

## Tema 9: Coloración

### • Fundamentos Generales de Coloración

La percepción de los colores por la retina está ligada a la capacidad que posee el ojo humano para captar la radiación lumínica comprendida entre 400 y 800 nanómetros de longitud de onda ( ) y cuya mezcla homogénea se llama normalmente luz blanca o espectro visible de la radiación solar cuando un cuerpo iluminado por la luz refleja por la superficie toda la radiación que recibe, la retina lo percibe de color blanco. Si absorbe toda la radiación se percibe de color negro. El color que vemos es el complementario al absorbido. Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas poseen poco color o carecen de él. Por lo que no pueden ser distinguidas a excepción de la melanina de la piel o de la hemoglobina de la sangre. Este inconveniente se subsana por la propiedad de los diferentes componentes celulares de manera que pueden incorporar y fijar determinados materias colorantes. Un colorante se puede definir como la sustancia que puesta en contacto con un soporte adecuado. Se une a él y le transmite color.

Las preparaciones en colores, se deben a que no todas las estructuras celulares se tiñen con un colorante con la misma intensidad. Si se sabe exactamente la reacción química o física en la que se basa una coloración es posible deducir ciertos datos sobre las características o la constitución química de las estructuras que se ponen en manifiesto.

Tipos de colorantes según su origen podemos clasificarlos en:

Naturales: son relativamente escasas y se obtiene en forma de extractos a partir de ciertas plantas, insectos o moluscos. Son ampliamente utilizados en anatomía patológica y un ejemplo son el carmín que se utiliza como colorantes nuclear y se utiliza con hematoxilina.

Artificiales: en su mayor parte derivan de la anilina. Comenzaron a utilizarse a mitad del s. XIX y sirve a numerosas coloraciones, inicialmente se obtenía del alquitrán y actualmente se sintetiza en el laboratorio.

### • Naturaleza Química de los Colorantes

El soporte químico de la mayor parte de los colorantes naturales y de todos los artificiales son anillos aromáticos derivado del benceno. Debido a que los dobles átomos de carbono anillos no son fijos. Es decir, pueden ser reordenados. Esto hace posible que están muchos derivados del benceno y por tanto de los colorantes de anilina.

El Benceno al igual que todos los hidrocarburos aromáticos, originalmente tienen una sustancia incolora que puede absorber radiaciones dentro del espectro de la luz ultravioleta, es decir a menos de 400 nanómetros. Si se produce una reacción química e introducimos radicales químicos, el derivado del benceno que se obtiene puede absorber radiación luminosa, dentro del espectro visible y no nos mostrará color. El anillo bencénico será incoloro, a nuestros ojos. A los radicales químicos responsables de la modificación molecular a la que se debe la aparición del color se le llama grupo cromóforo y se denomina cromógeno al conjunto formado por el grupo cromóforo y el anillo bencénico. Cromógeno no es sinónimo de colorante ya que el cromógeno no siempre tiene apetencia por el tejido o no se une fuertemente al tejido. Otras veces el colorante puede perder temporalmente, su capacidad para absorber radiación lumínica dentro del espectro visible. Esto ocurre generalmente por la reducción del grupo cromóforo que lo transforma en un leucoderivado. En estos casos el color suele aparecer tras realizar una oxidación que restaura el grupo cromóforo, esto ocurre cuando no se almacena correctamente. El anillo bencénico puede llevar uno o dos grupos cromóforos. Los principales grupos cromóforos conocidos son los siguientes radicales:

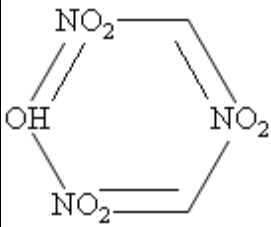
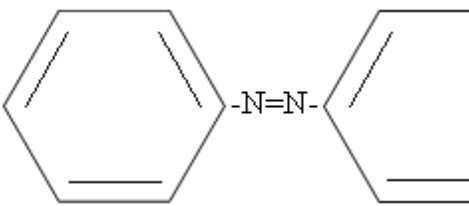
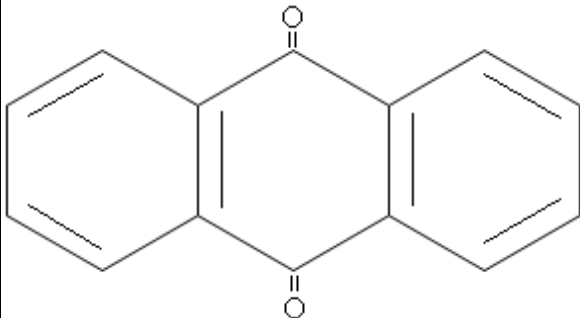
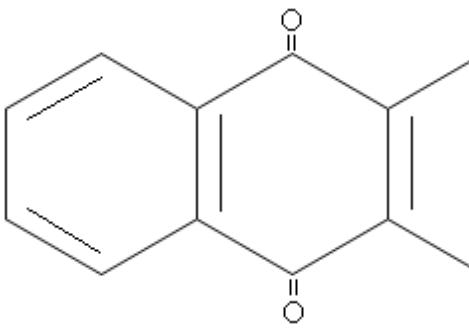
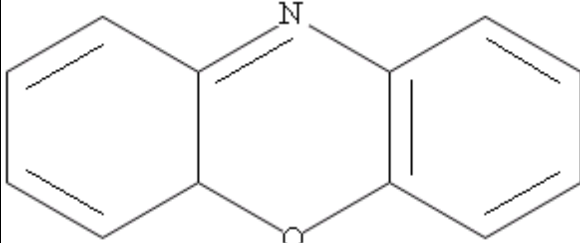
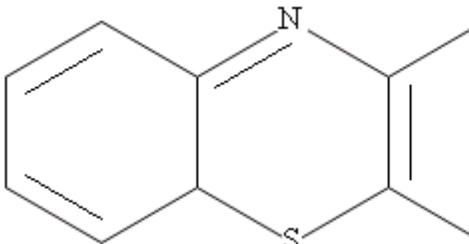
|           |       |         |
|-----------|-------|---------|
| Etileno   | ----- | (>C=C<) |
| Carbonilo | ----- | (>C=O)  |
| Tiazólico | ----- | (>C=S)  |
| Imino     | ----- | (>C=N)  |
| Azoico    | ----- | (-N=N-) |
| Nitroso   | ----- | (-N=O)  |
| Nitro     | ----- | (-NO)   |

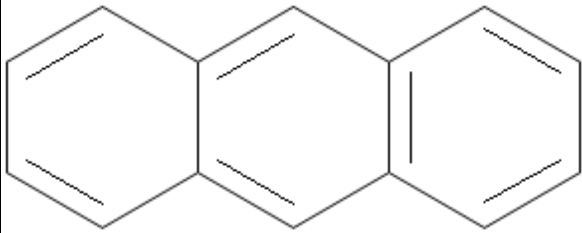
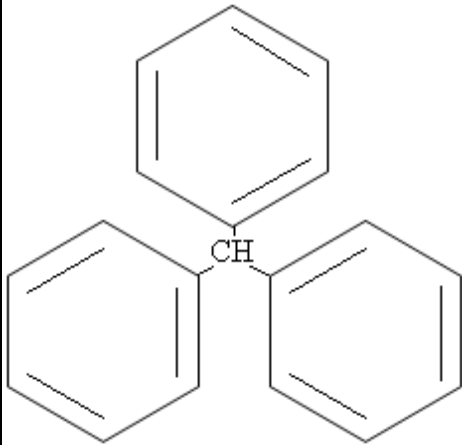
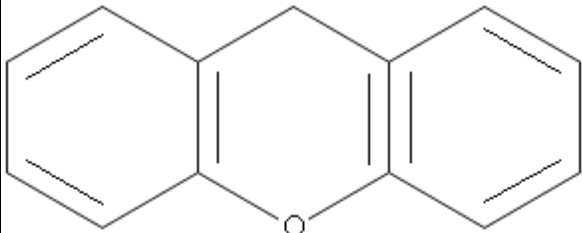
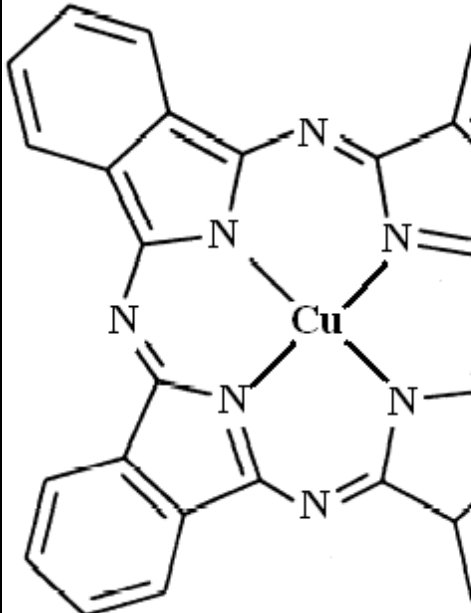
La conversión del cromógeno en colorante está vinculada a la adicción sobre la molécula cromática de otros grupos atómicos que la confieren o le dan la oportunidad de disociarse electrolíticamente o de formar sales con los diferentes tejidos. Estos radicales se los denomina grupos auxocrómos o potenciadores del color. Generalmente tienen carga eléctrica es decir posee carácter ácido o básico y son los responsables de que el colorante tenga mayor o menor afinidad por la estructura que va a teñir.

Los grupos auxocrómos de importancia son: el grupo hidroxilo, carboxilo, amino, sulfidrilo y determinados iones derivados del Fe, Cr, Al y del Mb.

- Clasificación de los colorantes según los Grupos Cromóforos.

En función del grupo cromógeno que contienen. Existen 8 grupos de colorantes:

|                |                                                                                     |                  |                                                                                       |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Nitrocolorante |   | Colorante azoico |   |
| Antraquinona   |  | Acridina         |  |
| Oxacina        |  | Tiacina          |  |

|          |                                                                                    |                       |                                                                                      |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| Acina    |   | Trienal metano        |    |
| Xianteno |  | Ftalocianina de Cobre |  |

#### Colorantes Nitratos o Nitrocolorantes:

Son nitro o nitrosos derivados del benceno o del naftaleno con algunos grupos hidroxilos aminos, etc. El más sencillo es el 2, 4, 6 trinitrofenol. La presencia de los 3 grupos nitro incrementa el carácter ácido del grupo fenólico.

#### Colorantes Azoicos:

Contienen el grupo Azo unido o uniendo anillos adyacentes derivados del benceno o del antraceno. En general son colorantes ácidos, también los hay neutros o básicos pueden tener un solo grupo azo (monoazoicos) como por ejemplo el orange G o Anaranjado 2, el cromotrope 2R o también diazoicos como el Sudán rojo y negro, el Rojo Congo o el Escarlata de Biebrich

#### Colorantes Derivados de la Antroquinona:

Se obtiene a partir de la oxidación del antraceno para formar anillos quinónicos como el Rojo de Alizarina S.

#### Colorantes de Derivan de la Acridina:

Naranja de Acridina,

### Iminas Quinónicas

Poseen 2 grupos cromóforos y en función de ellos se clasifican en derivados oxacínicos como por ejemplo la Galocianina el Azul Nilo o el Violeta de Cresilo. Derivados tiacínicos como por ejemplo: tionina, Azur A, B y C. Azul de Toluidina, derivados acínicos como por ejemplo el Rojo Neutro, Safranina E y Azocarmin.

### Derivadas de Difenil metano:

Como por ejemplo la auramina y del trifenilmetano como las fucsinas o el Verde Ligerio. Los colorantes de este grupo pueden ser ácidos o básicos según el grupo auxocrómo que se le añada a la molécula.

### Colorantes Derivados del Xanteno:

Los grupos cromóforos son variables y entre ellos están:

- Piridina
- Rodanina
- Sulfoftaleina.

### Colorantes Derivados de las Ftalocianinas:

Por ejemplo el Azul Alcian cuyo anillo recuerda a la molécula de la hemoglobina, en general junto al nombre de los colorantes figuran algunos códigos y siglas –numéricos.

Siglas: corresponden a abreviaturas comunes a diferentes colorantes. Ejemplos: Si encontramos una:

|   |                     |
|---|---------------------|
| B | azulado             |
| G | verdoso             |
| L | insensible a la luz |
| M | mezcla              |
| R | rojizo              |
| S | soluble             |
| W | soluble en agua     |
| Y | amarillento         |

El código –numérico nos remite a lo que se denomina C.I. que es el Índice Calorimétrico del colorante que nos sirve para identificarlo y lleva 5 dígitos.

- Clasificación de los colorantes según los Grupos Auxocrómos y Apetencia Tisular.

Cinco grupos fundamentales:

1º) Colorantes Básicos: asociación de un cromógeno de baja intensidad y de carácter débilmente ácido al que se le añade grupos auxocromos catiónicos fuertemente básicos que son los responsables de la carga global del colorante por eso se utilizan para teñir estructuras ácidas.

Ejemplo: laca de hematoxilina – colorante nuclear.

Fucsina básica

Galocianina

2º) Colorantes Ácidos: productos de la unión de un cromógeno de baja intensidad débilmente básico al que se le añaden grupos auxocromos fuertemente ácido lo que le dan dicho carácter al colorante tiñe estructuras básicas celulares en el citoplasma celular: Eosina-C. Citoplasmática / Fucsina-Ácida.

3º) Colorantes Neutros: unión colorante ácido y básico para formar un precipitado comúnmente insoluble en agua y muy estable en disolución alcohólica de esta forma siendo su carga floral neutra conservan en parte la propiedad de colorear conjunta o separadamente diferentes estructuras dependiendo de que sean o no capaces de atrapar algunos iones generando cuando la sal se disocia tras ser inestabilizada al colocarla en disolución acuosa. Ejemplo Giemsa.

Las estructuras así coloreadas adquieren una tonalidad policroma = multicolor.

4º) Colorantes Indiferentes: En condiciones normales colorean los tejidos por un mecanismo de impregnación física no poseen carácter ácido, básico o salino definido por ejemplo la tinción argéntica.

5º) Colorantes Metacromáticos: en condiciones normales la mayor parte de los colorantes tiñen los tejidos con un color parecido a él, esta propiedad es la ORTOCROMASIA, sin embargo cuando se utilizan ciertos colorantes básicos derivado de la anilina algunas estructuras titulares se tiñen con tonos diferentes al que cabría esperar por el colorante usado. Por ejemplo los gránulos de los mastocitos presentan color rojo con el azul de metileno o el azul de toluidina, este efecto es la METACROMASIA y estructuras teñidas LA CROMOTROPAS, los colorantes metacromáticos son sustancias químicamente puras y no de carácter salino. La explicación se cree que se debe a que se produce una polimerización entre las moléculas de colorante adyacente a las estructuras a teñir. Existen estructuras como son por ejemplo glúcidos complejos o cartílago que se observan mejor con estos colorantes metacromáticos.

- Teoría del Proceso de Coloración o Mecanismos de Coloración

Los métodos de tinción se fundamentan en una serie de procesos fisicoquímicos complicados que venían según los colorantes algunos son todavía desconocidos no se sabe si la coloración se efectúa por procesos físicos o químicos. Aunque ambas teorías intervienen y además se produce una serie de procesos complicados que entran en el campo de la físico-química (aunque el proceso de coloración la

– M. Físicos: ligados a las propiedades de disolución e impregnación del colorante sobre el tejido, el colorante es más soluble en el tejido que en el disolvente que actúa como medio de transporte, suele ser agua, un ejemplo: la tinción para grasas, en esta el colorante se disuelve mas fácil en los lípidos titulares que en la solución alcohólica siguiendo reglas de la difusión para el colorante de la solución colorante a las estructuras de su predilección también el proceso de impregnación se basa en m. Físicos en este caso el colorante tiene un gran volumen molecular o bien se hace una precipitación selectiva en forma de agregados insolubles de manera que el colorante queda atrapado entre la mellad e células y fibras que constituyen los tejidos.

– M. Químicos: La reacción entre colorante y tejido ocurre por procesos químicos bien definidos de manera que al interaccionar se produce un nuevo cromógeno responsable del color obtenido, los procedimientos que se fundamentan en este mecanismo. Se agrupan en el campo de la histotecnología que estudia la estructura química y la composición de los tejidos mediante reacciones químicas específicas para la localización microscópica de determinadas sustancias.

– M. Físico-Químicos: Se basa en la formación de uniones intermoleculares por atracción electrostática (cargas diferentes) de manera que el colorante ácido tiene estructuras básicas y viceversa.

## **VOCABULARIO EN LAS TÉCNICAS DE COLORACIÓN:**

Coloración progresiva: en ella se deja actuar el colorante hasta que la coloración alcanza la intensidad deseada, se lleva el control exacto de los tiempos y el punto exacto se controla con el microscopio.

Coloración regresiva: en ella una se sobrecolorea y luego se elimina el exceso de colorante, a éste último proceso se le llama diferenciación que se puede hacer con agua, con ácidos, alcohol, bases o con soluciones metálicas.

Coloración Terminal: Colorea estructuras cuya intensidad es independiente del tiempo que actúa el colorante.

Impregnación: en ella se utilizan sales metálicas como cloruro de oro, nitrato de plata y se origina precipitados metálicos en las estructuras.

Coloración en Bloque: en ella las piezas se tiñen, se incluyen, se cortan tal cual.

Coloración directa: el colorante tiñe por el mismo, necesita mordiente.

Coloración indirecta: el colorante no tiñe por si mismo sino que hay que tratar con un mordiente

Coloración Topográfica: es aquella que proporciona una visión de conjunto, de manera que se pueden separar todos los componentes arquitecturales.

Coloración estructural: nos sirve para resaltar ciertas estructuras titulares. Ejemplo: núcleos, fibras elásticas

## **FORMAS DE COLOREAR:**

El procedimiento más usado es dejar la sustancia colorante sobre el corte y luego llevar o añadir al porta un líquido para extraer el colorante, ese líquido suele ser agua o alcohol por ello necesitaremos 100–150 mL por grupo Tinción por vertido.

También se puede hacer por inmersión introduciendo la preparación en colorante y en este caso si es un koplín de 90 mL, los colorantes se conservan en frasco cerrado, color topáceo, se etiquetará y se filón antes de usar. Algunos colorantes se alteran con el tiempo por lo que se hará la disolución justo antes de utilizarlos, en algunos de estos casos se puede dejar hecha la solución madre. Otras veces el colorante necesita madurar, entonces hay que prepararla con antelación (Hx).

- Deshidratar

Después de colorear nuestra preparación hay que deshidratar, algunos cortes de parafina necesitan deshidratarse después de haber sido teñidos, la elección del agente deshidratante depende de la solubilidad que en él tengan las sustancias colorantes utilizadas en la tinción si se utiliza un colorante soluble en alcohol se utilizará la acetona o dioxano como agente deshidratante, si el colorante es hidrosoluble deberá evitarse los alcoholes de menor concentración, los cortes pueden deshidratarse siempre con alcohol absoluto y cuando el exceso de colorante haya sido eliminado con papel secante se hace sobretodo en la deshidratación con acetona, si secamos un corte con papel de filtro no se hará nunca expuesto al aire ya que puede dar lugar a artefactos. Existen varios procedimientos para deshidratar:

Xilol: Aclarar y conservar la muestra hasta el montaje. Se quedan dentro de las cubetas de Xilol hasta el montaje porque sino se estropean. Al sacar el corte del Xilol no se deben observar gotas, esto indicaría una mala deshidratación o bien que el corte se ha impregnado de un Xilol contaminado.

Desparafinar Estufa 60° 30 min.

!

Aclarar MC o X 2 cubetas de Xilol durante 5 min. cada una.

!

Hidratar 2 cubetas de 100° 2' cada una, 2 de 96° 2' cada una, 1 de 80° 2', 1 de agua 2'

!

Colorear

!

Deshidratar 1 cubeta 80° 5', 2 de 96° 5' cada una, 1 de absoluto 5' y otra de absoluto nuevo 5'.

!

Aclarar 2 cubetas de Xilol 5' cada una

!

Montar

- Técnicas de Montaje

El paso final de la preparación del porta con el tejido y después de teñir, deshidratar y aclarar es el montaje como paso previo a la observación microscópica, es decir cubriremos la porción que recubre el tejido con un vidrio muy delgado que es el cubre, finalidad de los medios de montaje es evitar que la muestra situada entre porta y cubre se ponga en contacto con el aire, características de los medios de montaje:

No deben tener ninguna acción sobre los colorantes o los tejidos y deben conservar la muestra durante mucho tiempo y permitir el examen microscópico. Hay gran cantidad de preparaciones según sea deshidratado o hidratada. Ciertos colores son mas estables y ácidos y otros mas neutros o alcalinos.

- Azul de Metileno Alcalino
- Van Gieson Ácido.

La composición química de los medios de montaje pueden ser: Resinas naturales, resinas sintéticas o determinados alcoholes polivinílicos.

- **Medios de montaje para preparaciones hidratadas:**

Para preparaciones hidratadas se utiliza la gelatina glicerizada también llamada jalea glicerizada. Su fórmula es:

- Gelatina 5 gramos
- Glicerina 35 cc
- Agua destilada fría 25 cc
- Agua normal 40cm<sup>3</sup>

- Gotitas de fenol o Timol para desinfectar.

Ablandar la gelatina en agua fría y cuando esté en blando disolver el agua sin que llegue a hervir, cuando esté bien disuelto y a temperatura ambiente añadir la glicerina y el fenol y señalar el cubre en el borde con un poco de pintañas.

En coloraciones de grasas: Se utiliza jarabe de goma arábica.

#### – **Preparaciones deshidratadas:**

Se montan con resinas naturales de origen vegetal lo que se llamaba bálsamo, de estas resinas naturales son parecidas a los terpenos y otros compuestos se parecen a las esterinas vegetales. Antiguamente se usaba el bálsamo de Canadá pero se ha desechado porque produce una reacción ácida, destiñe, seca lentamente, puede cristalizar y oscurecer las resinas artificiales se obtienen por condensación química de aldehídos con fenoles. Así existen compuestos comerciales como el EUKITT, ACRITOL o el Ápex.

El Ápex es una solución de Polietilén glicol en xilol, con él se obtienen buenos resultados, como hematoxilina y toxina o en el Masson– Goleen.

En microscopía de fluorescencia se usa aceite de cedro, jarabe de goma arábica o laca de Oxilina.

Los cortes deshidratados cubiertos por el medio de montaje se cubren con el cubre. Si la preparación es hidratado se bordea con un medio para que no se evapore el líquido y para sellar los extremos para ellos se utiliza la laca de uñas.

#### – **Formas para colocar el cubre:**

- Se deja caer el medio de montaje sobre el tejido y encima se coloca el cubre pudiéndose presionar ligeramente con una aguja de disección o una pinza.
- O colocar una gota en el extremo de la preparación y tomando el cubre entre los dedos índice y pulgar se deja caer suavemente, sujetando con una aguja histológica.
- Colocar la gota sobre el cubre y el porta se invierte sobre el cubre, en todos los casos el exceso de elimina de los alrededores del cubre presionando ligeramente con un paño humedecido con Xilol o Toluol.

#### – **Errores que se pueden cometer:**

- Permitir que el tejido se rehidrate, si pasa mucho tiempo desde que se saca del agente aclarante, se observa como pierde transparencia y a esto se le llama secado. Es decir, el agente aclarante se ha evaporado y los huecos los ocupa la humedad. Si se monta el resultado es desastroso. Para evitar este efecto se sacará el porta del aclarante, justo en el momento de montar.
- Exceso de medios de montaje.

- Procedimientos para Desteñir una Preparación

**1º** Quitar el cubre, para ello dejaremos la preparación en Xilol durante horas o durante días. A mayor antigüedad más tiempo necesitará. Si se introduce en la estufa a 60° se necesita menos tiempo, pero el Xilol es muy tóxico. Otra manera es introducir en el congelador con el cubre hacia abajo sobre el hielo de 10 a 15 min., incluso puede tardar horas y en ambos casos provistos de gafas, y con una aguja histológica se introduce para retirar el cubre, para eliminar el medio de montaje se retira el Xilol y para retirar la tinción nuclear se

utiliza el HCl diluido en alcohol o agua 5–20 minutos o más después en agua corriente durante 10–15 minutos.

2º Otra forma:

- Xilol
- OH Absoluto (x3) – 10 pases
- OH Absoluto (x3) – 10 pases
- Agua
- Solución acuosa alcohólica (alcohol) (3'-5'): 10cc HCl (5N) + 1000cc alcohol 70°
- Agua
- Reteñir

3º Otra forma:

- Alcohol Absoluto + Xilol – 10 pasos
- Alcohol Absoluto x2
- Alcohol Absoluto 95° (x4) – 80 – 70 – 50
- Agua
- HCl 1° / 1 – 2.
- Agua 10'
- Reteñir