

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS HISTOQUÍMICAS PARA LA VISUALIZACIÓN DE LOS TIPOS CELULARES DEL PÁNCREAS ENDOCRINO

B. IGLESIAS ROJAS & L. VILAR GOCE

sethby_asjor@hotmail.com, lucyavilar@hotmail.es

Alumnas en prácticas Ciclo Superior de Anatomía Patológica e Citología (2009/10)

Universidade de Vigo

Profesora: Pilar Molist García

Resumen: El páncreas es un órgano compuesto de dos partes, una endocrina y otra exocrina. En este estudio se trata de comparar distintas técnicas histoquímicas con las que pretendemos distinguir los distintos tipos celulares del páncreas endocrino y comprobar, de este modo, la efectividad de las mismas y su aplicación práctica en el páncreas de conejo.

Palabras clave: *páncreas, islotes de Langerhans, tinción de Gomori.*

Resumo: O páncreas é un órgano composto de dúas partes, unha exocrina e outra endocrina. Neste estudio trátase de comparar distintas técnicas histoquímicas coas que se pretende distinguir os distintos tipos celulares do páncreas endocrino e comprobar, desta maneira, a efectividade das mesmas, e a súa aplicación no páncreas de coello.

Palabras chave: *páncreas, illotes de Langerhans, tinción de Gomori.*

INTRODUCCIÓN

El hígado y el páncreas son glándulas mixtas asociadas al sistema digestivo. En el hígado la palabra mixta hace referencia a las dos funciones, exocrina y endocrina, en la misma célula. El páncreas, sin embargo, presenta una parte exocrina con una importante similitud estructural con las glándulas salivales (concretamente con la parótida) y una parte endocrina, denominada en vertebrados como islotes de Langerhans, donde distintos tipos celulares vierten su secreción a la sangre.

Durante la morfogénesis embrionaria se originan tres esbozos endodérmicos en la región pospilórica inicial, uno de ellos es dorsal y los otros dos proceden de la parte ventral de la pared del intestino. Sólo una parte del esbozo dorsal tiene valor respecto a su destino como células endocrinas. La otra parte del esbozo dorsal y la totalidad de los dos ventrales se emplea en la génesis de la parte exocrina. Posteriormente las dos formaciones se fusionan, pero la distribución de los acúmulos endocrinos con respecto a la parte exocrina nunca es homogéneo, sino que se condensa en áreas preferentes y representa alrededor del 1 al 2% del volumen total del páncreas. En algunos mamíferos, como es el caso del conejo, el páncreas, aunque es mixto en su composición, está disperso en multitud de nodulillos microscópicos en el seno del mesenterio, lo que le proporciona un aspecto lactescente. En el resto de los vertebrados constituye un cuerpo sólido de textura nodular, con un estroma conjuntivo bastante firme y una parte glandular de mucha menor consistencia (Carrato y Fernández, 1987).

El componente exocrino es una glándula

compuesta con un sistema de conductos que desembocan en el duodeno. Las células glandulares se encargan de sintetizar y secretar enzimas indispensables para la digestión.

Los islotes de Langerhans están formados por cordones de células que están rodeados por una profusa red de capilares fenestrados (Ross y Pawlina, 2007). Mediante tinciones convencionales como la hematoxilina-eosina no es posible distinguir los diversos tipos celulares de los islotes. Sin embargo, métodos histoquímicos específicos han permitido identificar los tres tipos principales de células: A (alfa, α), B (beta, β) y D (delta, δ).

Las células α suelen estar situadas en la periferia de los islotes. Tienen gránulos de secreción de glucagón en su citoplasma, ya que secretan dicha hormona.

Las células β son más abundantes que las α y están situadas en el centro del islote. Secretan insulina y sus gránulos de secreción son grandes (300 nm) con un núcleo poliédrico que se cree que es insulina cristalizada.

Las células δ también están en la periferia del islote, pero son menos frecuentes que las α . Secretan somatostatina y sus gránulos son más grandes que los de las células α y β .

La aplicación de las técnicas histoquímicas al estudio de los tipos celulares pancreáticos se remonta a 1907, cuando Lane consiguió, mediante su técnica de genciana neutra, identificar en islotes de páncreas de cerdo de guinea dos tipos de células. Las células α y β diferían en las reacciones que teñían sus gránulos, observando que estas últimas eran las más abundantes, ya que constituían el 75% de las células insulares.

Más tarde, en 1931, Bloom tiñó de forma diferenciada con la técnica de Azán otras células poco numerosas llamadas células δ . Estos tres tipos de células fueron descritas por Thomas en 1937 en casi todos los mamíferos, con una aparente uniformidad histológica, salvo diferencias en la posición y proporción dentro de los islotes. Thomas también señaló la presencia de otro tipo de células llamadas C, que fueron encontradas en el cobayo y el conejo (para revisión ver Barrington, 1951). Gomori, en 1941, empleando la aldehídofucsina como colorante, consiguió teñir específicamente las células β , tomando éstas un color purpúreo mediante la llamada "Tinción con aldehído de fucsina de Gomori". Posteriormente, esta técnica para las células β fue modificada por distintos autores. Con el método de Mallory-Azán de Heindenhain era posible identificar os tres tipos celulares: las células α se teñían de rojo, las células β lo hacían de pardo anaranjado y las δ de azul.

El objetivo del presente trabajo es la comparación de las distintas técnicas histoquímicas descritas para distinguir los diferentes tipos celulares del páncreas endocrino y comprobar, de este modo, la efectividad de las mismas y su aplicación práctica en el páncreas de conejo.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este estudio se ha utilizado el páncreas de un conejo joven hembra. Pequeños fragmentos de páncreas se fijaron por inmersión en dos tipos de fijadores, formol tamponado al 10% y líquido de Bouin, durante dos días a temperatura ambiente. Tras la fijación se lavaron las muestras en agua corriente durante una hora para eliminar los restos de

fijador; posteriormente se deshidrataron mediante una serie de alcoholes crecientes (70°, 96°, 100°) y se aclararon con dos baños de xilol necesarios para la impregnación en parafina. La inclusión en esta sustancia se realiza con 3 cambios en parafina líquida hasta llegar a ser pura y se realiza el bloque con otra parafina limpia. Se prepara un bloque, que una vez enfriado, se corta en microtomo minot a 5 micras de espesor. Los cortes son recogidos en portas gelatinizados para mejor adherencia de la muestra y se secan en placa caliente a 37°C. Permanecen en estufa a la misma temperatura hasta el día siguiente, cuando se tiñen con los distintos métodos que se describen a continuación:

Tinción de hematoxilina-eosina

Protocolo:

1. Desparafinar mediante dos baños de xilol de 10 min.
2. Hidratar los cortes mediante baños de alcoholes de graduación decreciente.
3. Lavar finalmente en agua destilada.
4. Teñir con hematoxilina de Carrazzi durante 10 min.
5. Lavar en agua corriente aproximadamente 1 min.
6. Teñir con eosina acuosa durante 4 min.
7. Pasar los cortes en alcohol de 70° 1 min.
8. Deshidratar, aclarar en xileno y montar.

Resultados: Núcleos azules y citoplasmas rosas.

Tinción de Azán de Gomori (según *Martoja y Martoja-Pierson*, 1970)

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar las secciones.

2. Oxidar con la mezcla de Gomori de 30 s a 1 min.
3. Tras un lavado rápido con agua destilada se blanquean los cortes con bisulfito sódico al 2% o con ácido oxálico al 4% en agua destilada durante 10 s.
4. Lavar en agua corriente y después en agua destilada.
5. Teñir con azocarmín G a 60°C durante 1 h.
6. Diferenciar ligeramente las secciones con alcohol de 70° – anilina al 1%.
7. Detener la diferenciación con alcohol acético 30 s. La permanencia de los cortes en alcohol acético puede prolongarse considerablemente.
8. Lavar en agua destilada.
9. Mordentaje con ácido fosfotúngstico al 5% en agua destilada durante 30 min. De esta manera se preparan las secciones para la tinción con el azul de Heidenhain, a la vez que continúa diferenciando el Azocarmin, por lo que la diferenciación en alcohol-anilina será tanto más corta cuanto más largo tenga que ser el tiempo de permanencia en el mordiente.
10. Lavar en agua destilada.
11. Teñir con azul de anilina- Orange G según Heidenhain durante 30 min.
12. Pasar directamente a alcohol de 100°, aclarar en xileno y montar.

Resultados: Núcleos rojos y citoplasmas o rojos o amarillo-grisáceos. Las células de tipo α se tiñen de rojo y las β quedan violetas.

Tinción Azán de Gomori (según Gabe, 1968)

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Oxidar durante un minuto aproximadamente con la mezcla de permanganato potásico – ácido sulfúrico.
3. Lavar con agua del grifo.
4. Decolorar con la solución acuosa al 2-5% de metabisulfito de sodio.
5. Lavar con cuidado (unos 10 min) con agua corriente.
6. Colorear durante 16 horas aproximadamente en estufa a 60°C con la solución acuosa saturada de Azocarmin G.
7. Lavar en agua destilada.
8. Diferenciar rápidamente en alcohol anilina, según la fórmula de Heidenhain.
9. Dejar las muestras aproximadamente un minuto en el alcohol acético según la fórmula original.
10. Lavar en agua destilada.
11. Mordentar con una solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5% 30 minutos.
12. Lavar en agua destilada.
13. Teñir con azul de anilina- Orange G según Heidenhain 30 minutos.
14. Deshidratar directamente en alcohol absoluto, aclarar y montar.

Resultados: Las células α se tiñen de rojo intenso y las células β presentan una tendencia hacia la cianofilia por el azul de Heidenhain

Tinción de Azan de Heidenhain (Según Kiernan, 2002)

Protocolo:

1. Desparafinar en baños de xilol e hidratar.
2. Tratar las secciones en la solución de Azocarmín G a 55°C durante 1 h, con-

- trolando que la temperatura no pase de los 60°C.
3. Lavar con agua de grifo unos segundos para quitar el exceso de colorante y sus partículas sólidas.
 4. Lavar 2 veces en agua destilada.
 5. Poner un portaobjetos de prueba en el líquido diferenciador alcohol-anilina agitando con cuidado. Controlar el tiempo que tarda en desaparecer el color rojo y, aproximadamente después de 1 min, pasar las secciones a agua destilada. Si al microscopio óptico se observan los núcleos rojos y el fondo rosa, seguimos con la técnica; en caso contrario volver a pasar por la anilina y reexaminar. Este portaobjetos de prueba es muy importante para calcular el tiempo óptimo de diferenciación.
 6. Poner los demás portas en la anilina dándoles el tiempo calculado antes y pasarlos al alcohol acético un minuto (este tiempo se puede alargar sin problemas).
 7. Mordentar las secciones con una solución de ácido fosfotúngstico al 5% durante 30 min.
 8. Lavar con agua acidificada y mirar al microscopio. Si el colágeno está de color rosa hay que volver a poner la muestra en el mordiente otros 30 min, con lo que esta etapa se puede alargar hasta 2 h.
 9. Teñir las secciones con azul de Heidenhain durante 1 h.
 10. Volver a lavar con agua acidificada entre 15 y 30 s, con agitación.
 11. Deshidratar directamente con alcohol de 100°, aclarar y montar.

Resultados: Núcleos rojo intenso y citoplasmas anaranjados granulares.

Tinción Azán-Mallory-Gomori

La denominamos así porque partimos de la tinción Azan de Gomori suprimiendo la oxidación con la mezcla permanganato potásico-ácido sulfúrico (mezcla de Gomori). Después de realizar numerosas variantes de la técnica los mejores resultados los hemos obtenido con los siguientes cambios:

Variante 1 "Azan-Mallory"

1. Suprimir la oxidación con la mezcla de Gomori.
2. Aumentar el tiempo de mordentaje a 45 min.
3. Usar la solución de Mallory durante 30 min en lugar del Azán de Heidenhain.

Variante 2 "Azan-Heidenhain"

1. Suprimir la oxidación con la mezcla de Gomori.
2. Usar agua caliente a 37°C para lavar después del azocarmín.
3. Diferenciar en pasos, es decir, sumergiendo en 10 ocasiones sucesivas el portaobjetos en el diferenciador.
4. Usar como mordiente la sal de Mohr.
5. Teñir finalmente con el azul de Heidenhain.

Resultados: las células α aparecen con núcleo rojo intenso y citoplasmas anaranjado fuerte, las células β presentan núcleo y citoplasma del mismo color pero mucho menos intenso.

Tinción rojo nuclear y tetracrómico VOF (Según Gutiérrez, 1967, 1990; Sarasquete y Gutiérrez, 2005)

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar las secciones.
2. Teñir con una solución de rojo nuclear

- durante 3 min.
3. Lavar con agua destilada.
 4. Teñir con una solución tetracrómica (VOF-GS) que contiene verde luz, orange G y fucsina ácida, durante 3-5 min.
 5. Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados: Aparecen los núcleos rojos, los citoplasmas exocrinos violáceos y los endocrinos azulados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como era previsible, la técnica de hematoxilina-eosina nos permite diferenciar fácilmente entre la parte endocrina (islotos de Langerhans) y la parte exocrina (acinos pancreáticos) del páncreas de conejo (Fig. 1).

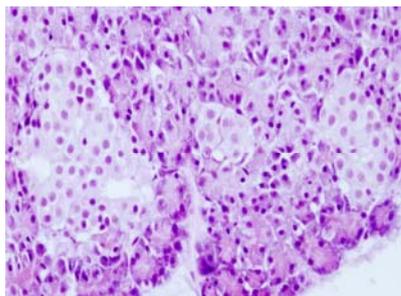


Fig. 1. Páncreas de conejo teñido con h/e. La parte endocrina más clara forma los islotos de Langerhans dispersos entre los acinos exocrinos.

Sin embargo, todas las células de los islotos presentan el mismo aspecto morfológico. Células grandes de citoplasma abundante y núcleos redondeados situados en posición central.

El siguiente método Azán-Gomori descrito por Martoja y Martoja-Pierson (1970) nos muestra resultados diferentes dependiendo del fijador utilizado. El uso de formol marca los núcleos de la mayor parte de las células de rojo, siendo de color anaranjado en una pequeña proporción.

Algunas células situadas preferentemente en la periferia del islote aparecen con granu-

laciones anaranjadas en su citoplasma (Fig. 2) que se corresponden con las descritas por Martoja como de tipo α . Aunque este autor diferencia con este método las células de tipo β , nosotros no conseguimos ningún tipo de tinción. Este es el único caso en que con el formol obtuvimos mejores resultados. Sin embargo, Martoja y Martoja-Pierson (1970) describen los mismos resultados independientemente del fijador.

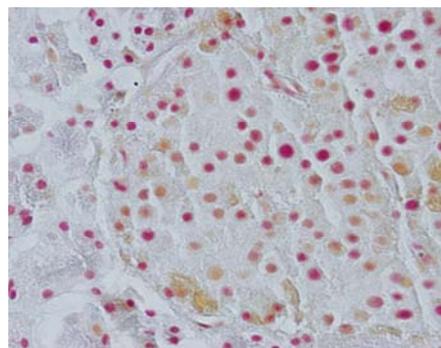


Fig. 2. Páncreas endocrino teñido con Azán-Gomori según Martoja y Martoja-Pierson y fijadas con formol. Las células con citoplasma anaranjado se corresponden con las de tipo α .

Estos resultados contrastan con los obtenidos usando como fijador el líquido de Bouin en donde no aparece ningún tipo de tinción en los islotos (Fig. 3). Similares resultados negativos obtuvimos con las técnicas de Azán de Gomori según Gabe (1968) y el Azán de Heindenhan (Kiernan, 2002).

De las tres técnicas anteriores los resultados más satisfactorios los encontramos en el Azán de Gomori según Martoja y como

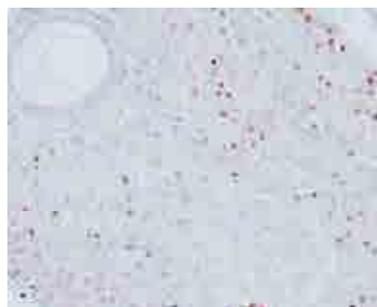


Fig. 3. La misma técnica que la anterior pero usando como fijador el líquido de Bouin, el islote de Langerhans aparece negativo.

fijador de elección el formol al 10%. Sin embargo, y a pesar de ser los mejores resultados, no nos parecieron nada espectaculares, por lo que comenzamos a realizar múltiples variantes sobre la técnica. Curiosamente, al suprimir el uso de la mezcla oxidante de Gomori no daba buenos resultados y nos acercaba a la técnica Azán de Heindenhain, descrita por Kiernan y que previamente resultaba negativa.

Dos variantes que hemos introducido sobre esta técnica se especifican en Material y Métodos ofreciendo mejores resultados que la original. La primera la denominamos Azán-Mallory, ya que el cambio radica en el uso de la solución de Mallory por el azul de Heindenhain. Los resultados se muestran en la Figura 4.

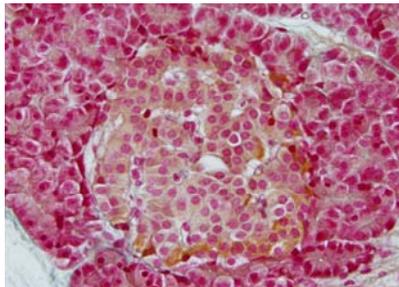


Fig. 4. Páncreas endocrino teñido con la variante 1 "Azán-Mallory". El citoplasma de las células α se tiñen de naranja fuerte, las de las células β de naranja claro.

Las células α aparecen mayormente en la periferia del islote con un citoplasma fuertemente granular y anaranjado; las células β se muestran con un citoplasma anaranjado claro. En la segunda variante se cambia el agente mordiente manteniéndose el azul de Heindenhain. En este caso, además, podemos observar unas pequeñas células escasas de citoplasma gris oscuro que podrían ser las células de tipo δ (Fig. 5).

Otra técnica con buenos resultados es el tetracrómico de Gutiérrez (Fig. 6), con el que podemos observar las células α con

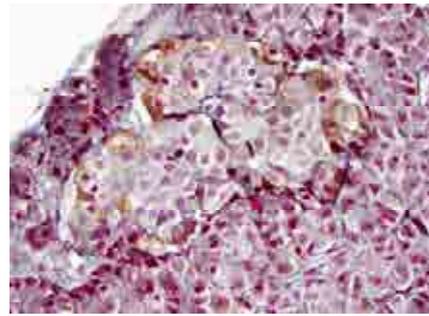


Fig. 5. Páncreas endocrino teñido con la variante 2 "Azán-Heindenhain". Se distinguen los tres tipos de células: las α teñidas de naranja, las β de gris claro a blanco y las δ están teñidas de gris oscuro pero son muy escasas.

núcleos densos y citoplasmas azul intenso y las células β con núcleos grandes y claros, y citoplasmas claros con gránulos.

Podemos concluir que, de todas las tinciones aplicadas o testadas, la variante 2 realizada sobre la tinción Azán de Heindenhain es la que ofrece mejores resultados para distinguir los tres tipos celulares descritos en el páncreas endocrino. El tetracrómico de Gutiérrez y el Azán-Mallory presentan también un resultado óptimo para diferenciar las células α de las β .

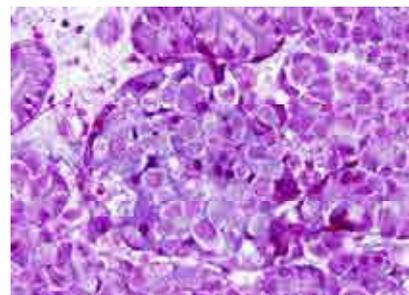


Fig. 6. El tetracrómico de Gutiérrez permite distinguir entre las células α teñidas de azul oscuro y las β de color azul claro.

BIBLIOGRAFÍA

BARRINGTON, J. W. 1951. The specific granules of the pancreatic islet tissue of the frog. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, Vol. 92, parte 2:205-220.

CARRATO, A. & FERNÁNDEZ, B. 1987. Aparato digestivo. *En: Organización Microscópica Animal*. Alambra Universidad.

GABE, M. 1968. Techniques d'étude histologique des glandes endocrines. *En: Techniques Histologiques*. Masson et Cie, Éditeurs.

GUTIÉRREZ, M. 1967. Coloración histológica para ovarios de peces, crustáceos y moluscos. *Investigaciones pesqueras*, 31: 265-271

GUTIÉRREZ, M. 1990. Nuevos colorantes biológicos y citohistoquímica de la coloración. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz, Cádiz.

KIERNAN, J. A. 2002. Methods for connec-

tive tissue. *En: Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*. (3rd Ed.). Scion Publishing Ltd., Oxford.

LANE, M.A. 1907. The Cytological Characters of the Areas of Langerhans. *American Journal Anatomy* 7: 409-422.

MARTOJA, R. & MARTOJA-PIERSON, M. 1970. Método general de tinción. *En: Técnicas de Histología Animal*. Toray-Masson. Barcelona.

ROSS, M. & PAWLINA, W. 2007. Aparato digestivo III: Hígado, Vesícula Biliar y Páncreas. *En: Histología: Texto y Atlas color de Biología Celular y Molecular* (5^a Ed.). Panamericana.

SARASQUETE, C. & GUTIÉRREZ, M. 2005. New Tetracromic VOF Satín (Tipe III G.S) for Normal and Pathological Tissues. *European Journal of Histochemistry*. 49:211-220.