

Parte A: Observación de preparaciones histológicas y micrografías

---

Observe al microscopio y utilice las descripciones que siguen como guía para identificar, en los cortes, las células y elementos fibrilares que se encuentran en los tejidos conjuntivos. Realice un esquema de cada uno de los preparados histológicos observados, identifique las estructuras que se indican y observe las micrografías electrónicas correspondientes.

**A.1: Elementos básicos de los tejidos conjuntivos**

a) *Tejido conjuntivo laxo: Montaje in toto de tejido inflamatorio, “bola de edema”.*

Es un preparado obtenido en condiciones no fisiológicas: se inyecta en un animal de experimentación un agente irritante, que estimula la generación de un tejido inflamatorio. Éste se extrae, se monta entero sobre un portaobjetos, se fija y se colorea con hematoxilina y eosina (HE).

En este preparado se pueden encontrar los siguientes *tipos celulares*:

- **fibroblasto**, de forma fusiforme o estrellada, con citoplasma levemente basófilo y núcleo ovoide;
- **mastocito o célula cebada**, de tamaño grande, con citoplasma repleto de gránulos basófilos;
- **plasmocito o célula plasmática**, presenta núcleo redondeado, heterocromático y periférico, y citoplasma basófilo;
- **linfocito**, de tamaño pequeño, el núcleo ocupa prácticamente toda la célula;
- **granulocito eosinófilo**, núcleo generalmente bilobulado y gránulos eosinófilos en el citoplasma;
- **macrófago**, de forma irregular, con núcleo indentado.

De los elementos de la *matriz extracelular*, se observan:

- **fibras elásticas**, finas y ramificadas, con aspecto sinuoso;
- **fibras colágenas**, más gruesas, sin ramificaciones.

Bola de edema (HE)

Aumento:

Marque en el dibujo:

- fibras de colágeno
- fibras elásticas
- fibroblasto
- granulocito eosinófilo

b) *Micrografías electrónicas (7; 19A y C; 102A y B; 1006; 1011)*. Células y fibras del tejido conjuntivo.

1.- En la micrografía 19A se ilustran fibras de colágeno teñidas con un método argéntico. La micrografía 19C muestra fibras elásticas teñidas con resorcina-fucsina. Mencione al menos dos diferencias observables entre ambos tipos de fibras.

2.- Observe las micrografías de las *planchas nº 7 y 102* donde se muestran diferentes tipos celulares del sistema inmune. ¿Cómo se dispone la cromatina en un plasmocito (7A)? ¿Cómo se encuentra ésta célula con respecto a su actividad de síntesis proteica? Justifique brevemente su respuesta.

## A.2: Especializaciones de elementos fibrilares de la matriz extracelular

Se observan dos ejemplos

### c) *Corte transversal de arteria elástica*

En este preparado se observa un tejido conjuntivo denso rico en ***láminas elásticas*** que se disponen de manera concéntrica alrededor de la luz del vaso. El colorante orceína tiñe los elementos elásticos evidenciando las láminas.

Arteria elástica (orceína)

Aumento:

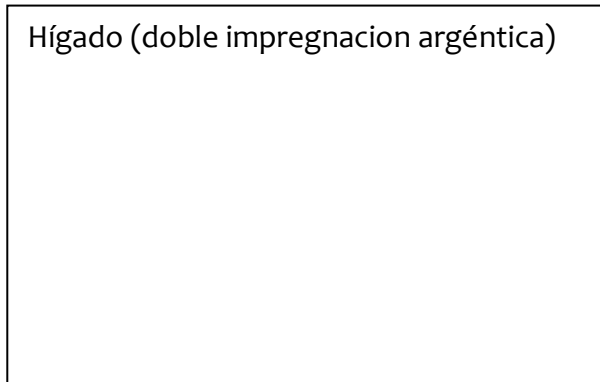
Identifique:

- láminas elásticas
- luz de la arteria

d) Corte de órgano parenquimatoso (doble impregnación argéntica)

En este preparado se observan elementos fibrilares de colágeno:

- **fibras reticulares**, fibras de colágeno de tipo III, teñidas de color negro, formando redes delicadas estrechamente asociadas a las células epiteliales (apenas visibles).
- **fibras de colágeno de tipo I** de los tabiques conjuntivos, coloreadas de color magenta-violáceo.



Aumento:

Marque:

- fibras reticulares (col. III)
- fibras de colágeno tipo I
- núcleos de hepatocitos

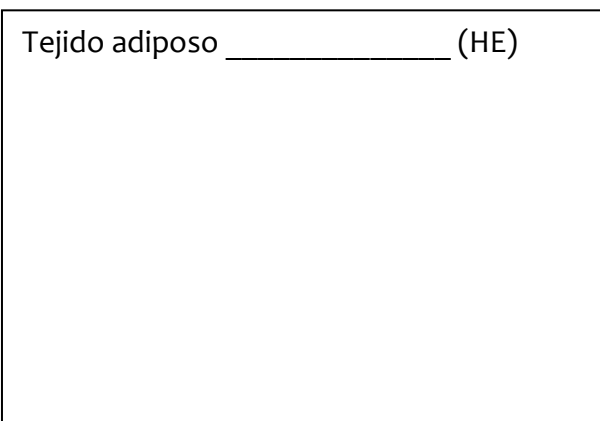
**A.3: Tipos celulares conjuntivos especializados**

Se observan tres ejemplos

e) Corte de tejido adiposo, blanco o pardo (HE)

En estos preparados se pueden observar:

- **adipocitos blancos**, contienen una única gota lipídica, que desplaza el citoplasma y el núcleo hacia la periferia celular.
- **adipocitos pardos**, contienen varias gotas lipídicas
- **fibroblastos**
- **vasos sanguíneos** (capilares, vénulas, arteriolas), bordeados por células endoteliales aplanadas.



Aumento:

Marque:

- adipocitos
- núcleos de adipocitos
- vasos sanguíneos

f) Micrografías electrónicas nº 1010 BAT y WAT.

Con base en su observación de los preparados histológicos y las micrografías electrónicas responda: ¿Qué diferencias morfológicas observa entre las células adiposas blancas y las células adiposas pardas?

g) Corte de cartílago hialino (HE)

En este preparado se pueden observar:

- **matriz extracelular**, levemente basófila, no se evidencian los elementos fibrilares (aspecto “hialino”);
- **condrocitos**, células dispersas en la matriz;
- **condroplastos**, espacios de la matriz donde se encuentran los condrocitos;
- **pericondrio**, tejido conjuntivo denso que rodea al cartílago y contiene las **células condroprogenitoras**;
- **condroblastos**, condrocitos inmaduros, ubicados en la región del cartílago próxima al pericondrio, y rodeados por menos matriz extracelular.

Cartílago hialino (HE)

Aumento:

Identifique:

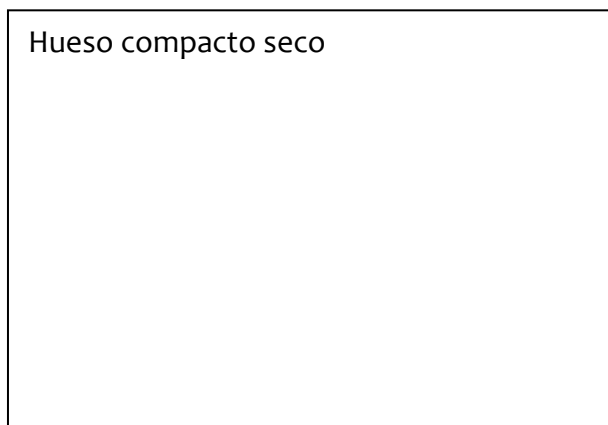
- matriz extracelular
- condrocitos
- condroplastos
- pericondrio
- condroblastos

*h) Corte de hueso compacto seco*

En esta preparación, que no está coloreada, solo permanece la porción mineral (fosfato de calcio) de la matriz extracelular del hueso.

En este preparado se pueden observar:

- **osteona**, estructura cilíndrica, unidad estructural del hueso compacto formada por:
- **conducto de Havers**, conducto vascular longitudinal
- **laminillas óseas**, láminas concéntricas de matriz extracelular
- **osteoplastos**, cavidades que fueron ocupadas por **osteocitos**
- **canalículos óseos**, que conectan osteoplastos, y estaban ocupados por prolongaciones citoplásmicas de osteocitos.



Aumento:

Marque:

- osteona
- laminillas óseas
- conducto de Havers
- canalículo
- osteoplastos

*i) Micrografías electrónicas (plancha 1007).*

1) ¿Cómo se observa la matriz mineralizada?

2) ¿Qué elementos de la matriz extracelular se observan en la zona no mineralizada?

**B.1: Obtención de colágeno solubilizado a partir de tendón de cola de rata.**

Disección y observación de tendones aislados

- 1.- Seccione la piel de la cola de una rata y observe las largas fibras acintadas que transcurren longitudinalmente (paquetes de tendones).
- 2.- Seccione y aísle algunos tendones y colóquelos en buffer fosfato salino.
- 3.- Realice preparados para observación microscópica: uno sin colorear o coloreado con verde de metilo (tinción nuclear), y otro coloreado con una gota de Azul Brillante de Coomasie. Use vidrios portaobjetos y cubreobjetos limpios, se recomienda lavarlos previamente con alcohol 95%.
- 4.- Observe los preparados y responda: ¿cómo se disponen las fibras de colágeno en los tendones?

Solubilización del colágeno

1.- Coloque los tendones previamente seccionados en una solución de ácido acético al 0.5%, en agitación.

2.- A los 10 minutos:

a) Observe macroscópicamente. ¿Qué cambios observa en el diámetro y en el color de los tendones luego de 10 minutos de incubación en ese medio?

b) Realice un montaje entre porta y cubreobjetos, coloreando con Azul Brillante de Coomasie y observe al microscopio.

3.- Luego de 30 minutos, realice un montaje entre porta y cubreobjetos, coloreando con Azul Brillante de Coomasie, y observe al microscopio.

¿Qué cambios registra en relación a los preparados observados antes? ¿Observa algún cambio a nivel de las fibras?

## **B.2: Polimerización del colágeno**

1. Antes de comenzar la polimerización del colágeno a partir de colágeno solubilizado, que será proporcionado por el docente, montar una gota de la solución (20 µL) entre porta y cubreobjetos, realizando la tinción con una gota de Azul Brillante de Coomassie. Es importante la limpieza de los vidrios portaobjetos y cubreobjetos (lavar previamente con alcohol 95% y secar al aire).

2.- A 400 µl de solución de colágeno solubilizado se le agregan en el siguiente orden: 100 µl de PBS 5X y 100 µl de buffer bicarbonato (0.08 M NaHCO<sub>3</sub>; 0.26 N NaOH). Esto lleva a la solución de colágeno a pH y concentración salina fisiológicos.

3.- Incubar a 37°C durante 10 minutos. A continuación, realice un preparado de la muestra teñida con Azul Brillante de Coomassie.

i) ¿Observa alguna estructura en el preparado? Describa brevemente.

ii) ¿Se observan fibras?

iii) ¿Qué técnica microscópica emplearía para determinar de qué forma polimerizó el colágeno?

iv) *Observe la micrografía 19D.* ¿Cómo relaciona estas imágenes con el experimento realizado en clase?

---

## **Parte C: Análisis y discusión de resultados experimentales publicados en artículos científicos.**

El material será proporcionado por el docente en la clase práctica