

Entrenamiento en el uso del microscopio de luz

- Cada estudiante dispondrá de un microscopio de luz o fotónico para trabajar durante todo el práctico.
- Enfocar y observar, a distintos aumentos, preparados histológicos que le proporcionará el docente siguiendo estrictamente los pasos descritos en el apéndice 1 de la Guía del Estudiante 1 que se transcriben aquí:

¡ATENCIÓN!

Use los tornillos macro y micrométricos moviéndolos lentamente.

¡La rotura de cubreobjetos puede ser extremadamente perjudicial para la lente frontal del objetivo, pudiendo dañarla en forma irrecuperable!

Si desplaza un microscopio hágalo manteniendo siempre el instrumento en posición vertical, tomándolo del brazo y levantándolo, NUNCA lo arrastre sobre una superficie para moverlo (la vibración provocada afloja y desajusta las lentes).

- 1 - Coloque el preparado en la platina, verificando que el cubreobjetos quede hacia arriba y que el material quede centrado en el orificio de la platina.
 - 2 - Encienda la fuente de luz y ajuste el voltaje de la lámpara.
 - 3 - Abra el diafragma iris del condensador al máximo.
 - 4 - Suba el condensador hasta la posición máxima.
 - 5 - Verifique que el material en el preparado está iluminado. En los microscopios que no tienen luz incorporada: mueva el espejo, controlando desde el exterior, hasta que la luz incida sobre el material en la platina.
 - 6 - Coloque el objetivo de menor aumento en el eje óptico del instrumento.
 - 7 - Observando desde el exterior y utilizando el macrométrico, acerque el objeto hasta el tope superior de la platina.
 - 8 - Observando por el ocular baje la platina lentamente con el macrométrico hasta obtener una imagen nítida. Corrija el foco con el micrométrico.
 - 9 - Corrija la iluminación, bajando el condensador y cerrando el diafragma iris hasta obtener el máximo de contraste en un campo uniformemente iluminado.
 - 10 - Para pasar a un objetivo de mayor aumento, verifique primero si los objetivos son parafocales.
 - a) Objetivos parafocales: Coloque el objetivo de mayor aumento en el eje óptico. Corrija el foco con el micrométrico.
 - b) Objetivo no parafocal: Baje la platina con el macrométrico. Coloque el objetivo de mayor aumento en el eje óptico. Observando desde el exterior acerque el objetivo hasta un milímetro del cubreobjeto. Observe por el ocular y repita el paso 8.
 - 11 - Corrija la iluminación, subiendo el condensador y modificando el diafragma iris hasta obtener condiciones de iluminación como en el paso 9.
 - 12 - Para pasar a otros aumentos superiores repita los pasos 10 y 11.
- Para acercar el objetivo al cubreobjetos tenga en cuenta la distancia de trabajo de ese objetivo, (los valores de esa distancia están en la tabla del apéndice de este protocolo).

Al terminar de trabajar, verifique:

- que la platina esté seca y bájela hasta el tope.
- que no queda un preparado en ella.
- que la intensidad de la luz fue bajada al mínimo y luego apague la fuente de luz.
- que el tubo queda en posición vertical en los microscopios de ángulo vertical.
- que la lente objetiva que quedó en posición sea la de menor aumento.
- que el tornillo de ajuste del cabezal de los oculares esté ajustado y los oculares firmes.

Preparaciones histológicas de células diferenciadas:

Enfoque en el microscopio las preparaciones histológicas y utilice las descripciones que siguen como guía para identificar en los cortes las estructuras que observa.

Células musculares

Observará preparaciones histológicas teñidas con hematoxilina y eosina, hematoxilina férrica o hematoxilina fosfotúngstica. La tinción con hematoxilina férrica tiñe el componente proteico de las muestras, resaltando características del citoplasma de las células musculares.

Utilice las descripciones que siguen como guía para identificar las células musculares.

a) *Observe preparados de tejido muscular estriado esquelético- tinción de hematoxilina y eosina o hematoxilina férrica*

En ellos se pueden distinguir:

- **fibras musculares estriadas esqueléticas**, células largas, cilíndricas y con citoplasma intensamente eosinófilo o teñido con hematoxilina férrica. En las células se distinguen además:
 - **núcleos**
 - **estriaciones longitudinales**, debidas a la disposición paralela de las miofibrillas, observables en los cortes longitudinales de las células;
 - **estriaciones transversales**, a causa del alineamiento de las estriaciones de cada miofibrilla, también observables en los cortes longitudinales de las células;
 - **elementos del tejido conjuntivo**, entre los haces de fibras musculares.

Músculo estriado esquelético

Aumento:

Tinción del preparado:

Identifique:

- fibras musculares cortadas en sentido longitudinal
- fibras musculares cortadas en sentido transversal
- núcleos
- estriaciones longitudinales
- estriaciones transversales

b) Observe los preparados de tejido muscular estriado cardíaco- hematoxilina y eosina, hematoxilina férrica o hematoxilina fosfotúngstica

En los mismos podrá reconocer:

- **células musculares estriadas cardíacas**, de citoplasma eosinófilo o teñido con hematoxilina férrica o hematoxilina fosfotúngstica, las cuales se encuentran unidas por sus extremos.

En ellas reconozca:

- **estriaciones longitudinales**, en los cortes longitudinales.
- **estriaciones transversales**, en los cortes longitudinales.
- **núcleo**.
- **trazos escaleriformes**, en la zona de unión de una célula con otra.

Músculo estriado cardíaco

Aumento:

Tinción del preparado:

Identifique:

- fibras musculares cortadas en sentido:
 - longitudinal
 - transversal
- núcleo
- estriaciones longitudinales
- estriaciones transversales
- trazos escaleriformes

c) *Tejido muscular liso*

Los haces de fibras del músculo liso aparecen cortados en forma transversal, longitudinal y oblicua. Las células del músculo liso son largas, tienen forma de huso, y poseen un núcleo alargado, en posición central. Al igual que en las otras células musculares, el citoplasma aparece intensamente eosinófilo si se realiza la tinción de hematoxilina y eosina.

Observe que, debido a su forma ahusada, las células del músculo liso cortadas transversalmente parecen tener gran diversidad de diámetros. El citoplasma contiene tipos específicos de filamentos de actina y miosina alineados a lo largo del eje longitudinal pero no con el arreglo regular de bandas observado en el músculo esquelético y cardíaco.

Músculo liso

Aumento:

Tinción del preparado:

Identifique:

- fibras musculares cortadas en sentido longitudinal
- fibras musculares cortadas en sentido

- transversal
- núcleos

Células nerviosas

a) Corte de corteza cerebral - tinción de Golgi

Mediante la técnica de tinción de Golgi, las neuronas y las células gliales se impregnan totalmente con sales de plata, quedando opacas a la luz, y solo se puede distinguir su forma externa. A diferencia de los métodos previamente analizados, éste tiñe solo entre un 1 y un 5% de las células, por lo que es posible observar las prolongaciones de células individuales.

A menor aumento distinga:

- **sustancia gris**, más externa, en donde se sitúan los cuerpos de las neuronas;
- **sustancia blanca**, más interna, donde se sitúan axones mielinizados.

A mayor aumento se pueden observar:

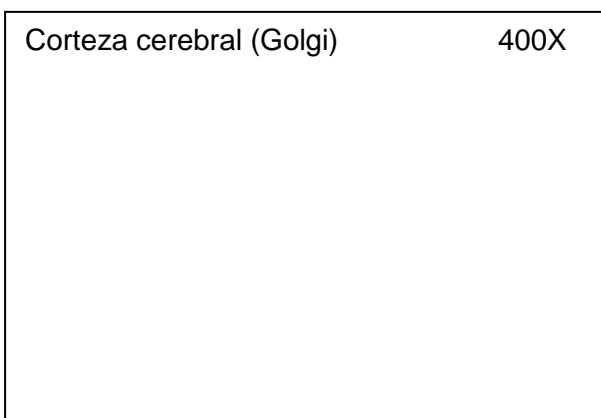
- **neuronas piramidales**, se encuentran en la sustancia gris. Son células de gran tamaño, cuyo soma suele presentar una forma triangular en los cortes.

En ellas se observan:

- **dendrita apical**, saliendo desde uno de sus vértices hacia la superficie de la corteza, ramificada profusamente;
- **dendritas basales**, dirigidas hacia el interior de la corteza;
- **espinas dendríticas**, pequeñas proyecciones especializadas en recibir contactos sinápticos, que se encuentran en gran cantidad.

- **neuroglía:**

- **astrocitos protoplasmáticos**, se encuentran en la sustancia gris, presentan un gran número de prolongaciones citoplasmáticas ramificadas, que le dan aspecto vellosos.
- **astrocitos fibrosos**, se encuentran en la sustancia blanca, y sus prolongaciones son más largas y menos ramificadas.
- **oligodendrocitos**, predominantemente en la sustancia blanca; son células pequeñas, con prolongaciones escasas y delgadas.



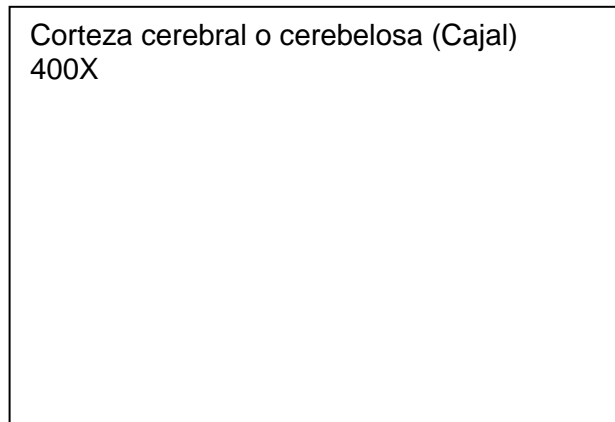
Observe e identifique:

- neuronas piramidales
- dendrita apical
- dendritas basales
- espinas dendríticas
- astrocitos fibrosos
- astrocitos protoplasmáticos
- sustancia gris
- sustancia blanca.

b) Corte de corteza cerebral o cerebelosa – técnica de Cajal

La técnica de Cajal pone en evidencia las neurofibrillas (haces de neurofilamentos presentes en el soma y las prolongaciones de las neuronas).

Observe la disposición de las neurofibrillas en el soma de las células piramidales o de Purkinje, y cómo se continúan hacia las dendritas. A bajo aumento identifique la disposición de la sustancia gris y sustancia blanca en la corteza cerebral o cerebelosa.



Identifique:

- neuronas piramidales (*si es corteza cerebral*)
- neuronas de Purkinje (*si es corteza cerebelosa*)
- pericarion
- núcleo
- prolongaciones neuronales
- neurofibrillas

c) Corte longitudinal de nervio – Impregnación con osmio o hematoxilina férrica

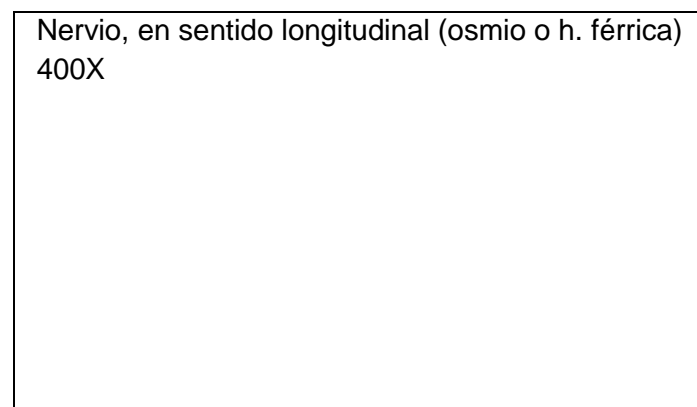
En el sistema nervioso periférico, los axones, junto con células neurogliales que los rodean, forman las fibras nerviosas. Éstas se asocian en fascículos para formar los nervios. Los axones pueden hallarse recubiertos de una vaina de mielina, formada por enrollamientos de la membrana plasmática de las células de Schwann.

Es posible observar la vaina de mielina con el microscopio fotónico:

- La tinción con osmio, tiene afinidad por los fosfolípidos de membrana, coloreando las vainas de mielina de color negro.

-La tinción con hematoxilina férrica tiñe el componente proteico de las muestras, resaltando, las vainas de mielina y los núcleos de las células de Schwann de color gris-azul.

En estos preparados se evidencian los nodos de Ranvier, regiones regularmente espaciadas en donde se interrumpe la vaina de mielina. Cada región internodal representa la porción de la vaina que es formada por una célula de Schwann.



Identifique:

- vaina de mielina
- nodos de Ranvier

e) Corte transversal de médula espinal – tinción de Nissl

En la tinción de Nissl se utiliza un colorante catiónico, como el azul de toluidina.

Observe, a bajo aumento, la forma ovalada del corte transversal de médula y determine la posición del eje dorso-ventral, guiándose por la presencia del surco ventral. También a bajo aumento, observe la disposición central de la sustancia gris, en forma de H. Es allí donde se encuentran los somas neuronales.

A mayor aumento, localice las grandes motoneuronas espinales, ubicadas en las astas ventrales de la sustancia gris. Estas neuronas multipolares se caracterizan por presentar una forma triangular o alargada en los cortes, debido a la deformación del soma causada por el nacimiento de las dendritas. El pericarion aparece intensamente teñido y el núcleo es grande y eucromático, a la vez que presenta uno o más nucléolos visibles. Identifique, además, otros núcleos en la sustancia gris. En la sustancia blanca, observe los núcleos de las células gliales y los axones mielinizados en corte transversal.

Médula espinal (Nissl)

400X

Observe las astas ventrales y en ellas identifique:

- motoneurona
 - núcleo
 - nucléolo(s)
 - pericarion
 - cuerpos de Nissl
- otros núcleos