del tejido(Fig. 11).



Fig 11. Preparaciones permanentes para la observación al microscopio.

XII. Análisis Tisular

Algunas características de los organismos marinos, como la adaptación a condiciones ambientales diversas, tales como; altas concentraciones de sales, baja o alta temperatura, alta presión, baja disponibilidad de nutrientes, son posibles por la presencia de enzimas, que constituyen proteínas especializadas o procesos de adaptación bioquímica no presentes en el ambiente terrestre. La presencia de proteínas, lípidos, carotenoides y minerales en los organismos marinos representa un potencial para la extracción de suplementos alimenticios y fuentes de compuestos bioactivos. Los organismos marinos presentan diversidad bioquímica y al mismo tiempo presentan uniformidad tisular al reconocer en ellos los 4 tipos de tejidos básico; el tejido epitelial, conectivo, muscular y nervioso.

En los organismos acuáticos es común observar a lo largo de la escala filogenética la presencia de capas embriológicas especializadas que originan las

Este documento pertenece al INECC citar como:

INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.

capas ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas de tal manera que se originan los diferentes tejidos, órganos y sistemas.

Histológicamente los componentes básicos de los organismos es decir células (proteínas, grasas, carbohidratos y ácidos nucleicos), sustancia intercelular (como la colágena y elastina) así como los líquidos corporales (sangre, líquido tisular por ejemplo: hemolinfa en invertebrados) permiten evidenciar las similitudes entre los tejidos de vertebrados e invertebrados.

En términos generales podemos señalar que los organismos acuáticos se caracterizan por la presencia de estructuras que varían en complejidad pero en términos generales son las siguientes: revestimientos de epitelios que les permiten interactuar con el medio; estructuras musculares que funcionan para la locomoción y evasión de agentes estresores; sistema circulatorio abierto y cerrado; branquias y pulmones; sistema digestivo, sistema excretorio, placas y sistema nervioso así como sistema reproductivo.

El epitelio igual que en los vertebrados su principal función es de protección, secreción, sensación y transporte. Dependiendo de su estructura puede clasificarse en simple o estratificado. También es común observar microvellosidades que facilitan las superficies de absorción, así como la presencia de cilios que facilitan el movimiento.

El tejido conectivo se encuentra se observa en la dermis y es característica la presencia de fibras de colágena, fibroblastos células pigmentadas y células fagocíticas entre otras.

Existen diversos órganos que pueden ser extraídos aunque algunas veces son de función mixta, tal es el caso del hepatopáncreas y de la glándula digestiva. En algunas especies los órgano encargado de la regulación osmótica, hígado y otros órganos destino son fáciles de distinguir.

La presencia de placas y cordones nerviosos así como otros órganos mecano y quimiorreceptores se encuentran en diversas posiciones del organismos y son los que permiten las reacciones de dolor.

Es importante contar con material de referencia, Atlas histológicos y una secuencia de imágenes que permitan el análisis tisular, ya que en muchos de los casos no se cuenta con información sobre todo de invertebrados.

XIII. Problemas durante el procesado y análisis de las muestras

A continuación enlistamos algunos problemas comunes en el desarrollo de la técnica:

- Fijación no apropiada.
- evitar que los tejidos sean congelados antes de la fijación.
- muestra traumatizada.
- pigmentos del formol o tinción.
- destrucción de células.
- mala impregnación de parafina.
- mala rehidratación.
- dobleces en el corte.
- secciones muy gruesas.
- mal montaje o hidratación.

XIV. Histopatología

Los cambios en la estructura histológica de órganos y tejidos pueden determinar un diagnóstico. El diagnóstico histopatológico puede acoplarse con otros métodos como son los bacteriológicos, serológicos y toxicológicos. Es importante familiarizarse con los tejidos y órganos para poder establecer un parámetro de comparación entre organismos sanos y enfermos. La patogénesis de enfermedades y el desarrollo de lesiones son similares a través de las especies, si se reconoce los procesos inflamatorios, es posible apreciar los cambios asociados de estas enfermedades en otros tipos de animales.

XV. Análisis de imágenes.

Se realiza el análisis de las respuestas celulares y tisulares de los cortes teñidos con ayuda del microscopio acoplado a una cámara digital. Se observan los cortes para identificar las distintas estructuras y verificar si estas son normales o presentan problemas como: abscesos, adenomas, carcinomas, cirrosis, concreciones, edemas, embolias, enfisemas, fibrosis, furúnculos, deformaciones,

granulomas, emangiomas, hiperemia, hiperplasia, atrofas, inflamaciones, lesiones, lipomas, melanomas, meningitis, micosis, necrosis, neoplasmas, osteomas, papilomas, sarcomas, tumores, úlceras, hemorragias o alguna otra patología (apéndice 6).

Para las imágenes se deberá procurar el mantener un pixelaje de por lo menos 2560 X 1920 o 5 Megapíxeles de resolución en un lente de 28mm (abstenerse del uso de las cámaras de teléfonos celulares).

Para microfotografía a microscopio óptico son necesarios los siguientes pasos:

1. Realizar calibración e iluminación Köhler
2. Es necesario calibrar el proceso mediante una fotografía a un portaobjetos graduado con la guía de un objetivo con reglilla, repetir el proceso a los aumentos a utilizarse.
3. Una vez fijo y perfectamente enfocado el campo a capturar, aumentar al máximo la intensidad de luz del microscopio; esto con el fin de capturar tonos y figuras correctamente, evitar el mal contraste y mantener la obturación con una exposición corta (evitar la sobrexposición).
4. Se deberá realizar las fotografías siempre en un aumento (*zoom*) óptico de 3X óptico (no utilizar *zoom* digital); esto con el fin de excluir la sombra del ocular sobre el campo de la fotografía.

Para fotografías de organismos en macro deberán de ser tomados en cuenta los siguientes pasos:

1. Utilizar organismos “frescos”; es altamente recomendado el uso de organismos recién colectados sin fijación, esto con el fin de mantener lo más posible las coloraciones y aspecto del organismo. De utilizarse un organismo previamente conservado, éste deberá ser secado del fijador y humedecido muy ligeramente a fin de evitar el reflejo o resequedad. De ser necesario utilizar agujas que mantengan la posición del organismo.
2. Utilizar un fondo claro y uniforme.

3. Las fotografías generales del organismo deberán presentarlo completo de perfil con orientación de la parte cefálica hacia la izquierda. En el caso de bivalvos la concha deberá ser presentada con el umbo hacia abajo y la valva derecha (plana) arriba. En el caso de los invertebrados orientar a lo largo del eje anteroposterior.
4. Es recomendable el uso de una “caja o cuarto fotográfico” y así evitar sombras. De no ser posible, la fotografía deberá tomarse de con un ángulo diagonal a fin de evitar reflejos de la base y disminuir las sombras, es necesario utilizar un soporte que mantenga a los organismos en las posiciones mencionadas en el punto anterior.
5. Dentro de la fotografía incluir la hoja de registro y una regla o guía de una longitud conocida que permita establecer la guía digital posteriormente.

Las fotografías deberán ser guardadas en formatos de alta calidad y extensiones PNG, TIFF, RAW o JPG, cuidando que estas mantengan el formato mínimo antes mencionado y 72 DPI.

Los nombres de los archivos deberán de contener:

Organismo – Región – Fecha – Autor – Conteo

Ej. ostion-celestun-06112010-xochitl-043.jpg

Nota: No utilizar mayúsculas, puntos, acentos ni “ñ”. Utilizar guión medio.

Se recomienda la mejora y edición digital en Photoshop o programas especializados. Mantener siempre una copia del archivo original.

Se deberá hacer un registro de la información e imágenes en un formato digital que cubra los aspectos más relevantes del diagnóstico tisular.

XVI. Análisis estadístico.

En función de los resultados obtenidos se determina el tipo de método estadístico (paramétrico o no paramétrico) que se debe aplicar, para establecer la prevalencia y el porcentaje de lesiones (Zar, 1996).

XVII. Bibliografía.

Abbas, M. A., Lichtman, A., Pober, J. 2000. ***Inmunología celular y molecular***. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid España. 552 p.

Bancroft, J. y Gamble, M. 2002. ***Theory and practice of histological techniques***. Churchill livingstone. N.Y. USA. 796 p.

Di Giulio, R. T. y Hinton, D. E. ***The Toxicology of Fishes***. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Ratón, USA. 1071.

Estrada, F. E., Peralta, Z. L. y Manzano, P. R. 1982. ***Manual de Técnicas Histológicas***. AGT editor, S.A. 140 p.

Evans, G.O. 2009. ***Animal hematotoxicology a practical guide for toxicologists and biomedical researchers***. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Ratón, USA. 205.

Harrison, W. F. y Fu-Shiang Chia. 1994. ***Microscopic anatomy of invertebrates***. Vol. 14. Echinodermata. Wiles-Liss John Wiley and sons, inc, publication. USA. 520.

Mumford S., Heidel, J., Smith, C., Morrison J., Mac Connell, B., Blazer, V. 2007. ***Fish Histology and Histopathology***. U.S. Fish and Wildlife Service. NCTC. 357 pp.

Nagabhushanam, R. Diwan, A.D. Zahuranec, B.J. and R. Sarojini. 2004. ***Biotechnology of aquatic animals***. Science Publishers, Inc. India.182. ISBN 1-57808-321-4.

Noga, E. J. 2000. ***Fish Disease diagnosis and treatment***. Blackwell Publishing. Malasia. 367.

Prophet, E., Mills, B. Arrigton, J. y Sobin, L. ***Métodos Histotecnológicos***. 1995. Métodos Histotecnológicos de AFIP. 279 p.

Prophet, E., Mills, B. Arrigton, J. y Sobin, L. ***Métodos Histotecnológicos***. 1995. Métodos Histotecnológicos de AFIP. 279 p.

Este documento pertenece al INECC citar como:

INECC, (2009). Manual de procedimientos estándares para el análisis histológico e histopatológico en organismos acuáticos. México, p, 22.

Ross H.M. y Pawlina W. 2006. ***Histology a Text and Atlas, With Correlated cell and molecular Biology***. Ed. Lippineutt Williams and Wilkins, 5ta. Edición, 906 p.

Ross, L. G. Y Ross B. 2008. ***Anaesthetic and sedative techniques for Aquatic Animals***. Third Edition. New Delhi, India. 222. ISBN 978-1-4051-4938-9.

Takashima F. y Hibiya T. 1995. ***Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features***. 2da. Edición, Edit. Kodansha Ltd., Tokyo Japan, pp. 195.