

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ORGÁNICA

TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Autora: Sara Santos Vidal

Tutora: M^a del Pilar Cabildo Miranda

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y BIO-ORGÁNICA
Julio 2017

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 4 |
| 2. Objetivos..... | 4 |
| 3. Estructura y color del colorante..... | 5 |
| 4. Tipos de enlace con el tejido | 7 |
| 4.1. Enlace iónico..... | 8 |
| 4.2. Enlace covalente | 9 |
| 4.3. Interacciones hidrofóbicas..... | 9 |
| 4.4. Enlaces de hidrógeno | 10 |
| 4.5. Fuerzas de van der Waals | 10 |
| 5. Tinción hematoxilina-eosina..... | 10 |
| 6. Hematoxilina | 14 |
| 6.1. Oxidación | 14 |
| 6.1.1. Maduración natural | 16 |
| 6.1.2. Maduración química | 17 |
| 6.2. Mordiente | 19 |
| 6.3. Enlace al tejido | 25 |
| 7. Eosina..... | 28 |
| 7.1. Síntesis de la fluoresceína | 30 |
| 7.1.1. Mecanismo de reacción de síntesis de la fluoresceína | |
| 7.1.1.1. Mecanismo de reacción a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de cloruro de zinc | 31 |
| 7.1.1.2. Mecanismo de reacción a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de ácido sulfúrico | 34 |
| 7.1.2. Estructuras prototrópicas de la fluoresceína | 35 |
| 7.2. Síntesis de la eosina | 37 |
| 7.2.1. Mecanismo de reacción de síntesis de la eosina Y..... | 38 |
| 7.2.2. Mecanismo de reacción de síntesis de la eosina B | 40 |
| 7.3. Enlace al tejido..... | 42 |
| 8. Protocolo de Tinción hematoxilina-eosina | 43 |
| 9. Conclusiones..... | 46 |
| 10. Bibliografía | 48 |

1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de las células y matrices extracelulares de los tejidos y órganos humanos son incoloras. Las características morfológicas de los tejidos de interés pueden ser examinadas con el microscopio óptico, cuando son teñidas de forma diferenciada mediante una serie de colorantes. Los colorantes son sustancias dotadas de color que son capaces de unirse de manera más o menos específica a las estructuras de los tejidos aportándoles color, debido a que los tejidos poseen la propiedad de incorporar y fijar sustancias coloreadas.

Generalmente se combina más de un colorante, siendo la tinción hematoxilina-eosina la más comúnmente utilizada en histología y esencial para reconocer diversos tipos de tejidos y cambios morfológicos que forman la base de los diagnósticos médicos.

La metodología para el estudio de la tinción de hematoxilina y eosina se ha llevado a cabo mediante la búsqueda de fuentes secundarias tales como libros, artículos, revistas y páginas de internet, así como la investigación primaria de fotografías de diferentes tejidos y órganos humanos.

2. OBJETIVOS

La finalidad general del presente trabajo es comprender la química de la tinción de hematoxilina y eosina, técnica común empleada en histología que juega un papel crítico en el diagnóstico e investigación de los tejidos y órganos humanos.

Los principales objetivos del trabajo son los siguientes:

- a) Diferenciar los conceptos de colorante, pigmento y tinte e indicar la relación entre las propiedades del colorante y su color.
- b) Distinguir los distintos tipos de enlace entre el tejido y colorante.
- c) Indicar los componentes fundamentales de la tinción de hematoxilina y eosina y explicar su función en la tinción.
- d) Señalar los principales métodos de obtención de la hemateína (producto de oxidación de la hematoxilina) y la eosina.
- e) Describir el mecanismo de reacción para la unión entre la hematoxilina y eosina con el tejido.

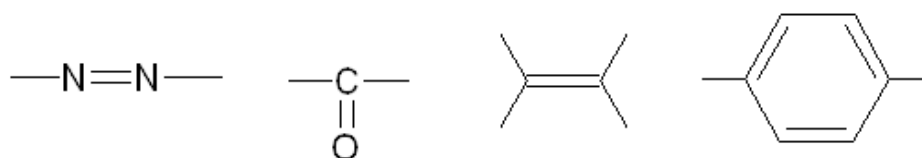
3. ESTRUCTURA Y COLOR DEL COLORANTE

El término de colorante se puede definir desde un punto de vista químico, como una sustancia que cuenta con la capacidad de absorción de distintas y concretas longitudes de onda dentro del espectro de la luz visible. Los colorantes se fijan en sustancias dándoles coloración de una forma estable, por lo que no suelen ser alteradas con factores como la luz, los oxidantes, el agua, etc. [1]. El concepto de colorante es amplio y abarcaría a los tintes y también a los pigmentos. No obstante, existen diferencias entre ambos. El tinte es un compuesto, generalmente orgánico, y su color se debe a cambios en la estructura de sus moléculas que permiten que la luz visible interaccione con determinados orbitales moleculares de las misma. Por otro lado, los pigmentos son compuestos en los que contienen metales, normalmente de transición, y su color es debido a los cambios en los orbitales *d* de los metales que forman parte de su composición [2]. En el presente trabajo nos referiremos a la hematoxilina y eosina como colorantes o tintes indistintamente debido a su estructura molecular.

Los colorantes en histología son compuestos orgánicos que se unen selectivamente a los componentes del tejido. Los tintes más modernos son sintetizados a partir de moléculas simples, normalmente benceno o alguno de sus derivados. La modificación de estos compuestos en tintes y su síntesis puede ser compleja [3]. Las características más relevantes de los colorantes son las siguientes:

a) Absorben luz en el espectro visible (400-700 nm) [4].

b) Poseen al menos un grupo cromóforo. Los cromóforos son los grupos funcionales de la molécula responsables de la absorción de la radiación electromagnética de longitudes de onda variables, dependiendo de la energía de las nubes de electrones. Por esta razón, los cromóforos alteran la energía en la nube de electrones deslocalizados del colorante, y esta alteración da como resultado que el compuesto absorba la radiación dentro del rango visible [4]. Entre los grupos cromóforos destacan los siguientes [2]:



También cabe destacar la presencia de grupos auxocromos, grupos en la molécula de colorante o tinte con influencia sobre el color (aunque el grupo responsable del color en sí es el grupo cromóforo). Los auxocromos contienen pares de electrones sin compartir que

se pueden deslocalizar junto con los electrones deslocalizados del cromóforo [5]. Los auxocromos pueden ser ácidos o básicos tales como [2]:

Ácidos: grupo fenol ($C_{aromat}-OH$), grupo carboxílico ($-COOH$), grupo sulfónico ($-SO_3H$)

Básicos: $-OH$, $-OR$, $-SH$, $-NH_2$, $-NHR$, $-NRR'$, halógeno, etc

c) Tienen un sistema conjugado por resonancia electrónica en una estructura alternada entre enlaces dobles y simples, frecuentemente en complejas estructuras cíclicas [3].

Cuando alguna de estas características carece de la estructura molecular, el color se pierde. La tabla 1 muestra las relaciones entre la longitud de onda de absorción de luz y el color absorbido/observado [4].

Tabla 1. Longitud de onda de absorción de la luz con respecto al color en colorantes orgánicos [4].

| Longitud de onda de absorción de luz (nm) | Color absorbido | Color observado |
|---|-----------------|-----------------|
| 400–435 | Violeta | Amarillo-Verde |
| 435–480 | Azul | Amarillo |
| 480–490 | Verde-Azul | Naranja |
| 490–500 | Azul-Verde | Rojo |
| 500–560 | Verde | Morado |
| 560–580 | Amarillo-Verde | Violeta |
| 580–595 | Amarillo | Azul |
| 595–605 | Naranja | Verde-Azul |
| 605–700 | Rojo | Azul-Verde |

La absorción de la energía luminosa ocurre cuando un compuesto tiene un electrón que puede ser promovido por un mecanismo "cuántico permitido" a un nivel de energía más alto. La diferencia de energía entre el estado fundamental y el estado excitado determina la longitud de onda de la luz absorbida. La energía absorbida puede ser re-emitida a una longitud de onda más larga (fluorescencia), o disipada como calor (absorbancia simple) [6].

El color de los tintes puede ser explicado a través de la energía de las radiaciones del visible que no es demasiado alta, los electrones excitables han de tener cierta movilidad. En las moléculas orgánicas los electrones π de los dobles enlaces la tienen, aunque no lo suficientemente grande. Por esta razón, es necesaria la existencia de más enlaces dobles en el grupo cromóforo de la molécula y que además estén conjugados, de esta manera los electrones π se pueden mover a lo largo del sistema conjugado, aumentando su movilidad. Es decir, que se trata de electrones deslocalizados, por lo que dan lugar a formas resonantes.

Por otra parte, en los grupos auxocromos existen átomos con pares de electrones sin compartir, que también se deslocalizan a lo largo de este sistema conjugado. Es decir, que refuerzan ese efecto de movilidad, contribuyendo a una mayor deslocalización electrónica, ya que aumentan la conjugación y con ella la movilidad de los electrones. En consecuencia, esos electrones ya son capaces de absorber radiaciones de energía y frecuencia aun más bajas [2].

4. TIPOS DE ENLACE CON EL TEJIDO

La unión del colorante y el tejido no es diferente a otro enlace químico y los mecanismos dependen de las mismas fuerzas que ocurren en los compuestos orgánicos. Las clases principales de interacciones (enlaces) son iónicas, covalentes e hidrófobas (Tabla 2). Cada tipo de enlace tiene sus propias características y fuerzas de enlace [3].

Tabla 2. Comparación de la fuerza relativa de los enlaces entre el tinte y los componentes del tejido [3].

| Tipo de enlace | Fuerza (kcal mol ⁻¹) |
|------------------|----------------------------------|
| Enlace iónico | 40 - 100 |
| Enlace covalente | 32 - 212 |

| | |
|----------------------------|-------|
| Interacciones hidrofóbicas | 4 - 8 |
| Enlace hidrógeno | 2 - 7 |
| Fuerzas de Van der Waals | 1 - 2 |

4.1. Enlace iónico

El enlace iónico es la forma de enlace más importante en la mayoría de los tintes de histología, implicando interacciones electroestáticas entre iones de carga opuesta. Uno de los iones es un ion fijado a la sección del tejido y el otro, al colorante. Las interacciones iónicas son fuerzas de largo alcance y los tintes pueden ser atraídos a los tejidos a distancias relativamente largas. Según la diferencia de cargas, ellos pueden ser repelidos como atraídos.

A continuación se describen las características que influyen en los enlaces iónicos:

a) Iones cargados negativamente y positivamente:

- Los tintes aniónicos también son llamados tintes ácidos en histología porque son derivados de colorantes ácidos y no por el pH de la solución. Todo lo que se tiñe con un tinte ácido se llama, acidofílico. Los materiales que son acidofílicos incluyen el colágeno, las células rojas de la sangre y el citoplasma de muchas células.
- Los tintes catiónicos son comúnmente llamados tintes básicos y así, los componentes teñidos de los tejidos son conocidos como basofílicos. Las sustancias que se unen a tintes básicos son los ácidos nucleicos y las mucinas ácidas.

b) Ionización del tejido

Las proteínas normalmente contienen aminoácidos básicos y ácidos, pudiéndose esperar que acepten ambos tintes. En la práctica, esto no ocurre debido a que la tinción se ha realizado a pH neutro o ligeramente ácido. A estos niveles de pH, los grupos amino de la mayoría de los aminoácidos están ionizados y los colorantes se unirán a estos grupos. Si los grupos no están ionizados, no se verán atraídos por los iones del tinte y permanecerán sin teñir.

c) Niveles de pH: la ionización de los grupos del tejido son afectados por el pH.

- A pH ácidos, la alta concentración de iones hidrógeno a favor de la ionización de los grupos amino es resultado de una fuerte tinción de las proteínas. Sin embargo, el mismo pH tendrá efecto contrario con otro tinte, como los ácidos carboxílicos de las proteínas, serán inhibidos por la ionización por las altas concentraciones de los iones hidrógeno. Ácidos fuertes, tales como los grupos fosfatos encontrados en los ácidos nucleicos y los grupos sulfato en la mucinas serán más difíciles de inhibir y se ionizarán a los niveles de pH utilizados en el tinte. Alterando el pH, se puede inhibir los tintes de la ionización, pero la total inhibición de las sales de los tintes solo ocurrirá a niveles de pH extremos.
- A pH básicos, la falta de iones hidrógeno permitirá a los grupos ácidos débiles en las proteínas ionizarse, tiñendo tanto el citoplasma con el núcleo.

d) La presencia de las sales puede afectar a la tinción: los enlaces iónicos pueden ser inhibidos por altas concentraciones de la sal. En soluciones con sales fuertes, habrá competición entre el tinte y la sal de los iones, pudiendo el colorante ser inhibido. En muchos casos, el efecto de los tintes ácidos o básicos puede verse afectado por el ion hidrógeno, cuando está compitiendo por la unión al tejido. Bajas concentraciones de la sal estarán menos inhibidas debido a que habrá una mayor concentración de tinte que de sal. Muchas de las sales pueden mejorar la tinción debido a que sus iones se unen a los grupos de tejido que anteriormente repelían a las moléculas de tinte, por tanto, al estar estos grupos neutralizados por los iones de la sal, los tintes pueden unirse al tejido [3].

4.2. Enlace covalente

Los enlaces covalentes son enlaces fuertes y no son fáciles de romper una vez formados. No parecen ser importantes en muchas de las reacciones de tinción [3].

4.3. Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas no son enlaces químicos debido a que sostienen los colorantes en los tejidos por la exclusión de agua de las regiones con grupos hidrofóbicos. La exclusión de agua estabiliza los dos grupos involucrados en los cambios de entalpía y entropía. Las interacciones hidrofóbicas son de corto alcance y no son afectadas por los agentes enlace de hidrógeno o sales. Alterando el pH puede cambiar un grupo particular de una forma hidrofílica a hidrofóbica por alteración de su ionización y este alterará la tinción con los colorantes hidrofóbicos. Las interacciones hidrofóbicas son importantes en la selectividad y juegan un papel importante en la tinción de los lípidos [3].

4.4. Enlace de hidrógeno

El enlace de hidrógeno es una fuerza de atracción entre un átomo hidrógeno de una molécula y un átomo pequeño con alta electronegatividad de otra molécula. Tienen un limitado rango y solo se formarán si los dos grupos que interaccionan están lo suficientemente juntos para ser atraídos. Los enlaces de hidrógeno no se ven afectados por el pH o las concentraciones de las sales, pero sí, por los agentes de enlace de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno juegan un papel importante en la selectividad de los tintes [3].

4.5. Fuerzas van der Waals

Las Fuerzas van der Waals son fuerzas intermoleculares de corto alcance y tienen efecto si los dos átomos implicados están entre 0.12 y 0.2 nm de distancia. Las fuerzas de van der Waals pueden ocurrir en cualquiera de los átomos y no son específicas para cualquier átomo o grupo. Si la forma de la superficie del tejido de la proteína y la forma del colorante se emparejan, se formarán un mayor número de enlaces. Así, aunque sean individualmente débiles, pueden añadir una fuerza vinculante significativa si el colorante y la proteína tiene superficies moleculares complementarias. Los enlaces van der Waals no se ven afectados por el pH, iones y los agentes de enlaces de hidrógeno [3].

5. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

La técnica de coloración de hematoxilina y eosina (H & E) es la más empleada en histología y se introdujo en 1876 [7]. La tinción se utiliza rutinariamente en los laboratorios de histopatología, ya que proporciona al patólogo/investigador una visión muy detallada del tejido. Esta información es a menudo suficiente para permitir un diagnóstico de enfermedad basado en la organización de las células y también muestra cualquier anomalía o indicadores particulares en las células reales [8].

La tinción de hematoxilina y eosina corresponde a la mezcla de hematoxilina y eosina. La hematoxilina (Fig. 1A) en sí misma no es un colorante, por lo que tiene que ser oxidada a la hemateína (Fig. 1B), sin embargo, el producto empleado en la tinción de la hematoxilina y eosina es un complejo formado a partir de la hemateína y los iones de aluminio, conocido como hemateína de alumbre o hemalumbre (Fig. 1C).

El hemalumbre, colorante básico, está formado por moléculas que contiene grupos catiónicos que son los responsables de la carga global básica del colorante. La

hemateína de alumbre se utiliza para colorear las estructuras ácidas de un color azul-púrpura, principalmente los ácidos nucleicos presentes en los núcleos celulares [9]. El núcleo de los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso tienen gran afinidad por el hemalumbre debido a su alto contenido en ADN y ARN, respectivamente (Fig. 3) [10].

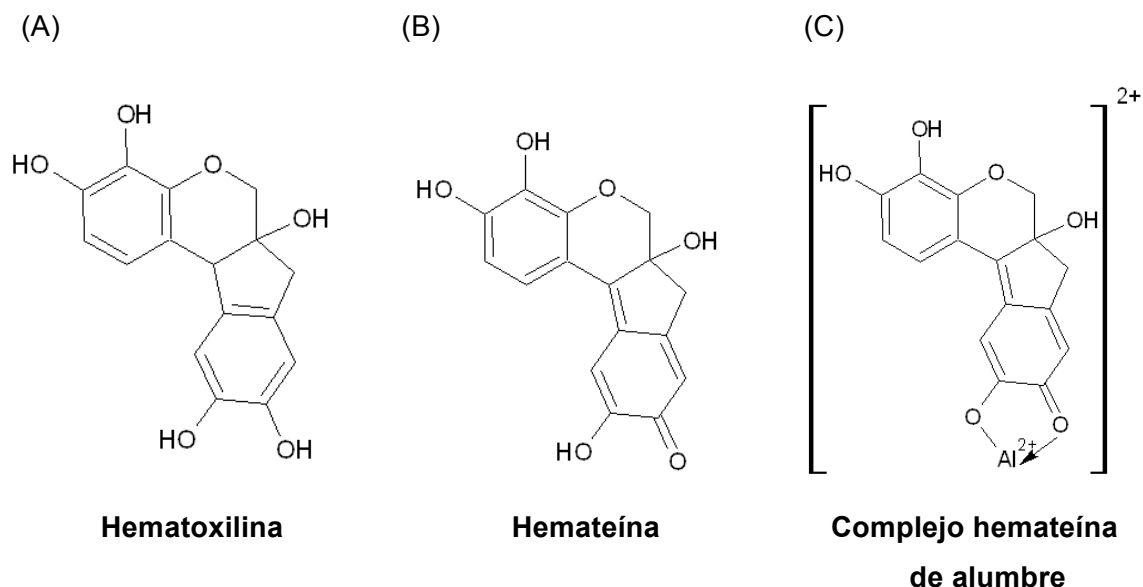


Figura 1. Estructura molecular de Hematoxilina (A), Hemateína (B) y Complejo hemateína de alumbre (C) [7].

La eosina Y y B (Fig 2A y B, respectivamente), por el contrario, es un colorante ácido, que contiene grupos fuertemente aniónicos y en general, tiñe estructuras proteicas básicas contenidas en los citoplasmas celulares, fibras del intersticio y membranas basales en una tonalidad rosácea (Fig. 3) [10].

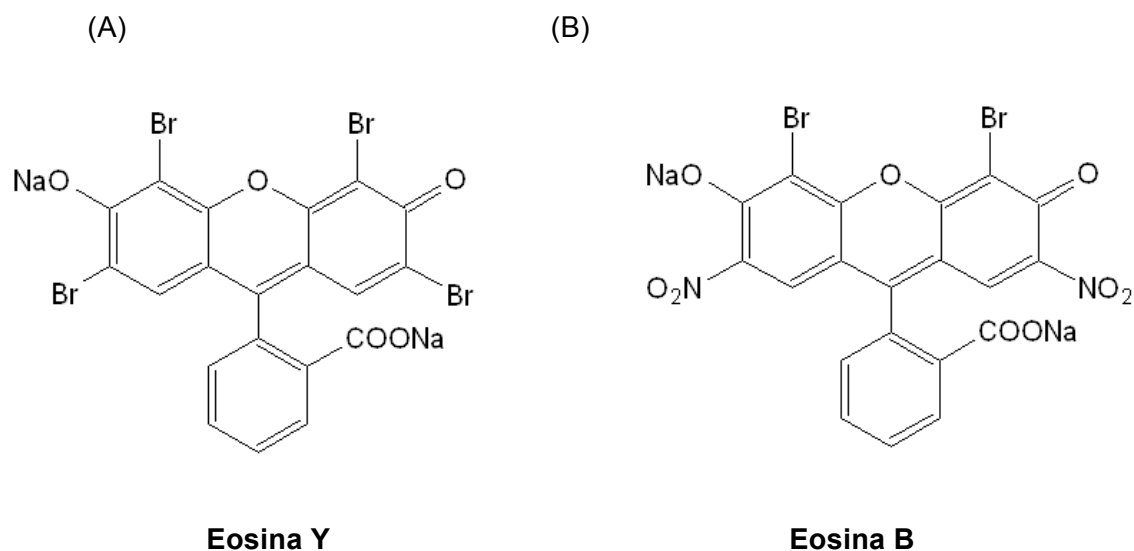


Figura 2. Estructura molecular de la sal disódica de Eosina Y (A) y Eosina B (B) [7].

En la figura 3 se muestra una sección de piel observada en un microscopio óptico con una lente de 60 aumentos, en donde la hematoxilina tiñe los núcleos de las células en azul a púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa al rojo. En la tabla 3 se compara la tinción de hematoxilina y eosina en distintos tipos de muestras, colon, intestino delgado y piel, observadas con lentes de 10 y 40 aumentos.

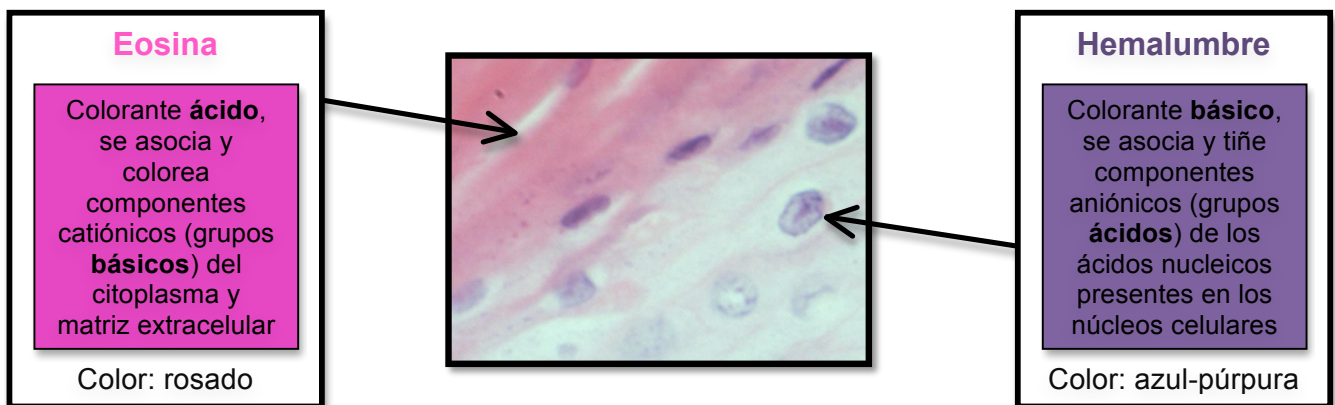
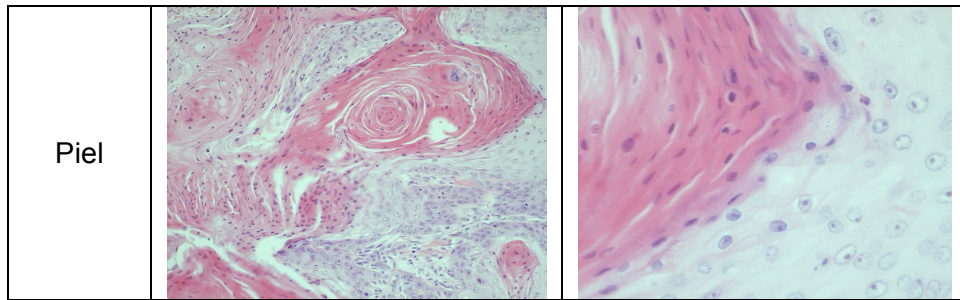


Figura 3. Sección de muestra de piel observada en un microscopio óptico con una lente de 60 aumentos. Hemalumbre, colorante básico, se une a los grupos ácidos del tejido como los núcleos de las células y la eosina, colorante ácido, tiñe estructuras proteicas básicas contenidas en los citoplasmas celulares. La imagen es cortesía del grupo Orchid de Queen Mary University of London, Londres, Reino Unido.

Tabla 3. Tinción de hematoxilina y eosina. Las imágenes corresponden a secciones de muestras de colon, intestino delgado y piel observadas con un microscopio óptico con lentes de 10 y 40 aumentos. Las imágenes son cortesía del grupo Orchid de Queen Mary University of London, Londres, Reino Unido.

| Tipo de muestra | Aumento x10 | Aumento x40 |
|-------------------|-------------|-------------|
| Colon | | |
| Intestino delgado | | |



Como se ha argumentado en el apartado 3, la hematoxilina y la eosina, ambas moléculas orgánicas, tienen un sistema conjugado de dobles enlaces, que representan orbitales moleculares altamente deslocalizados extendiéndose sobre los anillos aromáticos.

La emisión de luz de los colorantes en disolución no ocurre a una longitud de onda determinada sino que es distribuida sobre un amplio rango de longitudes de onda, exhibiendo picos amplios más bien que líneas de emisión estrechas (Fig. 4). La amplitud de las bandas es debido a las moléculas individuales que tienen diferentes energías de rotación cinética y de enlace, así como diferentes interacciones con múltiples moléculas de disolvente.

La luz blanca incidente, contiene todas las longitudes de onda en el espectro visible, pasa a través del área teñida. La hematoxilina absorbe la luz roja de baja energía debido al sistema de dobles enlaces conjugados es más grande que el de la eosina, por lo que los componentes teñidos del tejido por la hematoxilina son azules. Por el contrario, la eosina absorbe el azul de la luz blanca incidente, permitiendo el paso del color rojo para ser detectado [12].

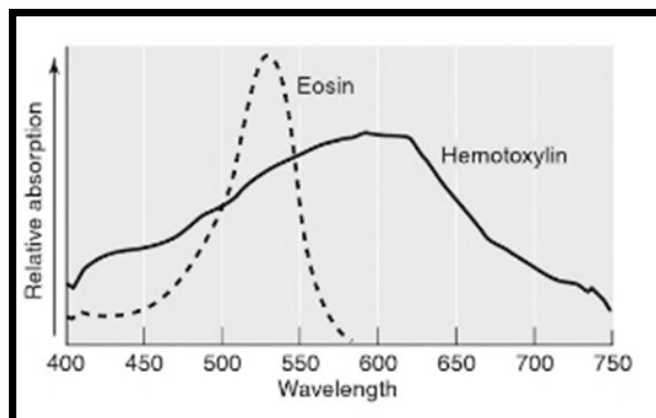


Figura 4. Espectro de absorción de eosina y hematoxilina. Los colorantes en disolución tienen anchas bandas de absorción representado una distribución de la absorción a una específica longitud de onda [12]

6. HEMATOXILINA

La hematoxilina es un colorante natural y se obtiene del duramen del árbol *Haematoxylum campechianum* (Fig. 5). El nombre de la hematoxilina se deriva etimológicamente de dos palabras griegas, *hematos* que significa sangre y *xylos* que significa árbol [13].

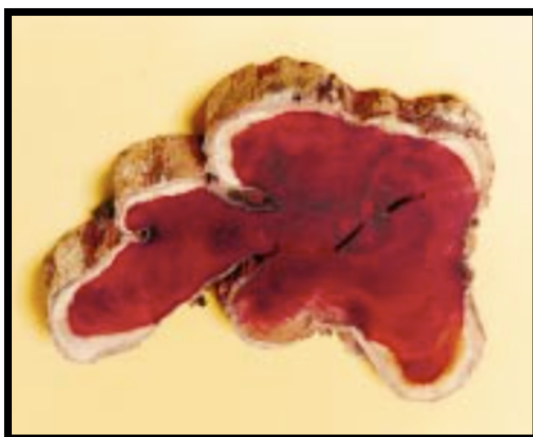


Figura 5. Sección transversal del tronco *Haematoxylum campechianum* de las Islas Caimán. La dimensión más larga puede ser de aproximadamente 15 cm [14]

La hematoxilina fue descubierta por los exploradores españoles en la Península de Yucatán (en México moderno) en el siglo XVI. Los indígenas mayas lo habían utilizado anteriormente para teñir algodón y para detener la diarrea [15]. Posteriormente, se desarrolló un activo comercio relacionado con el cultivo y la preparación de hematoxilina para su uso en el teñido de tejidos en Europa. Más tarde, los científicos desarrollaron una amplia gama de técnicas para teñir y mostrar diferentes componentes celulares [16].

La hematoxilina se extrae a partir de las raíces y del tronco de los árboles recién cortados, liberando una solución naranja-rojiza (producto bruto) con agua caliente o vapor de agua, que a continuación se purifica mediante extracción con éter, se seca y se recristaliza en agua. Alternativamente, el extracto acuoso se precipita en una solución con urea. [13] [15] [17].

6.1. OXIDACIÓN

Uno de los dos principales componentes de la tinción nuclear de hematoxilina y eosina es la hemateína de alumbre o hemalumbre que está compuesta por el producto oxidado de la hematoxilina, hemateína, e iones de aluminio. Por comodidad, nos referimos a la hemateína de alumbre como hematoxilina [18].

La hematoxilina ($C_{16}H_{14}O_6$, Fig. 6A) no presenta ningún grupo cromóforo y en sí misma no es un colorante, por lo que tiene que ser oxidada a hemateína ($C_{16}H_{12}O_6$, Fig. 6B). La conversión de la hematoxilina a hemateína se realiza mediante la exposición de la solución al oxígeno atmosférico o por el uso de oxidantes, a este proceso se le llama *ripening* (maduración) [13]. La mayoría de los laboratorios compran las soluciones preparadas y químicamente oxidadas, o agregan oxidantes químicos a sus propias soluciones. Algunos tecnólogos creen que las soluciones naturalmente oxidadas proporcionan una tinción más satisfactoria que aquellas químicamente oxidadas, pero otros tecnólogos ven poca diferencia entre ambas soluciones. Ciertamente, no hay datos experimentales publicados para apoyar una u otra [18].

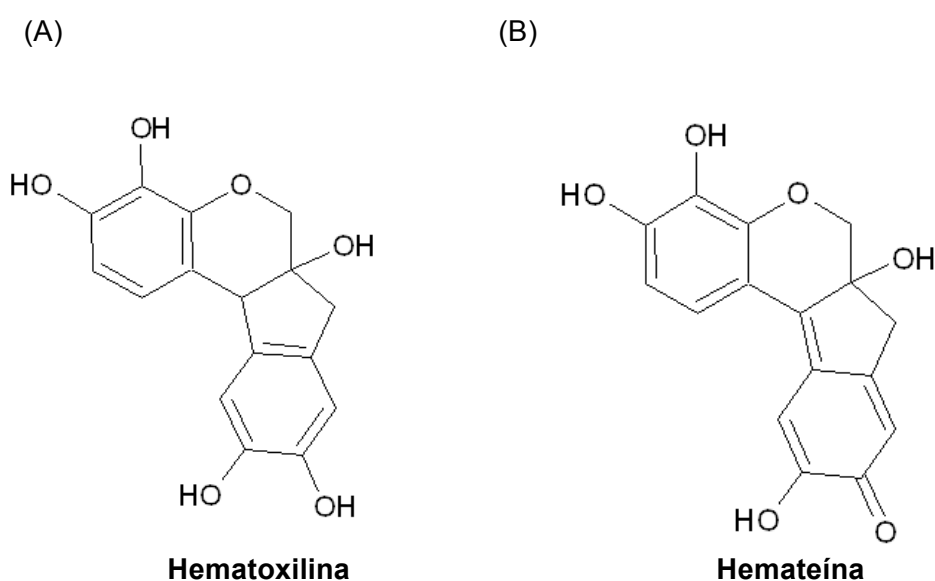


Figura 6. Estructura molecular de Hematoxilina (A) y Hemateína (B) [18]

La oxidación tiene lugar por la eliminación de dos átomos de hidrógeno y el reordenamiento de los enlaces, introduciendo una estructura de anillo para-quinoides, proporcionando color (Fig. 7). También, hay otros átomos de hidrógeno que podrían ser reemplazados, es decir, pueden ser oxidados. Cuando esto sucede, el colorante generalmente se vuelve inadecuado para su uso, por tanto este proceso de sobre-oxidación se intenta prevenir [3, 18].

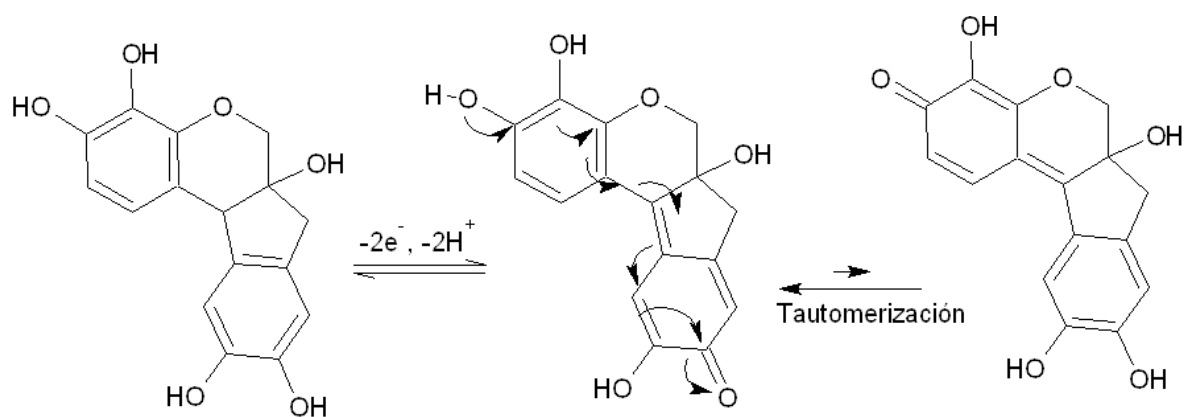


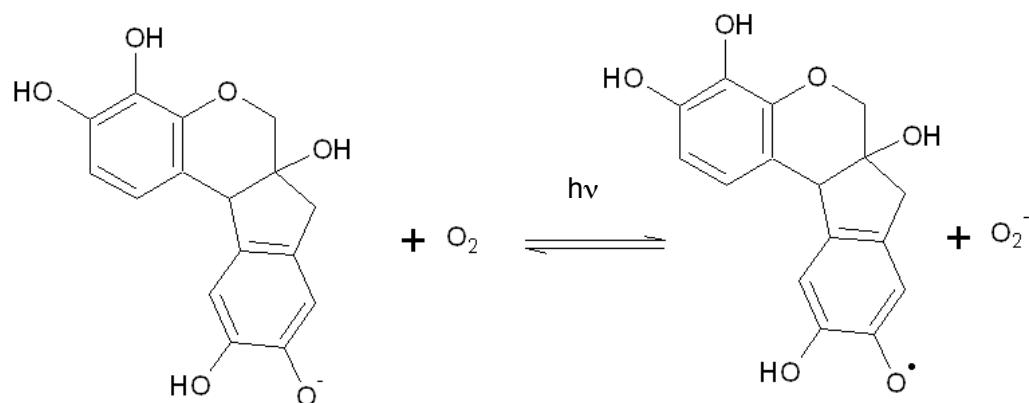
Figura 7. Mecanismo de oxidación de Hematoxiline a Hemateína [19]

6.1.1. Maduración natural

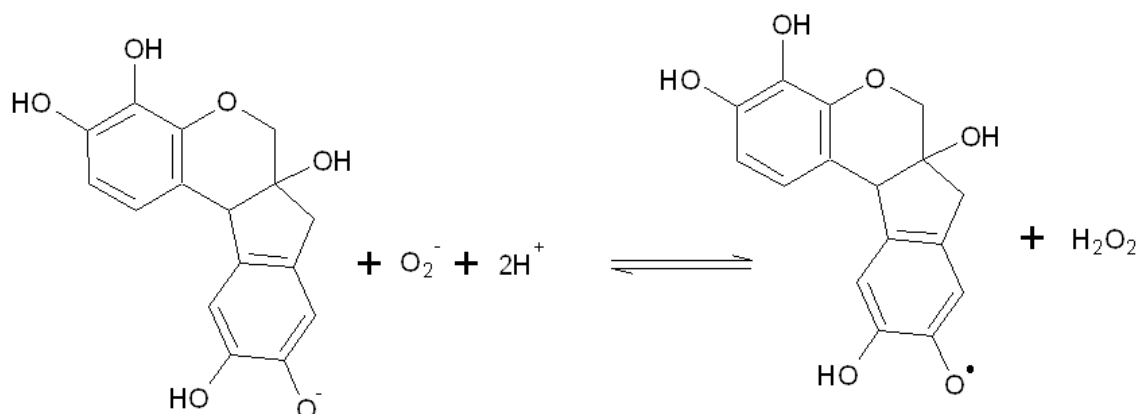
La oxidación natural y atmosférica era una práctica comúnmente utilizada en el pasado, con la creencia de que proporcionaba una solución más fiable y duradera. La maduración natural se lleva a cabo colocando la solución de hematoxiline en un matraz de gran tamaño, cerrándolo con un tapón sujeto con algodón, así se permite la entrada de aire. El matraz con la solución de hematoxiline se deja en un lugar cálido, luminoso y aireado para que la oxidación tenga lugar, agitándose periódicamente. La oxidación puede tardar varios meses, y se determina probando la solución de vez en cuando. Cuando la solución da una tinción satisfactoria, se transfiere a una botella marrón y se tapa firmemente para su almacenamiento en la oscuridad para retardar la oxidación adicional [13].

La autooxidación de la hematoxiline es una serie compleja de reacciones en cadena que se describen a continuación:

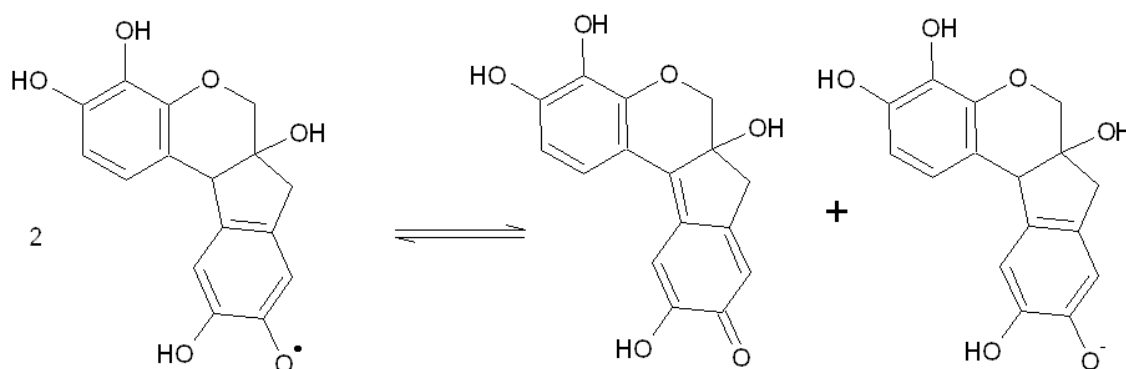
a) **Etapas de iniciación:** se caracteriza por la formación de radicales mediante el consumo de energía procedente de agentes prooxidantes como son las radiaciones de la luz.



b) **Etapa de propagación:** se refiere a la complejidad de reacciones adicionales que dan lugar a la producción de más radicales libres y compuestos oxigenados.



c) **Etapa de terminación:** comprende la recombinación de diversas especies de radicales libres para producir productos finales estables [20][21].



6.1.2. Maduración química

La oxidación química de la hematoxilina se lleva mediante el empleo de agentes oxidantes químicos. En la tabla 4 se muestran los agentes oxidantes más utilizados y la cantidad recomendada por gramo de hematoxilina. El más común es yodato de sodio a aproximadamente 40-150 mg por cada gramo de hematoxilina para la oxidación completa.

El óxido mercúrico era a menudo recomendado como oxidante, sin embargo, debido a que es muy tóxico, se recomienda ser evitado siempre que sea posible. Si se debe utilizar, se deben tomar las precauciones de seguridad y la solución utilizada debe eliminarse de acuerdo con las regulaciones del gobierno para evitar la contaminación del medio ambiente [13].

Tabla 4. Agente oxidante usado en la oxidación de la hematoxilina y la cantidad recomendada por gramo de hematoxilina [13].

| Agente oxidante | Fórmula | Cantidad de oxidante recomendado por gramo de hematoxilina |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Yodato de sodio | NaIO ₃ | 40 – 150 mg |
| Óxido mercúrico | HgO | 100 mg |
| Permanganato de potasio | KMnO ₄ | 175 mg |
| Periodato de potasio | KIO ₄ | 50 mg |
| Peróxido de hidrógeno | H ₂ O ₂ | 2 mL |

La oxidación de la hematoxilina se realiza mediante el calentamiento de una solución de hematoxilina con un agente oxidante. La oxidación transcurre rápidamente y la solución puede ser utilizada tan pronto como se enfría. La oxidación puede tener lugar a temperatura ambiente durante algunos días con la mayoría de los agentes oxidantes, incluido el yodato de sodio. Sin embargo, la solución se puede preparar rápidamente mediante ebullición, sin tener efectos negativos sobre la tinción [13].

La reacción de oxidación de la hematoxilina utilizando yodato de sodio se muestra en la figura 8. Tres moléculas de hematoxilina son oxidadas a tres moléculas de hemateína, mediante eliminación de dos átomos de hidrógeno y posterior reordenamiento de los enlaces y una molécula de yodato se ha reducido a yoduro, pasando de estado de oxidación +5 a -1, respectivamente.

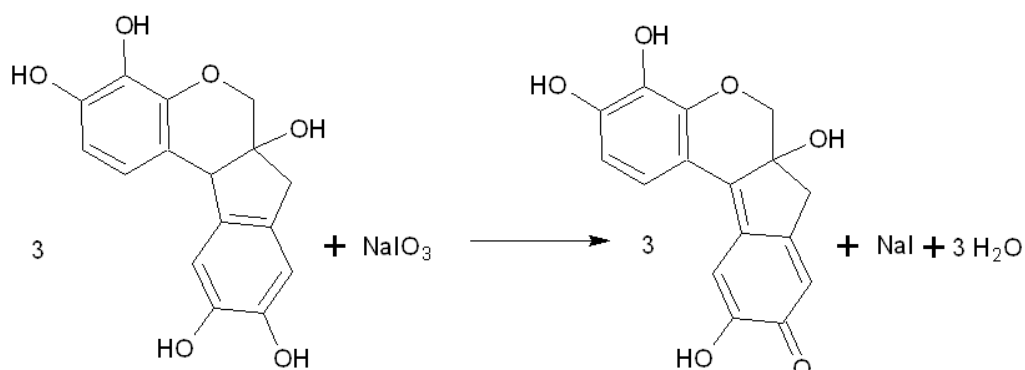


Figura 8. Conversión de hematoxilina a hemateína empleando yodato de sodio como agente oxidante [22].

6.2. MORDIENTE

El mordiente es un compuesto que no tiñe, aunque mejora la unión del colorante, siendo el mordiente capaz de mediar una interacción tinte-tejido [3]. La palabra mordiente (participio presente de la palabra francesa *mordre*, morder) fue introducida a fines del siglo XVIII para denotar las sustancias utilizadas para fijar colorantes a tejidos textiles [7].

F. Böhmer de Würzburg, Alemania, introdujo por primera vez la hematoxilina como tinte histológico en 1865, aunque su mayor éxito se debió al uso de cristales de hematoxilina en combinación con el alumbre, como frecuentemente se habían utilizado para teñir textiles. En 1868, H. Frey de Múnich, Alemania, demostró que se podían obtener resultados similares mezclando el mordiente con la solución en la que los tejidos serían fijados antes de ser teñidos [23]. El término ha sido usado para algunas de las tinciones histológicas, su uso ha sido aplicado en condiciones donde el mordiente actúa como unión entre el tejido y el colorante, en donde el mordiente es una sal metálica (Fig. 9) [3].

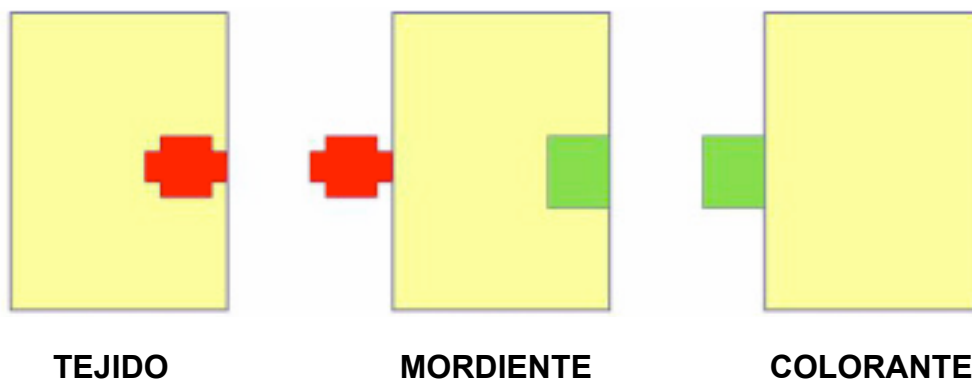


Figura 9. El colorante puede solo unirse fuertemente al tejido cuando el mordiente actúa como unión entre los dos [11]

El mordiente es un ión metálico polivalente que forma complejos de coordinación mediante el enlace covalente dativo con ciertos colorantes. Los tres metales más comúnmente usados como mordiente son el aluminio, usualmente de alumbre de amonio o potasio; hierro, a partir de cloruro férrico o sulfato de amonio férrico (o alumbre de hierro); y wolframio, del ácido fosfotúngstico. Se han utilizado otros metales, pero el aluminio es el mordiente habitual para la tinción nuclear general con hematoxilina y eosina [18]. En la figura 10 se muestra el complejo de coordinación entre la hemateína y el aluminio, complejo conocido como hemateína de alumbre o hemalumbre [13].

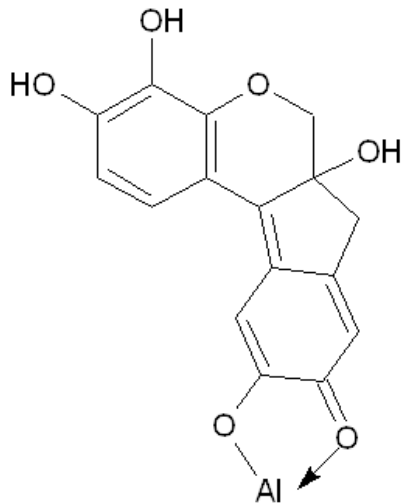
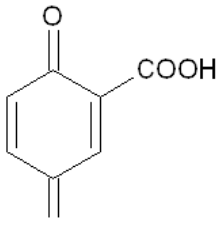
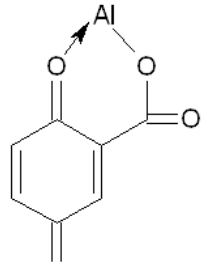
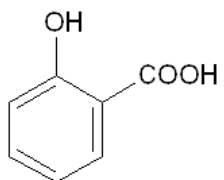
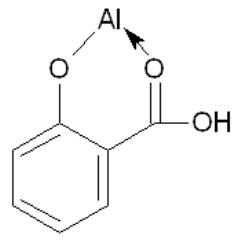
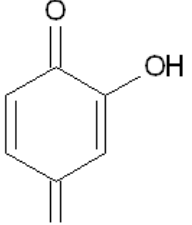
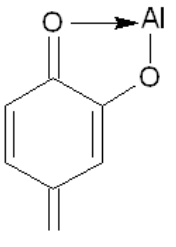
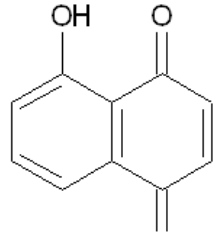
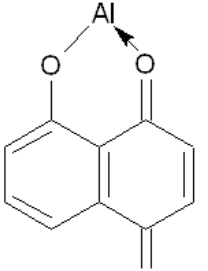


Figura 10. Complejo de coordinación entre la hemateína y el aluminio [13]

El complejo de coordinación (o quelato) formado a partir de un colorante y un metal se llama ligo, *lake* en inglés. Este término deriva de la palabra *lac*, un tinte mordiente obtenido de un insecto en la India, y del cual se obtiene la goma laca. Con el tiempo el término *lac* ha cambiado a *lake* y ha llegado a ser el término genérico para todos los complejos de colorante-mordiente [18].

Hay cuatro configuraciones frecuentemente encontradas en la unión entre colorantes y mordientes, como se puede apreciar en la tabla 5. Hay otras, particularmente empleadas en la industria textil, pero casi todas las uniones entre el colorante y el mordiente usados en la tinción biológica tienen una de estas configuraciones. Como se puede observar en la tabla 5, en cada una de las configuraciones están implicados un grupo carbonilo (del grupo funcional cetona o ácido carboxílico) y un grupo hidroxilo (unido al benceno o formando parte de un grupo carboxilo). El enlace covalente se forma entre el oxígeno del grupo hidroxilo y el metal (enlace recto), mientras que el enlace de coordinado se forma entre el oxígeno del doble enlace, como donante de electrones, y el metal (flecha). La única diferencia entre ellas es la fuente de los electrones compartidos. [13].

Tabla 5. Configuraciones más comúnmente encontradas en la unión entre colorantes y mordientes [13].

| Estructura | Lake |
|---|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

El ion aluminio (Al^{+3}) tiene valencia tres, por tanto, es posible que las moléculas colorante y las células del tejido puedan unirse al metal. A menudo se observa que la adición de un mordiente a una solución de colorante da como resultado un cambio brusco y dramático en el color. Esto se debe a la incorporación del átomo metálico en el sistema de electrones deslocalizados del colorante. Los metales tienen niveles de energía relativamente bajos, por lo que su incorporación en un sistema deslocalizado da lugar a una disminución de la energía total. La absorción del lago, y por lo tanto su color.

Como se ha mencionado anteriormente, en la tinción de hematoxilina y eosina, las soluciones que contienen hematoxilina y un alumbre, y se llaman hemalumbre o soluciones de hemateína de alumbre. Se han sugerido muchas fórmulas y varían en la cantidad de hematoxilina, la cantidad y tipo de sales de aluminio, disolventes, agentes oxidantes y estabilizantes (Tabla 6).

Los tres elementos necesarios para producir una tinción nuclear efectiva con la hemateína de alumbre son:

- a) Colorante: hematoxilina.
- b) Mordiente: una sal de aluminio como el alumbre de amonio o potasio.
- c) Disolvente: agua es el más simple.

Además de estos tres elementos, se pueden añadir otros componentes para modificar o facilitar la tinción:

- a) Agentes oxidantes para oxidar la hematoxilina en hemateína.
- b) Ácidos para ajustar el pH y prolongar la vida de la solución, debido a que pueden afectar la selectividad de la tinción nuclear.
- c) Estabilizadores para inhibir la oxidación posterior una vez que se ha formado la hemateína.
- d) Adiciones al disolvente, a menudo para inhibir la evaporación o la precipitación.

Las mezclas con una elevada proporción de aluminio-hemateína tiñen las secciones lentamente. Esto se llama tinción progresiva. Las soluciones con proporciones más bajas de aluminio-hemateína colorean rápidamente todos los componentes del tejido. La coloración selectiva de los núcleos se consigue entonces por diferenciación (también denominada desecación) en un ácido mineral diluido tal como 0,1 M HCl (pH 1,0), descomponiendo los complejos en iones de hemateína y aluminio y acelerando la posterior oxidación de la hemateína a otros compuestos. La tinción nuclear selectiva lograda por diferenciación se denomina tinción regresiva [13].

Dos de las mezclas aluminio-hemateína más comunes son las de Mayer (tinción progresiva) y Harris (tinción regresiva) y sus componentes se muestran en la tabla 6 [11].

Tabla 6. Componentes de la mezcla aluminio: hemateína [11].

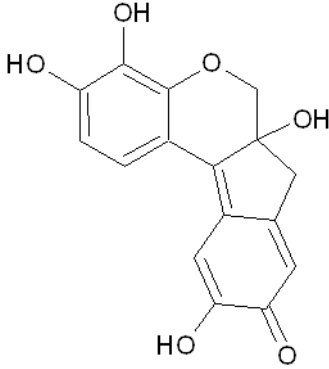
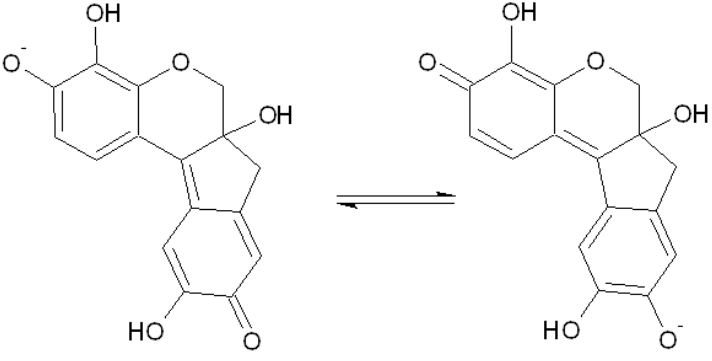
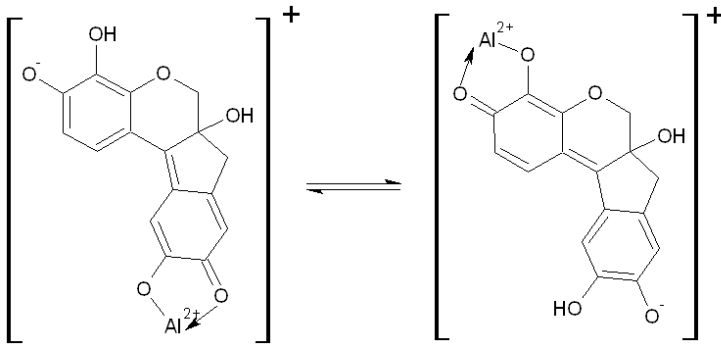
| | MAYER | HARRIS |
|----------------------|-------------------|-----------------------------|
| Colorante | Hematoxilina | Hematoxilina |
| Oxidante | Iodato de sodio | Óxido de mercurio |
| Mordiente | Alumbre de amonio | Alumbre de potasio o amonio |
| Ácido | Ácido cítrico | Ácido acético |
| Estabilizador | Hidrato de cloral | Alcohol absoluto |
| Disolvente | Agua | Agua |

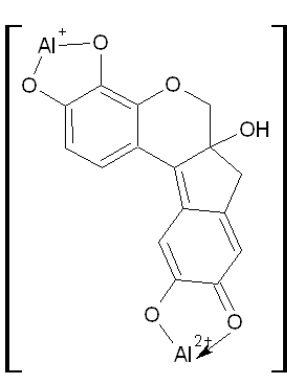
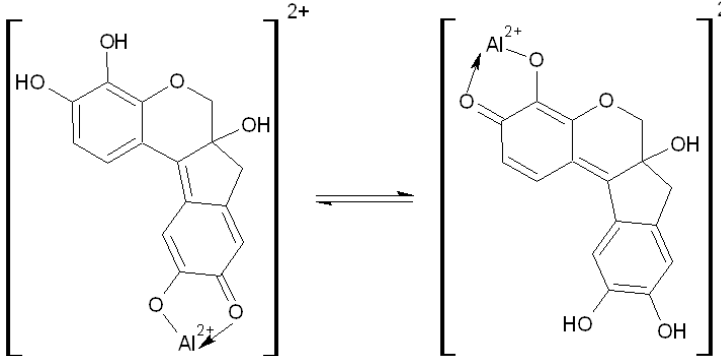
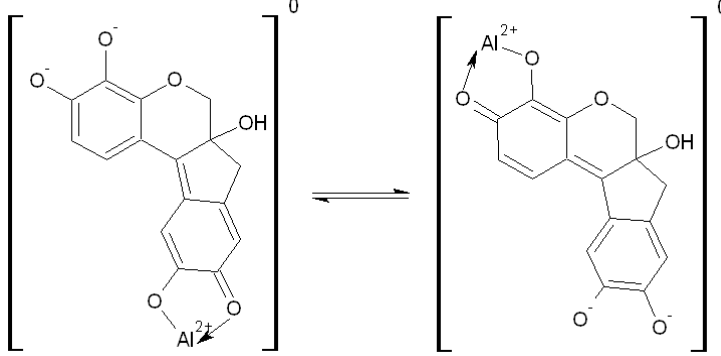
La configuración de la hemateína facilita la formación de complejos de coordinación con metales. De este modo, el ion aluminio puede ser percibido como un enlace, o puente, entre la hemateína aniónica y un grupo de fosfato cargado negativamente de ARN y ADN en las células [13].

Las composiciones químicas de las soluciones que contienen los iones de hemateína y aluminio han sido investigadas por electroforesis y por espectrofotometría en soluciones tampón acuosas, observando cuatro especies altamente coloridas en diferentes valores de pH [7].

Los estudios muestran la existencia de complejos catiónicos de hemateína-aluminio, principalmente el rojo $[\text{Hemateína-Aluminio}]^{2+}$ a pH 2,6, es la acidez adecuada para las soluciones de tinción. $[\text{Hemateína-Aluminio}]^{3+}$ es un complejo azul soluble a pH 4,7 y cambia a un azul insoluble cuando el pH se eleva [21]. Estos datos se muestran en la tabla 7 en el que se incluyen la hemateína, su anión y los complejos con aluminio en un rango de pH observado [23].

Tabla 7. Estructura y rango de pH observado para la hemateína, su anión y los complejos con aluminio [23].

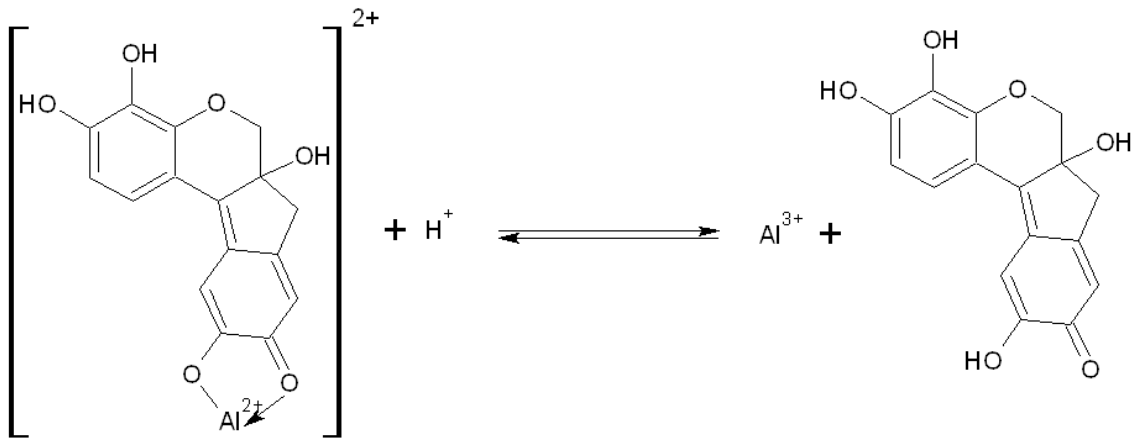
| Especie | Estructura | Rango de pH observado |
|-----------------------------------|--|-----------------------|
| Hemateína |  <p>The structure shows a central pyrrole ring substituted with a benzene ring (bearing two hydroxyl groups) and a five-membered ring (bearing one hydroxyl group). This central ring is further substituted with a six-membered ring (bearing one hydroxyl group and a carbonyl group).</p> | 4.70 – 8.06 |
| Hemateína monoanión |  <p>Two chemical structures of the hematein monoanion are shown, connected by equilibrium arrows. The first structure has a negative charge on the phenolic oxygen of the benzene ring. The second structure has a negative charge on the phenolic oxygen of the six-membered ring.</p> | 4.70 – 8.06 |
| [Hemateína-Aluminio] ⁺ |  <p>Two chemical structures of the hematein-aluminum complex are shown, enclosed in brackets with a positive charge superscript. The first structure shows the aluminum ion coordinated to the carbonyl oxygen of the six-membered ring. The second structure shows the aluminum ion coordinated to the phenolic oxygen of the benzene ring.</p> | 4.70 |

| | | |
|------------------------------------|--|-------------|
| [Hemateína-Aluminio] ³⁺ |  | 2.60 – 4.70 |
| [Hemateína-Aluminio] ²⁺ |  | 2.63 – 4.58 |
| [Hemateína-Aluminio] |  | 8.70 |

6.3. ENLACE AL TEJIDO

La solución de tinción contiene el complejo [Hemateína-Aluminio]²⁺ y un exceso de iones aluminio libres. El equilibrio de hemalumbre en disolución se muestra en la figura 11, en donde el complejo [Hemateína-Aluminio]²⁺ se encuentra en equilibrio con el ion aluminio y la hemateína, y esta se encuentra en equilibrio con la hemateína monoanión [7].

(A)



(B)

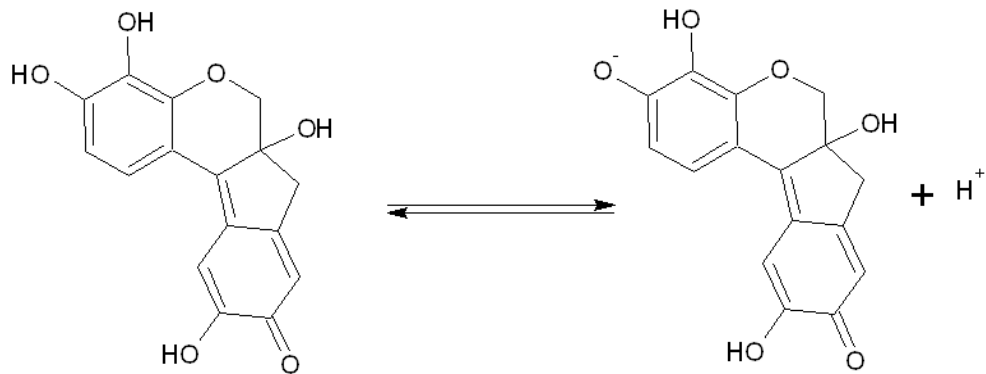
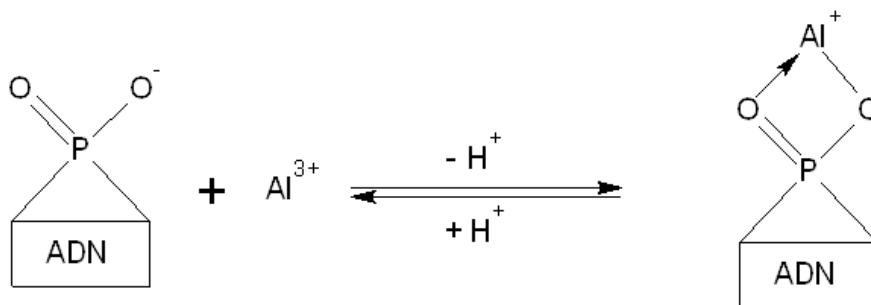


Figura 11. A) Reacción de equilibrio del complejo [Hemateína-Aluminio]²⁺ y el ion aluminio y la hemateína. B) Reacción de equilibrio de la hemateína y la hemateína monoanión [7]

El mecanismo tradicional propuesto para unir la hemateína a los núcleos celulares, implica la unión covalente entre los grupos hidroxilo de los fosfatos del ADN y el aluminio, formando un complejo quelante, y posterior unión del complejo a las moléculas de la hemateína (Fig. 12) [7].



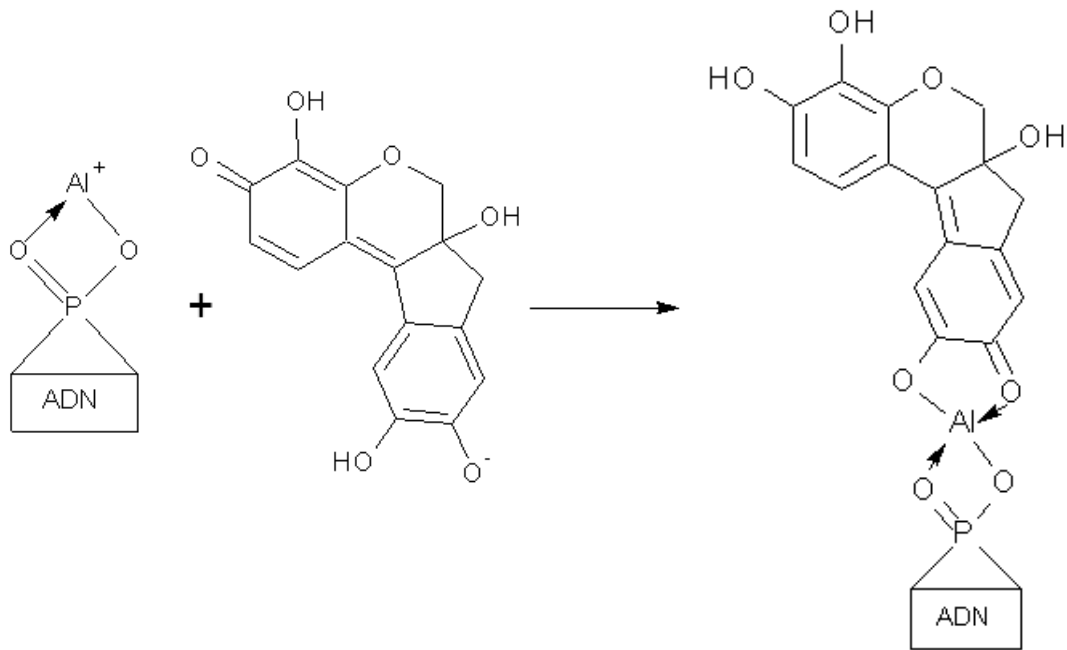


Figura 12. Mecanismo tradicional de unión entre la hemateína y el tejido [7]

Los mecanismos de unión al tejido fueron estudiados con diferentes experimentos en los que, por ejemplo, las secciones de muestra se tratan primero con una solución de una sal de aluminio y luego con una solución de hemateína. Las secciones se colorean, pero si a continuación, se enjuagan en un ácido mineral diluido, la tinción subsiguiente de la hemateína se limita a los núcleos. Estas observaciones sugieren que los ácidos rompen los enlaces entre el tejido y el metal, y los enlaces entre los tejidos y los metales resisten los ácidos más fuertemente en los núcleos que en otros lugares.

Los iones Al^{3+} de la solución son atraídos fuertemente a los aniones fosfato del ADN, con los que forman complejos de coordinación; debido a que los grupos fosfato de los nucleótidos del ADN son más ácidos (existiendo como aniones a pH relativamente más bajo) que los grupos carboxilo de proteínas en citoplasma y tejido conectivo. Cada átomo de aluminio forma también un complejo con dos oxígenos adyacentes de hemateína, de modo que el átomo metálico llega a interponerse entre el ADN y el colorante. Las interpretaciones más recientes tienen el catión del complejo [Hemateína-Aluminio] $^{2+}$ uniéndose directamente al fosfato de ADN, dando el mismo producto (Fig. 13). Ambos mecanismos no son mutuamente excluyentes [7].

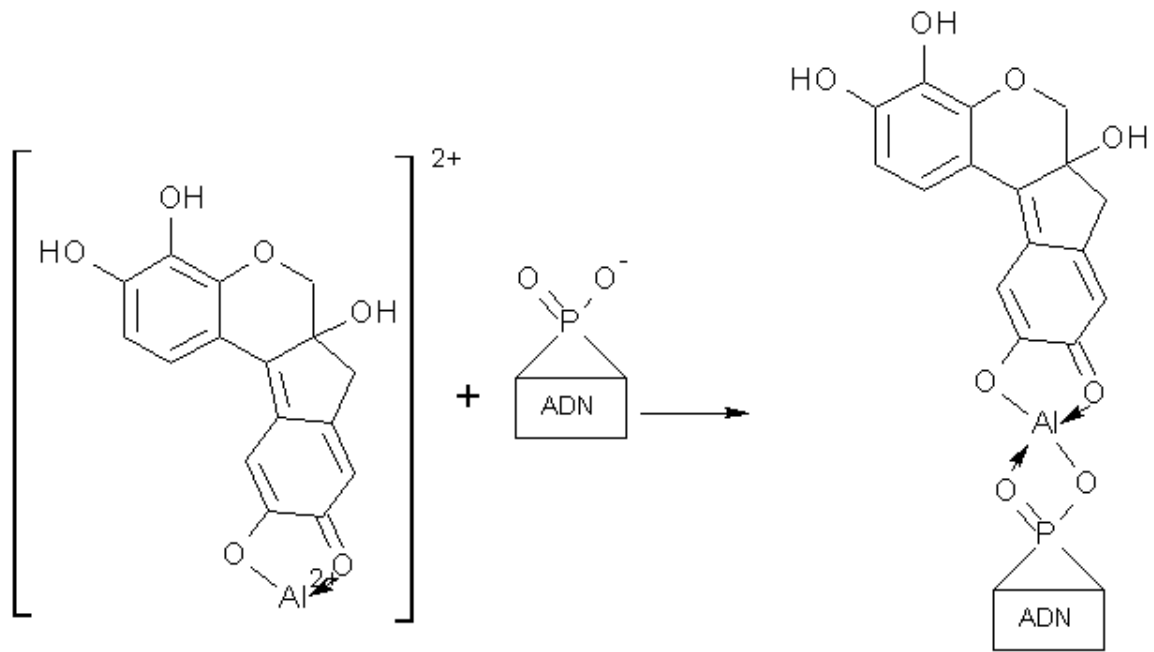


Figura 13. Mecanismo de unión entre el hemalumbre y el tejido [7]

Estas investigaciones apoyan los fundamentos de atracción iónica entre los cationes del tinte-metal y los aniones del ADN, seguido por la formación de fuertes enlaces covalentes de metal y fosfato.

Tanto los enlaces de hidrógeno como las fuerzas de Van der Waals pueden participar en el enlace con el tejido, pero como se ha mencionado en apartados anteriores son enlaces relativamente débiles y se eliminarán fácilmente con alcohol ácido [13].

7. EOSINA

La eosina es un colorante citoplasmático frecuentemente utilizado como contracolor [3]. La eosina cambia los núcleos teñidos por el hemalumbre de un color azul a púrpura. Este cambio de color puede ser debido a la atracción de aniones de eosina a las cadenas laterales de los aminoácidos cargados positivamente del ADN [7]. La eosina también se usa como identificador de diferentes tipos de células entre los distintos tipos de fibra del tejido conectivo y de las matrices [24].

La eosina pertenece al grupo de los colorantes llamados fluoronas que derivan de la fluoresceína ($C_{20}H_{12}O_5$, Fig. 14A) [13]. La fluoresceína que se ha utilizado como colorante fluorescente de identificador de anticuerpos, aunque es menos empleada en histología [3]. Su sal de sodio se llama uranina ($C_{20}H_{10}O_5Na_2$, Fig. 14B) [13].

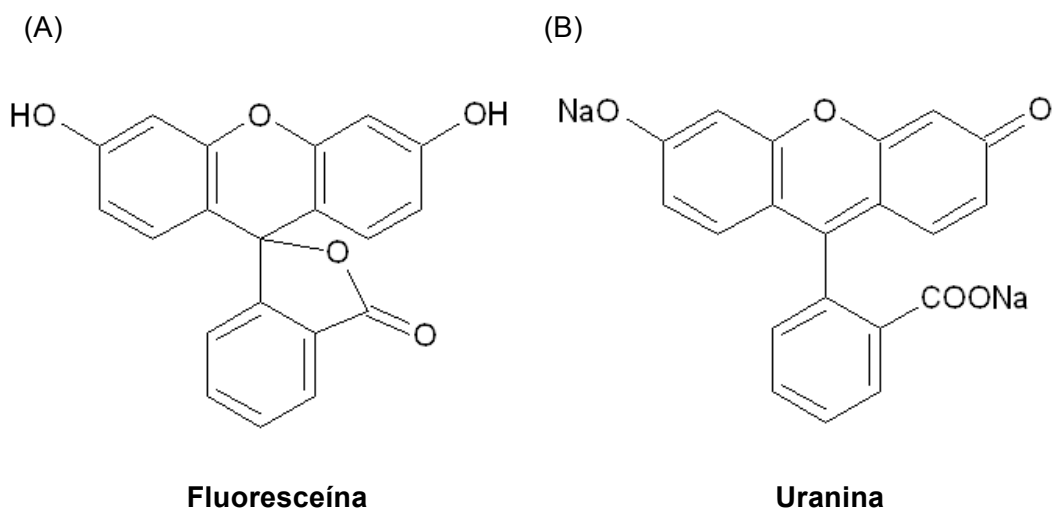
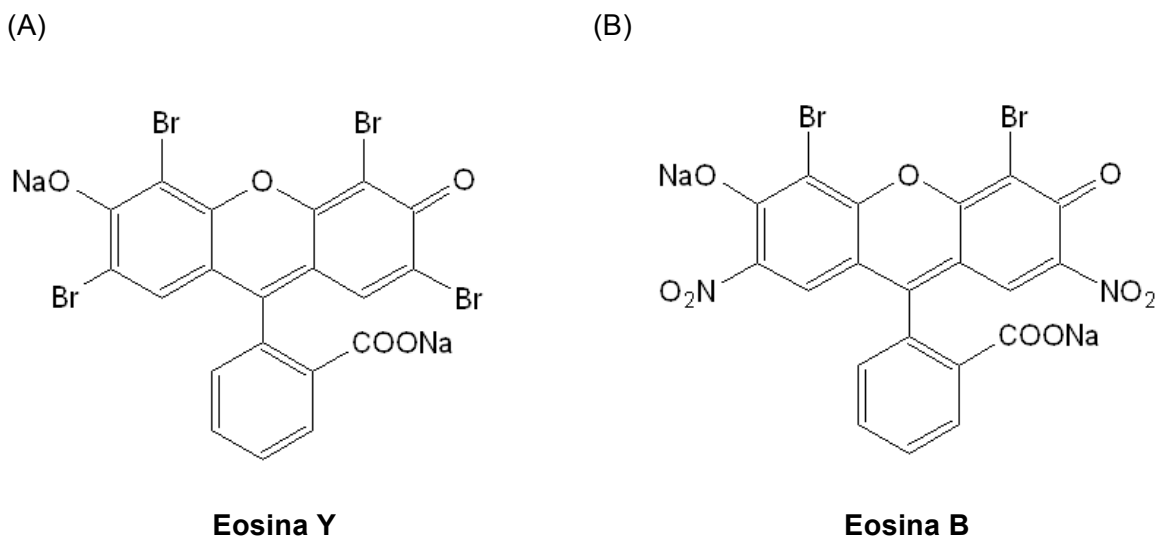
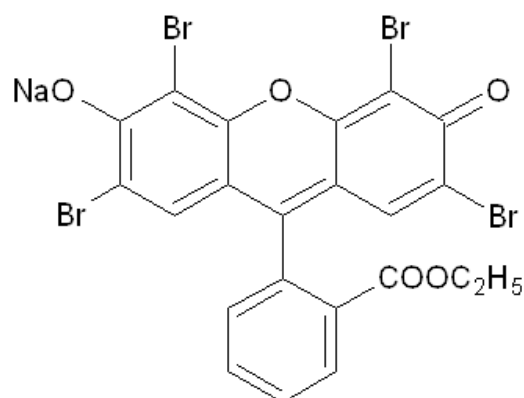


Figura 14. Estructura molecular de fluoresceína (A) y uranina (B) [13].

La eosina se sintetiza a partir de la fluoresceína. Mediante la sustitución de los hidrógenos por grupos halógenos o por grupos nitro en la fluoresceína, se obtiene una variedad de tonalidades, desde amarillo hasta azul; como por ejemplo, la eosina Y “*yellowish*” ($C_{20}H_6O_5Br_4Na_2$, Fig. 15A) cambia a eosina B “*bluish*” ($C_{20}H_6N_2O_9Br_2Na_2$, Fig. 15B), si los grupos bromo en posiciones 2' y 7' son sustituidos por grupos nitro [3]. Hay una variante de la eosina y es etil eosina ($C_{22}H_{11}O_5Br_4Na$, Fig. 15C), que se vende como eosina soluble en alcohol. Tiene la misma fórmula que la eosina Y pero con un grupo etilo que reemplaza al sodio [13].



(C)



Etil eosina

Figura 15. Estructura molecular de la sal disódica de Eosina Y (A), Eosina B (B) y etil eosina [13] [25].

La eosina se caracteriza por un sistema π conjugado, que permite las transiciones π - π^* de baja energía, es decir, en la parte visible del espectro [17].

7.1. SÍNTESIS DE LA FLUORESCÉINA

La síntesis de la eosina se lleva a cabo mediante la preparación de la fluoresceína. En 1871 Adolf von Baeyer sintetizó la fluoresceína por primera vez. Se puede preparar a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de cloruro de zinc a través de la reacción de Friedel-Crafts. La reacción general para la síntesis de fluoresceína se muestra en la figura 16 [26].

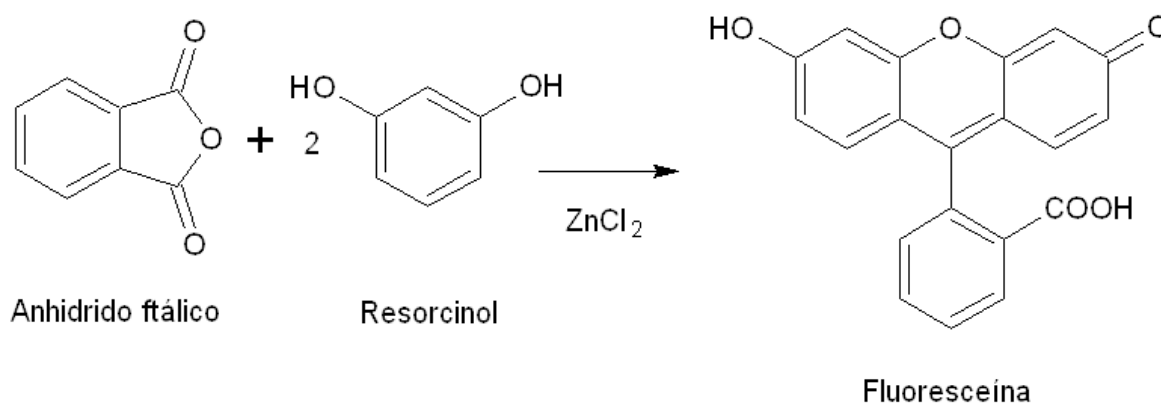


Figura 16. Síntesis general de la fluoresceína a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de cloruro de zinc [26].

Otro método de síntesis de la fluoresceína es mediante una sustitución electrófila aromática de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de ácido sulfúrico (Fig. 17) [27].

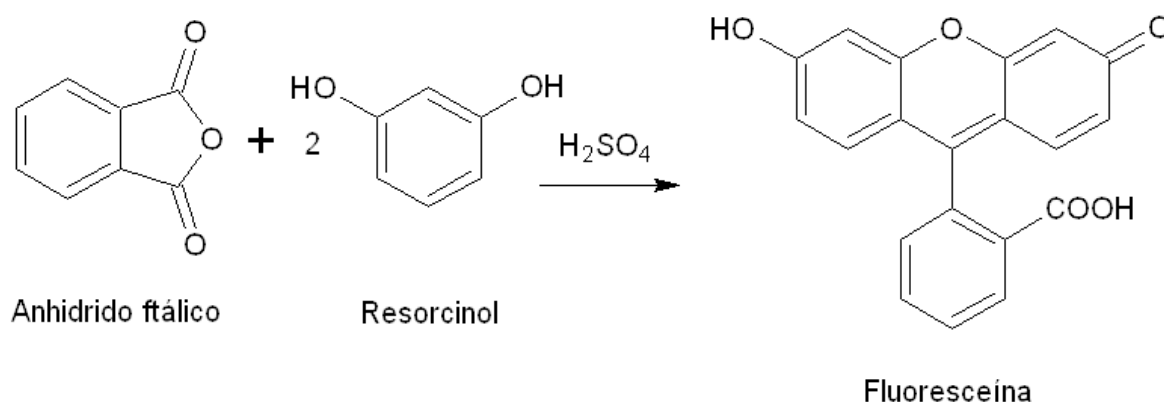
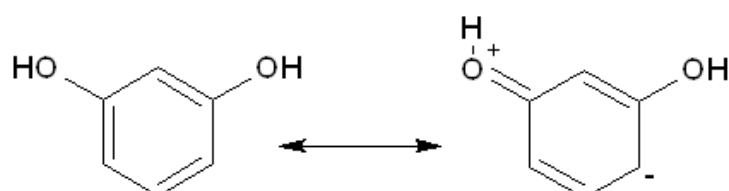


Figura 17. Síntesis general de la fluoresceína a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de ácido sulfúrico [27].

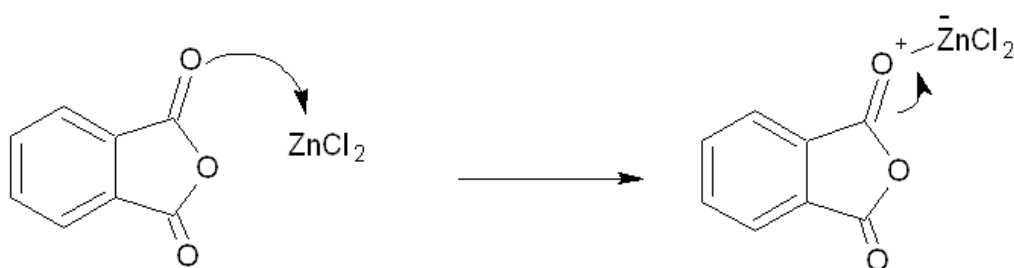
7.1.1. Mecanismo de reacción de la síntesis de la fluoresceína

7.1.1.1. Mecanismo de reacción a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de cloruro de zinc

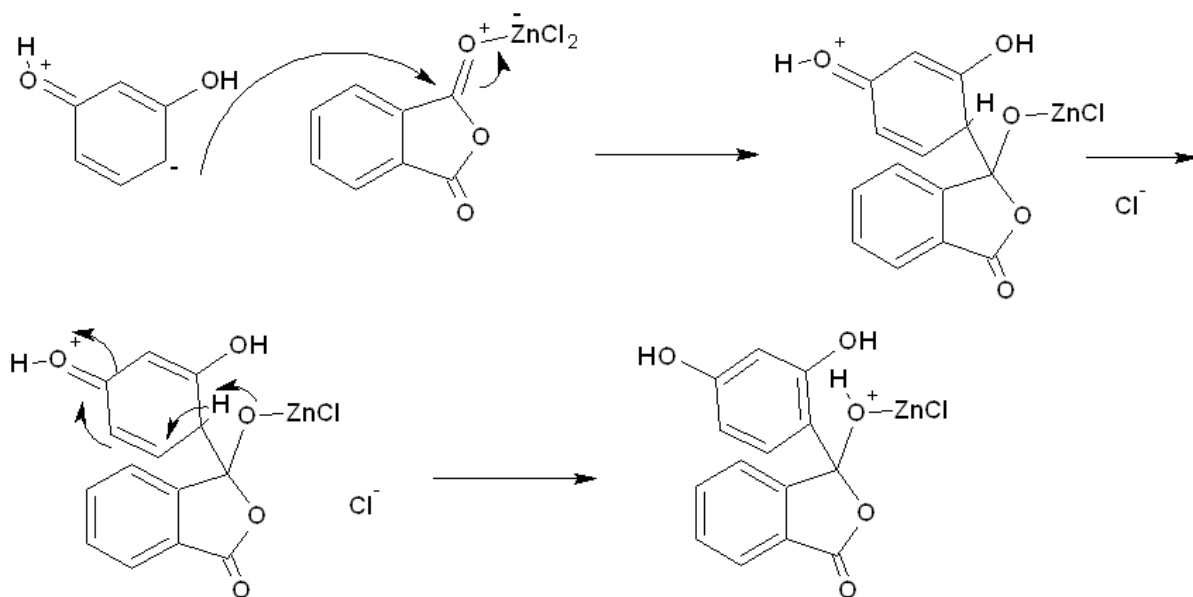
El mecanismo de reacción de síntesis de la fluoresceína se considera como una acilación de Friedel-Crafts. El resorcinol presenta las siguientes formas resonantes:



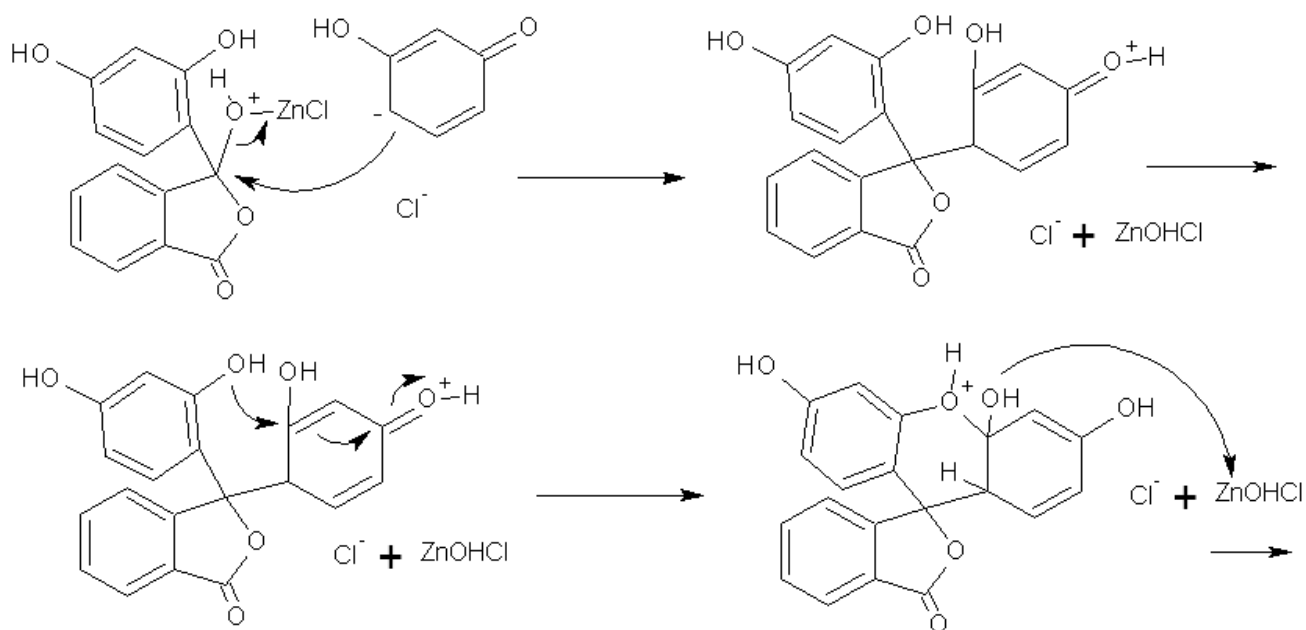
El par de electrones no apareados del oxígeno del anhídrido ftálico atacan al cloruro de zinc para formar el compuesto electrófilo.

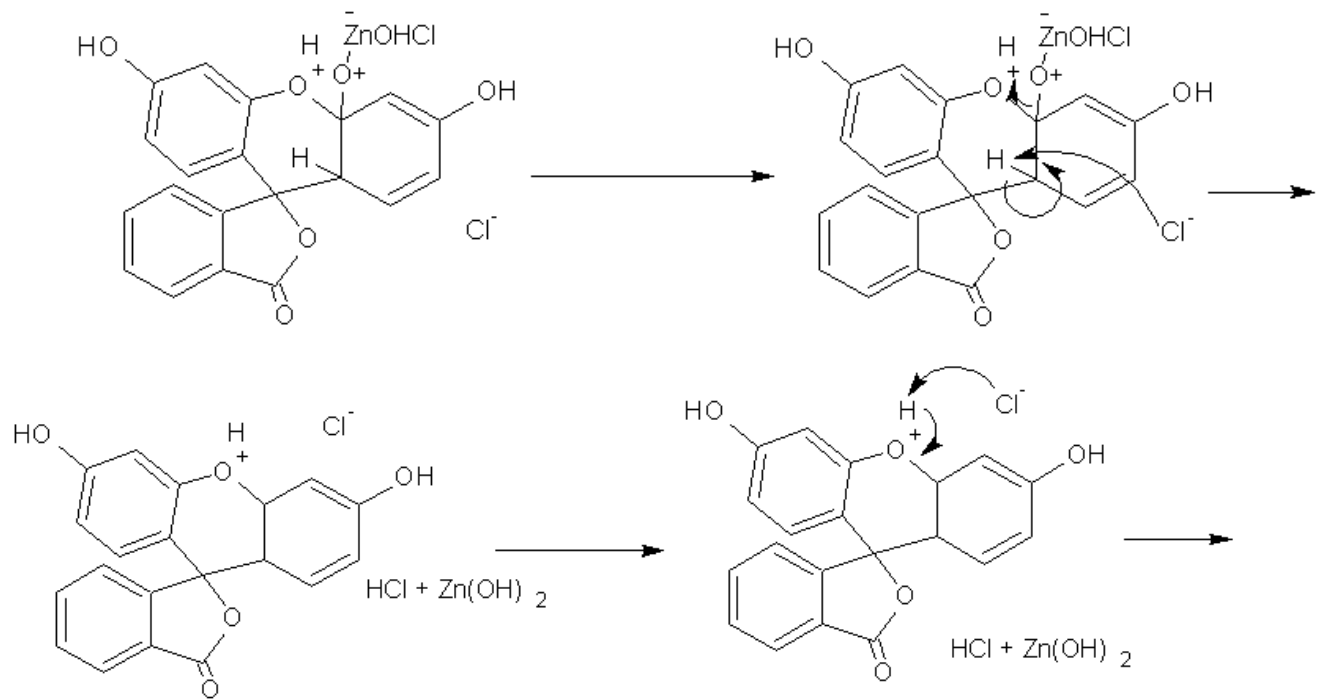


La primera etapa de la reacción es una adición en la que el compuesto electrófilo reacciona con un par de electrones del sistema aromático (resorcinol). A continuación se produce una estabilización de la carga en el anillo aromático.

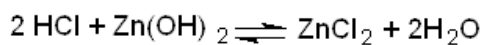
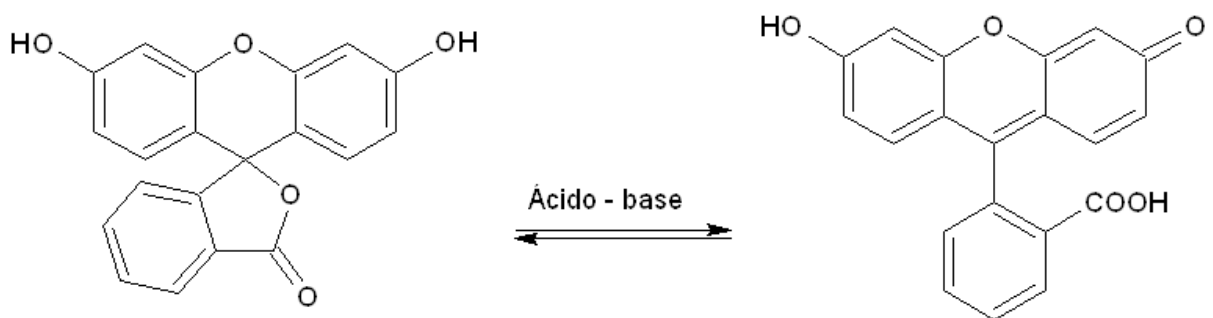


Un segundo compuesto de resorcinol, en su forma enona, ataca al compuesto electrófilo y se estabiliza la carga del anillo aromático, con la formación de 2 HCl y $Zn(OH)_2$.

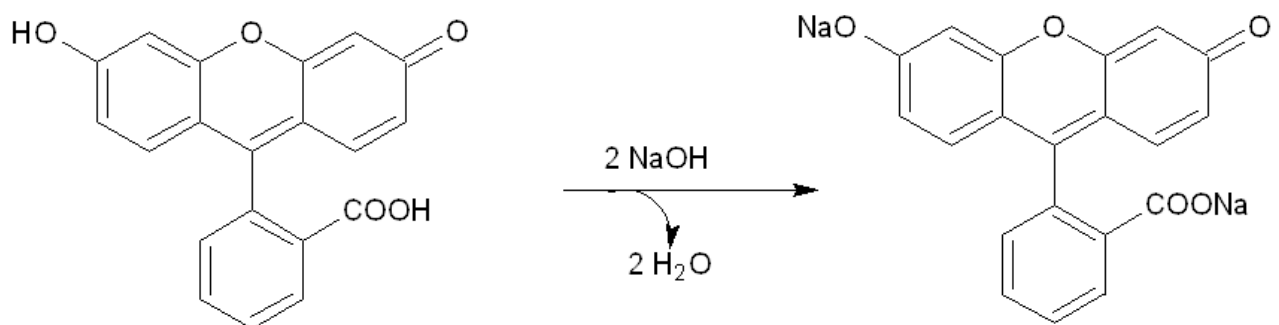




El resultado final es un equilibrio entre la forma de lactona y quinoida, la fluoresceína altera su estructura de tal forma que genera la coloración característica [28] [29].

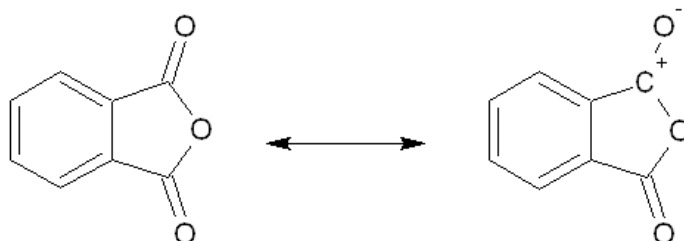


Posteriormente, al disolver la fluoresceína en una solución de NaOH, se obtiene la sal disódica de la fluoresceína [27].

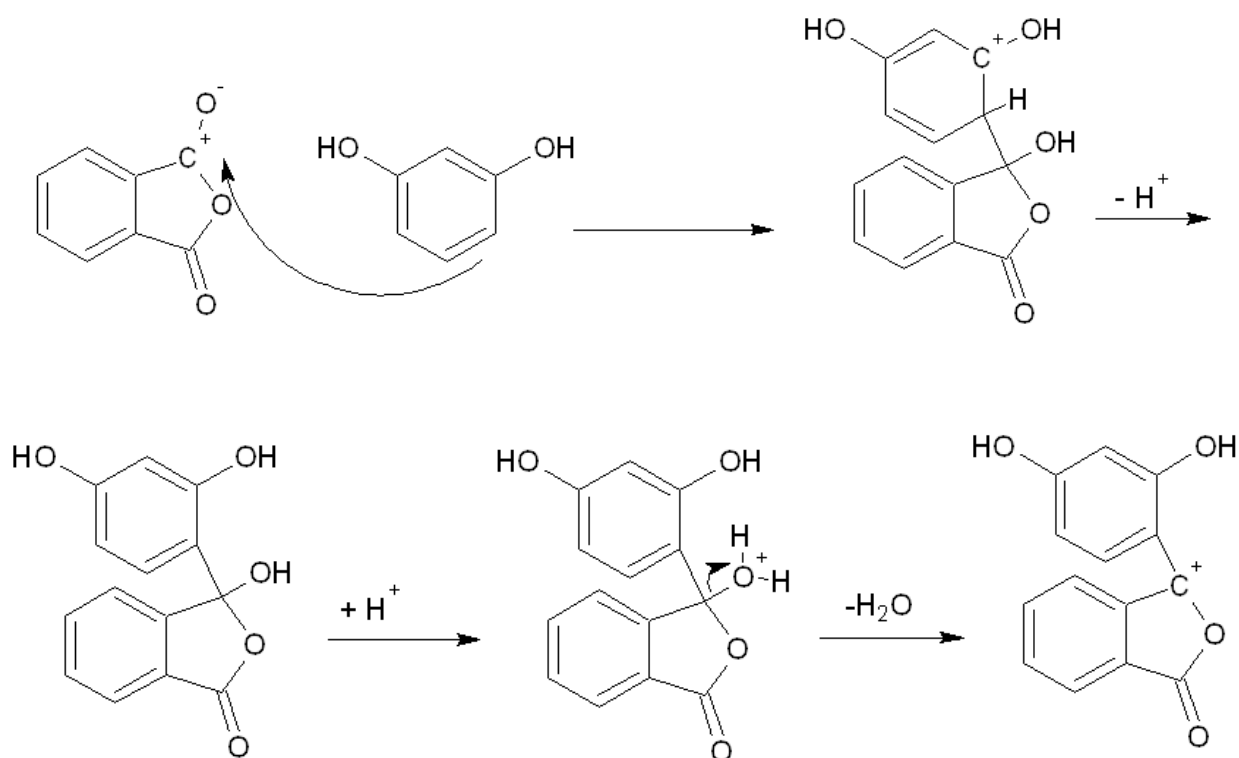


7.1.1.2. Mecanismo de reacción a partir de anhídrido ftálico y resorcinol en presencia de ácido sulfúrico

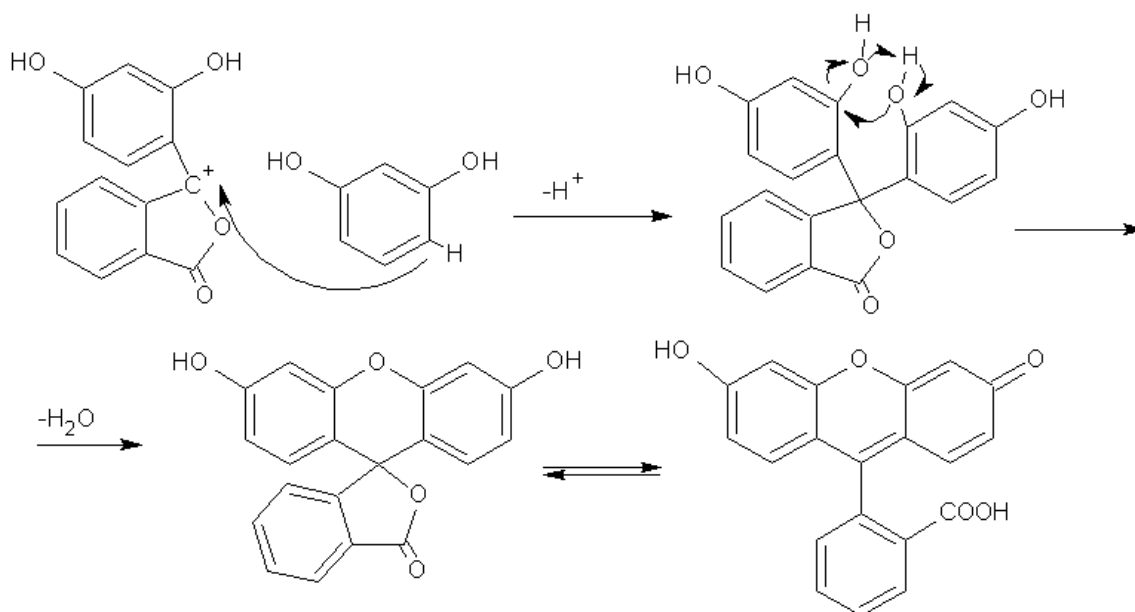
El anhídrido ftálico presenta las siguientes formas resonantes:



La primera etapa del mecanismo es una adición en la que el compuesto electrófilo (forma resonante del anhídrido ftálico) reacciona con un par de electrones del sistema aromático (resorcinol). La adición conduce a la formación del carbocatión, el cual es inestable, debido a la presencia de la carga sobre la molécula y a la pérdida de la aromaticidad. Esto es en parte compensado por la deslocalización de la carga positiva por resonancia. A continuación se produce la protonación y pérdida de una molécula de agua para formar el compuesto electrofílico.



En la segunda etapa del mecanismo se produce una segunda sustitución electrófila aromática con pérdida de una molécula de agua y posteriormente, el equilibrio entre la forma de lactona y quinoide de la fluoresceína [27] [29].

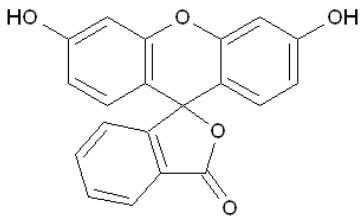
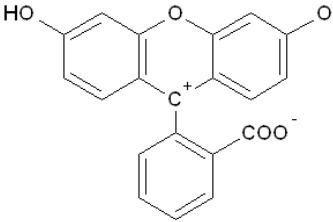
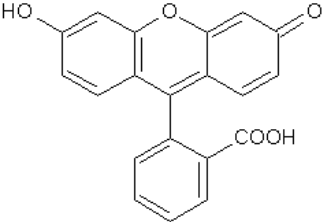
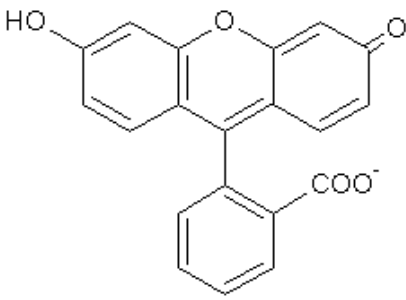
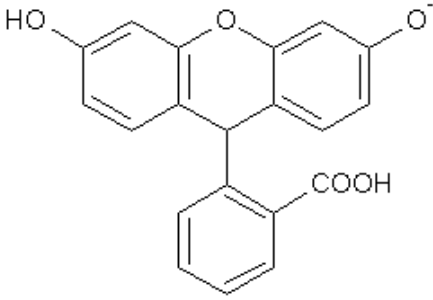
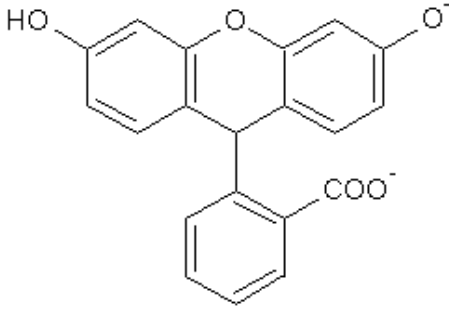


7.1.2. Estructuras prototrópicas de la fluoresceína

La fluoresceína en disolución acuosa se presenta bajo cuatro formas diferentes prototrópicas en función del valor de pH: catión, neutro, monoanión, y dianión (Tabla 8). A su vez, la forma neutra se presenta bajo tres formas tautoméricas; lactona, quinoide y zwitterión. El monoanión existe como dos posibles tautómeros, el carboxilato monoaniónico y el fenolato monoaniónico. Los coeficientes de extinción y los rendimientos cuánticos de fluorescencia son muy distintos para las diferentes especies prototrópicas. A pH cercano al fisiológico solo tiene lugar el equilibrio monoanión-dianión (Fig. 18), y ambas especies presentan espectros de absorción y de fluorescencia diferentes. El dianión posee mayores coeficientes de extinción y rendimientos cuánticos que el monoanión y esto provoca una gran sensibilidad de la señal fluorescente frente al pH [30, 31].

Tabla 8. Estructuras prototrópicas de la fluoresceína: catiónica, neutro, monoanión, y dianión [31].

| | |
|--------|------------------|
| Cación | <p>Catiónica</p> |
|--------|------------------|

| | | | |
|------------|--|---|---|
| Neutro |  <p style="text-align: center;">Lactona</p> |  <p style="text-align: center;">Zuiterión</p> |  <p style="text-align: center;">Quinoide</p> |
| Mono-anión |  <p style="text-align: center;">Carboxilato</p> | |  <p style="text-align: center;">Fenolato</p> |
| Dianión |  <p style="text-align: center;">Dianiónico</p> | | |

Los equilibrios prototrópicos de la fluoresceína implica cinco especies, de modo que se esperan cuatro equilibrios ácido-base a distintos pH:

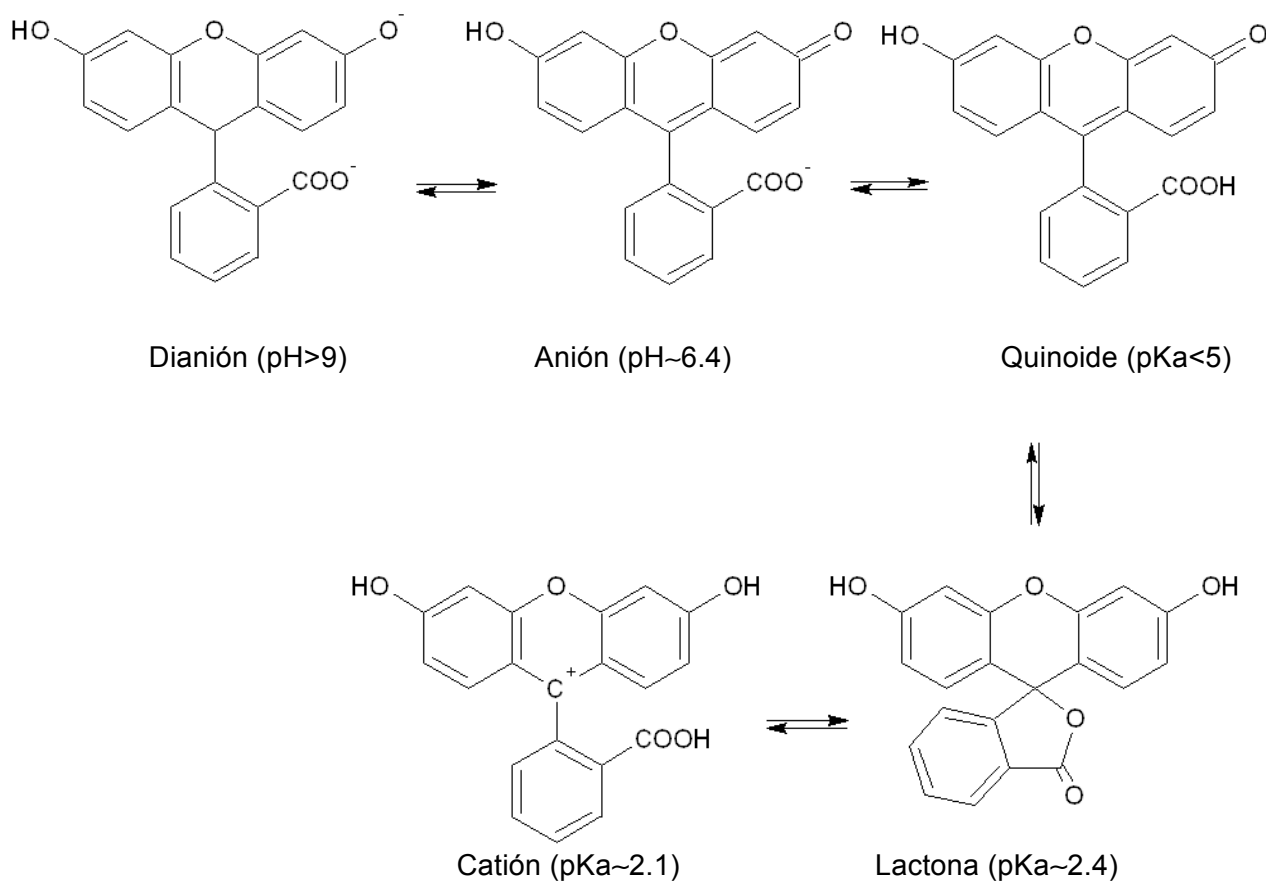


Figura 18. Equilibrios prototrópicos de la fluoresceína [32]

La forma comercial de fluoresceína es típicamente como dianión (sal de sodio) o forma neutra (estructura quinoide o lactona). En la forma quinoide hay una serie de dobles enlaces conjugados que hacen que la forma de fluoresceína (y compuestos que contienen un resto de fluoresceína) sean capaces de absorber la luz azul y emitir fluorescencia verde. Cuando las formas de lactona y quinoide coexisten, la concentración relativa de las moléculas de ambas estructuras se puede alterar fácilmente mediante el ajuste del nivel de pH (Fig. 18). Generalmente, la fluoresceína existe en solución como sal de sodio, potasio, amonio o similares, lo que permite que los compuestos existan en forma quinoide, fluorescente [33].

7.2. SÍNTESIS DE LA EOSINA

La eosina se prepara mediante la bromación de la fluoresceína, utilizando N-bromosuccinimida (NBS) [33]. NBS es uno de los reactivos utilizados con frecuencia para la introducción de bromo en compuestos aromáticos, debido a la facilidad de manejo y disponibilidad, en lugar de bromo líquido corrosivo. Sin embargo, las desventajas de este

reactivo incluyen (i) reacción a alta temperatura (ii) y después de completarse la reacción, el producto secundario succinimida formado debe ser eliminado o reciclado [34].

La eosina Y se sintetiza en una sola etapa a partir de fluoresceína en etanol y en presencia de NBS. La síntesis de eosina B se realiza en dos etapas: en primer lugar, la dibromofluoresceína se obtiene mediante la bromación parcial de la fluoresceína con NBS en ácido acético y en la etapa siguiente, la dibromofluoresceína se nitra usando condiciones de nitración estándar para obtener la eosina B. El esquema de reacción general para la síntesis de eosina Y y eosina B se muestra en la figura 19 [35].

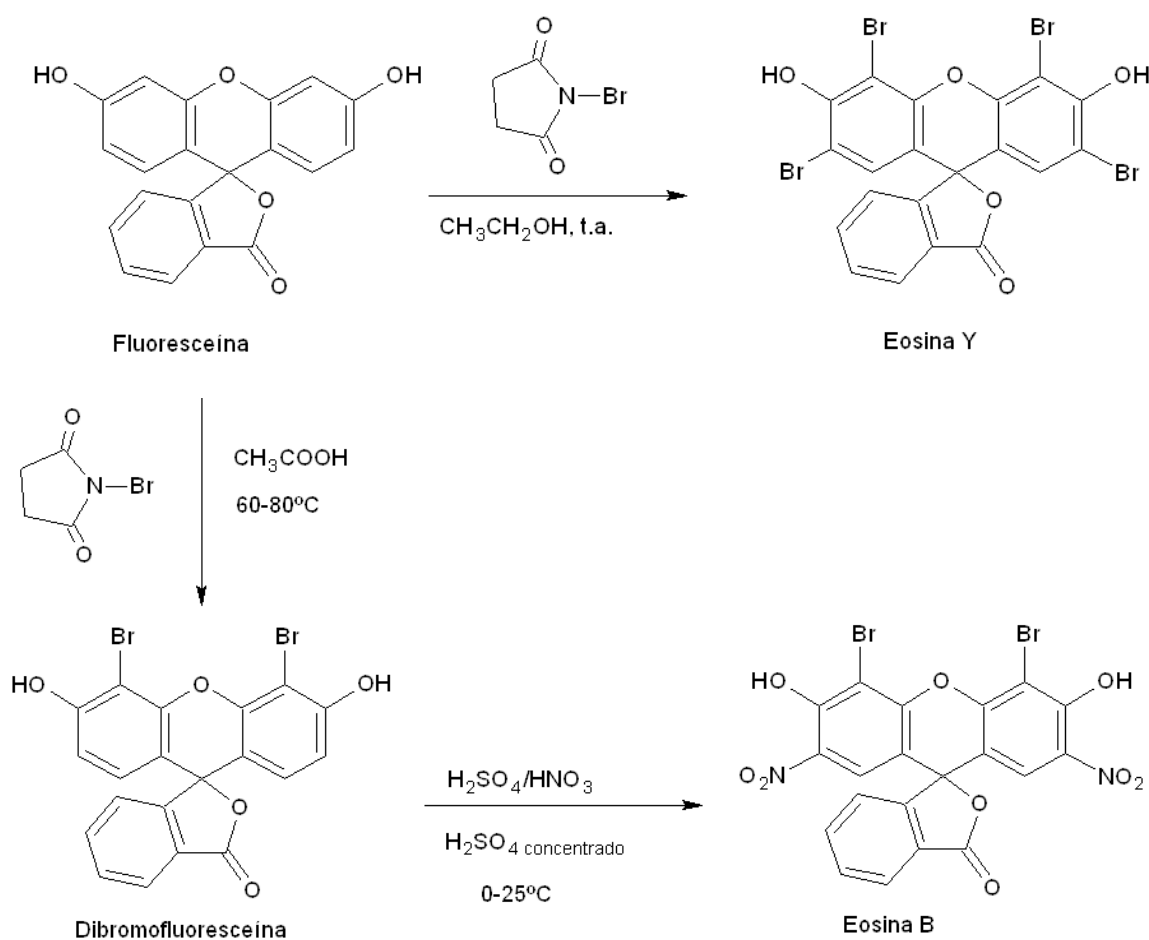
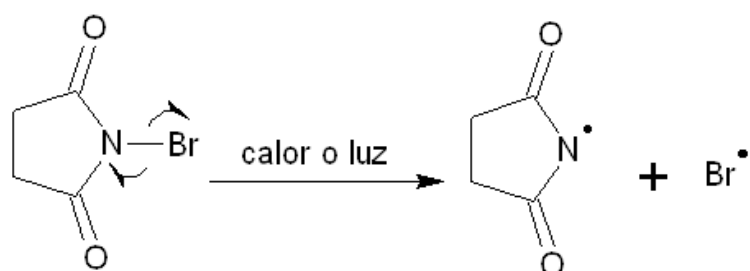


Figura 19. Esquema de reacción de síntesis de eosina Y y eosina B [35].

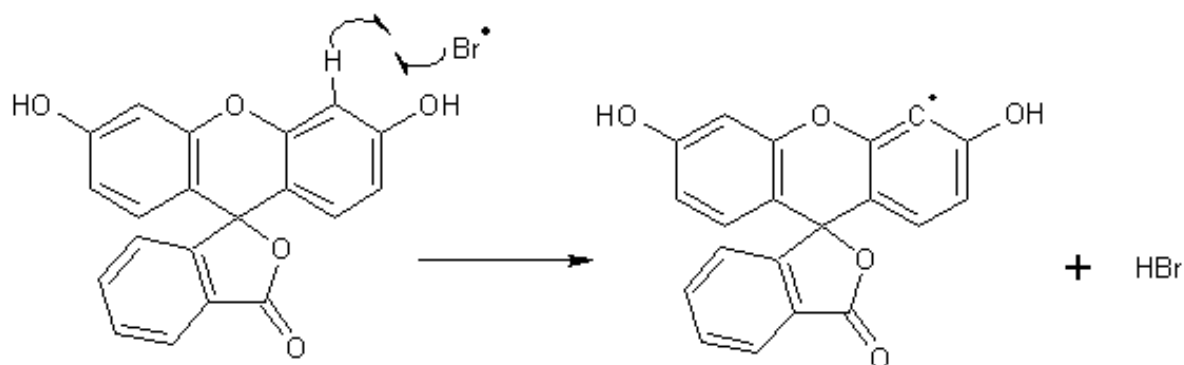
7.2.1. Mecanismo de reacción de la síntesis de la Eosina Y

La obtención de la eosina Y se realiza mediante la bromación de la fluoresceína en presencia de NBS en etanol a temperatura ambiente (Fig. 19). A continuación se describe el mecanismo de reacción de bromación de la eosina Y.

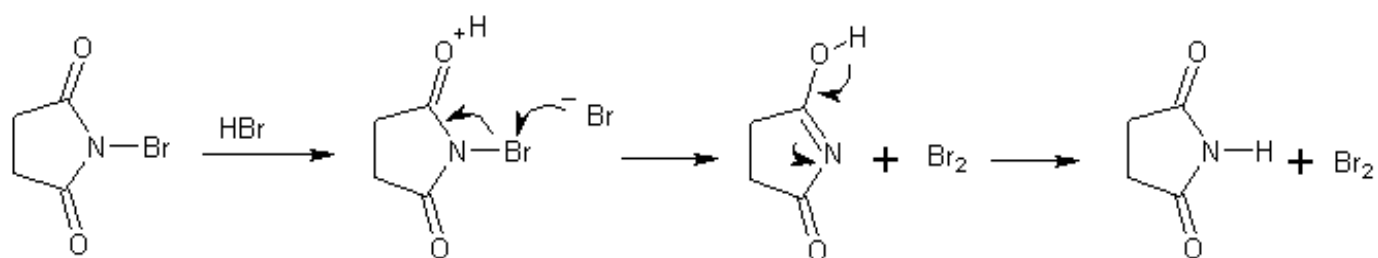
a) **Fase de iniciación:** describe el paso que inicialmente crea una especie radical. El enlace N-Br de NBS se somete a una escisión homolítica para formar radicales mediante la aplicación de calor o luz.



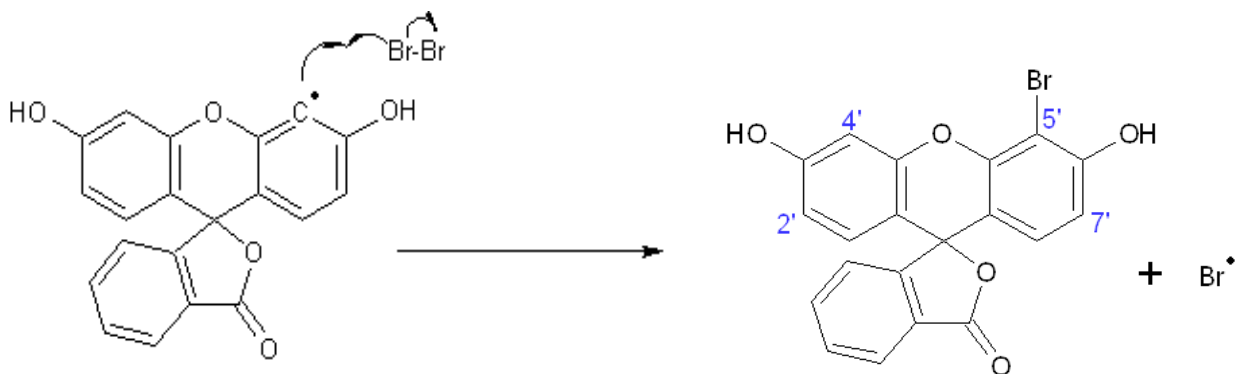
b) **Fase de propagación:** describe las reacciones en cadena. Una vez que se genera un radical libre reactivo, puede reaccionar con moléculas estables para formar nuevos radicales libres.



El HBr formado reacciona con NBS para producir una molécula Br₂.

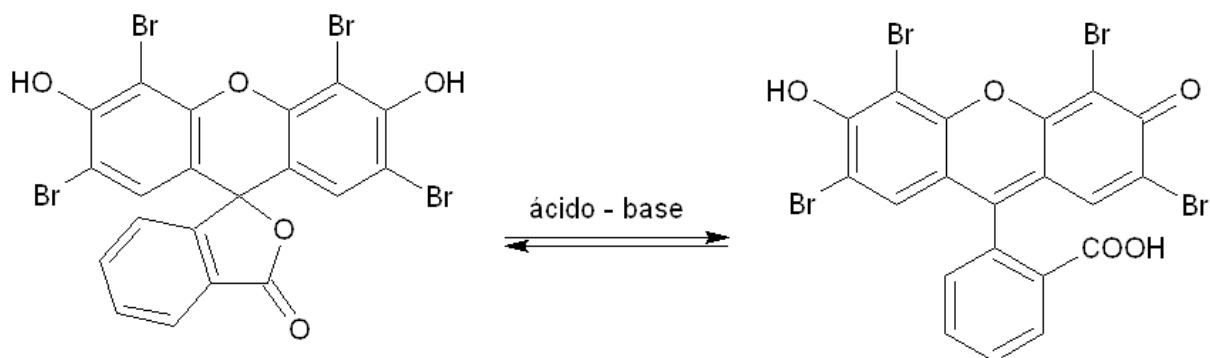


c) **Etapa de terminación:** ocurre cuando dos especies de radicales libres reaccionan entre sí para formar un aducto estable, no radical [36] [37].



El mismo mecanismo de bromación tiene lugar simultáneamente en las posiciones 2', 4', 5', 7' de la fluoresceína.

La última etapa de la síntesis es el equilibrio entre la forma lactona y quinoide de la eosina Y.

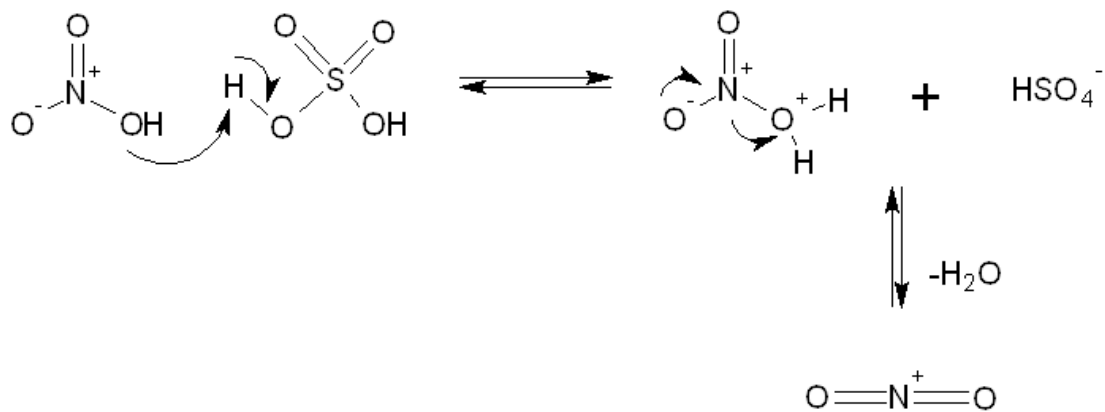


7.2.2. Mecanismo de reacción de la síntesis de la Eosina B

La eosina B se sintetiza en dos etapas: en primer lugar se realiza la bromación parcial de la fluoresceína en presencia de NBS en ácido acético a temperatura 60-80°C, obteniendo dibromofluoresceína (Fig. 19) El mecanismo de bromación se ha descrito en el apartado anterior.

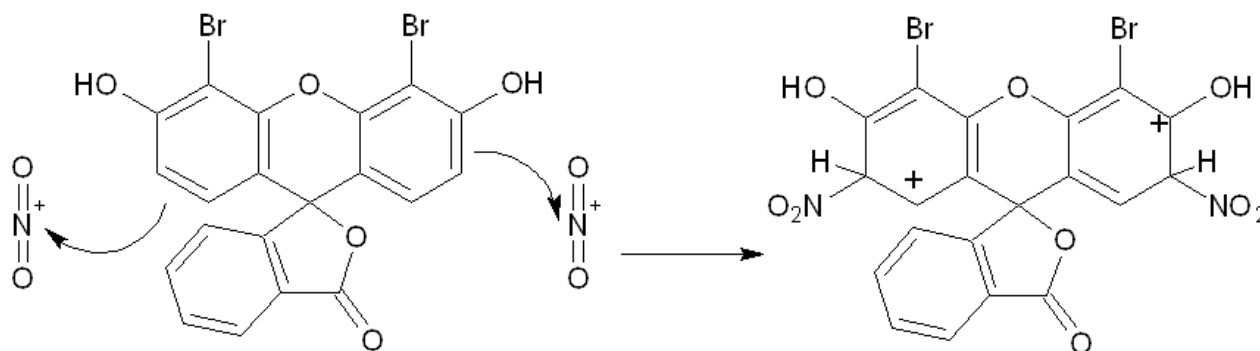
En la segunda etapa, la dibromofluoresceína se nitra utilizando como reactivo una mezcla de ácido nítrico y sulfúrico:

a) **Generación del electrófilo:** la protonación y posterior pérdida de agua del ácido nítrico produce la formación del catión nitronio, electrófilo de la nitración:

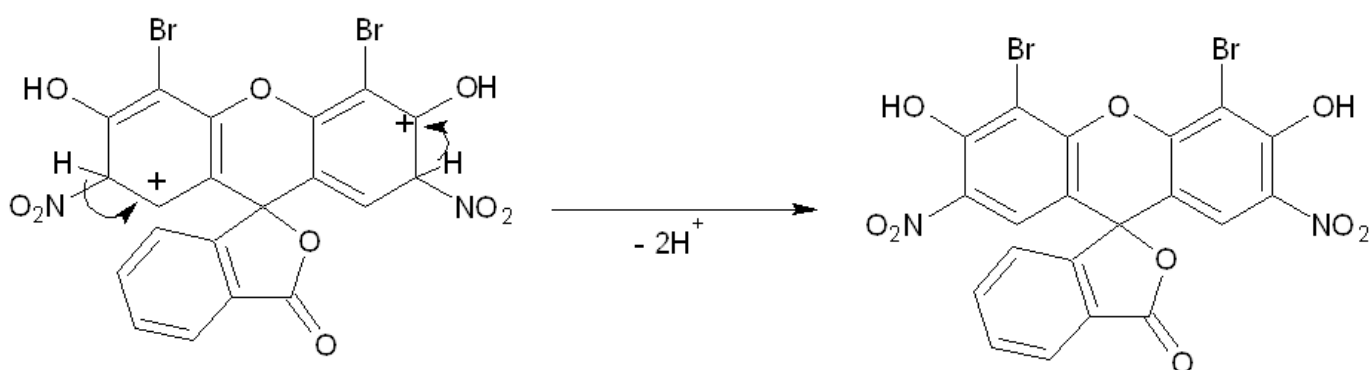


b) **Mecanismo de la nitración:** el catión nitronio, buen electrófilo, es atacado por el anillo aromático produciéndose la adición electrófila, una etapa final de recuperación de la aromaticidad por pérdida de un protón.

Etapa 1. Ataque del dibromofluoresceína al catión nitronio.



Etapa 2. Recuperación de la aromaticidad y obtención de la eosina B [38].



7.3. ENLACE AL TEJIDO

La eosina al ser un colorante aniónico, es atraída por los grupos cargados positivamente en la proteína, como los grupos amino. Los residuos de aminoácidos que se unen al colorante son histidina, arginina y lisina (a pH ácido y neutro) y, a pH ácido, triptófano [39].

Las cadenas peptídicas de los aminoácidos (Fig. 20) tienen en un extremo de la proteína, un grupo amino, y en el otro, un grupo carboxilo. El pH de la disolución es importante. Si la eosina tiene un pH mayor a 6,0, los aminoácidos estarán cargados negativamente y la solución de eosina no se unirá a ellos. Por el contrario, si la solución de eosina tiene un pH inferior a 4,0, la eosina cargada negativamente se unirá a los iones libres de hidrógeno y no teñirá específicamente. El pH ideal de la solución de eosina debe ser 4,5-5,0 [11].

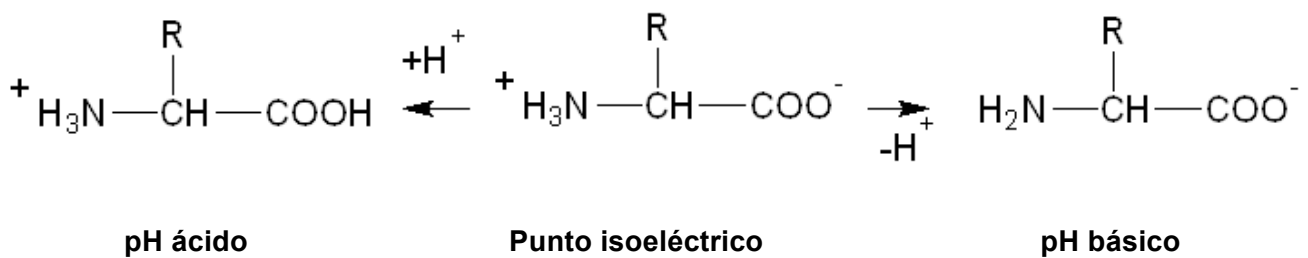
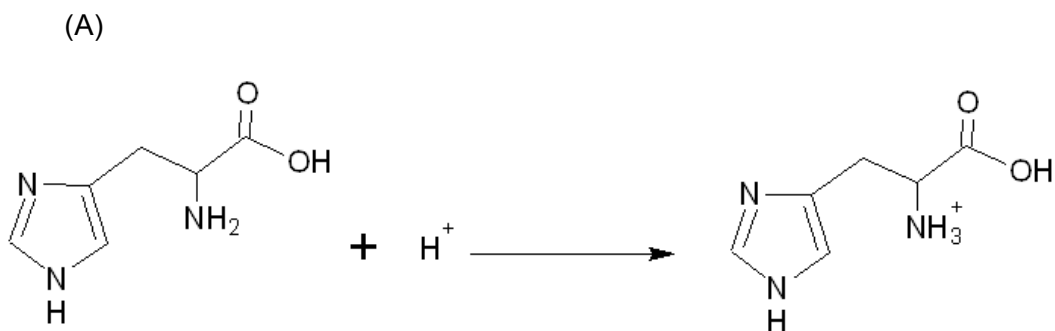


Figura 20. Cambio de pH de un aminoácido [11].

Para la tinción, primero, se ioniza el grupo amino del aminoácido por enlace con el ion hidrógeno y este grupo cargado es atraído por el anión eosina [3], mediante fuerzas iónicas. Cuando el enlace iónico se ha formado, las atracciones de corto alcance tales las fuerzas de van der Waals ayudarán a mantener el enlace [7] (Fig. 21).



(B)

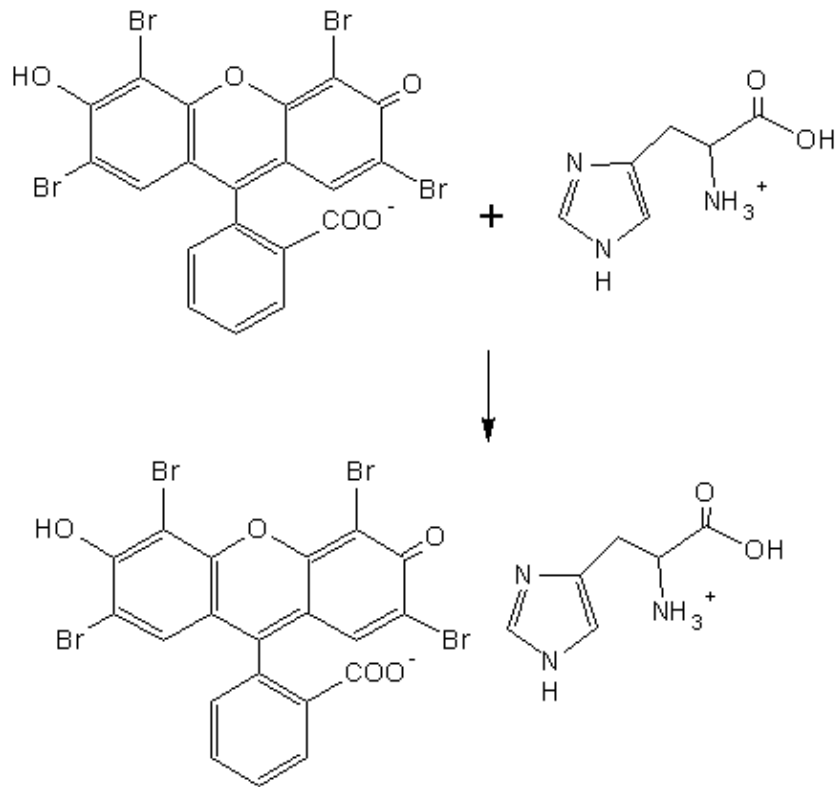


Figura 21. (A) Ionización de la histidina y (B) posterior unión a la eosina [3].

La eosina se usa a menudo como una solución acuosa ligeramente ácida. La adición de ácido acético en la solución de eosina reduce el pH, neutralizando así los grupos $-\text{COOH}$ de las proteínas. Esto da lugar a que los grupos NH_2^+ estén cargados positivamente, por lo que serán atraídos por la eosina, cargada negativamente [11].

8. PROTOCOLO DE TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA

Para realizar la tinción de hematoxilina y eosina, el primer paso es la preparación de la muestra de tejido u órgano, mediante la fijación para conservar su estructura de forma permanente y no ser alterada en el tratamiento siguiente. La muestra se tiene que sumergir en una solución de fijador inmediatamente después de haber sido extraída del organismo. El fijador más común es una solución acuosa de formaldehído al 37% en combinación con otras sustancias químicas y amortiguadores. El formaldehído no altera de forma significativa la estructura tridimensional de los tejidos y también, las proteínas mantienen su capacidad para reaccionar con compuestos específicos.

En el segundo paso, la muestra es infiltrada en parafina (o cera) para formar un bloque (Fig. 22A) y es cortada en finas secciones, típicamente de 4 a 10 μ m, mediante el uso de una máquina cortadora, conocida como micrótopo. A continuación los cortes de la muestra se montan en una lámina portaobjetos (Fig. 22B) [40].

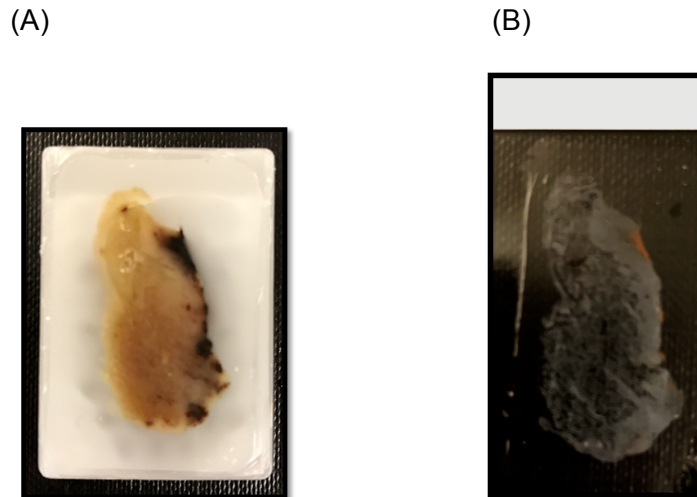


Figura 22. (A) Bloque de parafina de una muestra de placenta. (B) Sección de 4 μ m de grosor de una muestra de placenta montada en una lámina portaobjetos. Las imágenes son cortesía del grupo Orchid de Queen Mary University of London, Londres, Reino Unido.

En el tercer paso, la muestra es teñida mediante la tinción de hematoxilina-eosina, debido a que los cortes de la muestra en parafina son incoloros y por tanto, así pueden ser examinados bajo el microscopio óptico [41] [42]. Debido al volumen de tinción de hematoxilina y eosina necesario, la mayoría de los laboratorios clínicos utilizan sistemas totalmente automatizados y la tinción manual es ahora poco frecuente [8]. A continuación se describen las etapas de la tinción y en el Esquema 1 se muestra paso a paso las etapas y el tiempo de incubación de cada una de ellas:

1) Desparafinado: La primera etapa en el método de tinción de hematoxilina y eosina es el desparafinado de las secciones de muestra. La parafina tiene que ser eliminada para permitir que las soluciones acuosas penetren en el tejido fijo. Esto se hace generalmente utilizando xileno y se realiza mediante dos inmersiones separadas de 5 minutos.

2) Hidratación: El tejido necesita ser hidratado a través de una serie decreciente de soluciones de alcohol para asegurarse de que la mayor parte del xileno es drenado. Los portaobjetos se sumergen en una serie de soluciones de etanol y agua con un porcentaje decreciente de etanol (100%, 90% y 70%). A continuación las secciones son lavadas en agua de grifo.

3) Tinción de hematoxilina: Las secciones son incubadas con la solución de hemalumbre durante 10 min para asegurarse que todos los sitios de unión nucleares disponibles estén saturados y después, son lavadas en agua de grifo para eliminar el exceso de tinte del portaobjetos. Los especímenes son sumergidas en una solución de alcohol ácido (1% de ácido clorhídrico en etanol) para acentuar el contraste del colorante. Posteriormente, son enjuagadas en agua de grifo y las secciones cambian de un rojo claro a un azul grisáceo.

4) Tinción de eosina: Las muestras se introducen en una solución de eosina durante 2 minutos para diferenciar los núcleos y componentes no nucleares en las células y seguidamente, son enjuagadas en agua de grifo para eliminar el exceso de colorante.

5) Deshidratación: Las secciones teñidas son sumergidas en una serie de soluciones de y etanol y agua, con porcentaje creciente de etanol (70%, 90% y 100%) para eliminar el agua. La presencia de agua puede refractar la luz cuando son examinadas bajo el microscopio, y su ausencia mejora las observaciones de las estructuras finas.

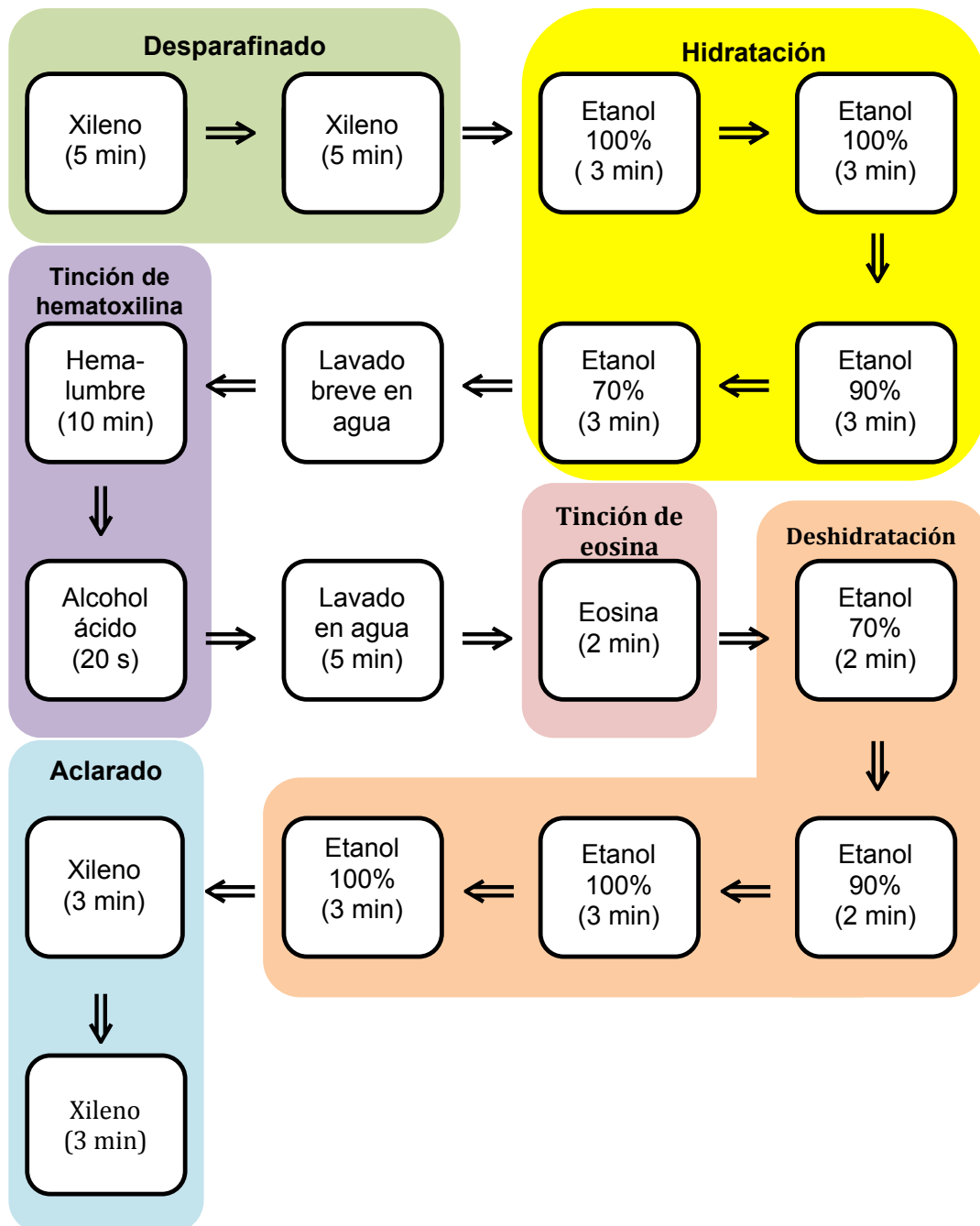
6) Aclarado: La última etapa de la tinción es el aclarado de las muestras en xileno, mediante dos inmersiones de 3 minutos. El xileno es un efectivo agente limpiador que también, permite que el coeficiente de refracción del tejido aumente [41] [42].

Como último paso, las muestras deben ser cubiertas con un cubreobjetos y un sellador con la finalidad de aislar y proteger al espécimen contra la contaminación y la descomposición (Fig. 23) [40].



Figura 23. Muestra de placenta teñida mediante la tinción de hematoxilina y eosina. Las imágenes son cortesía del grupo Orchid de Queen Mary University of London, Londres, Reino Unido.

Esquema 1. Etapas de la tinción hematoxilina-eosina con sus respectivos tiempos de duración de cada una de ellas.



9. CONCLUSIONES

La tinción de hematoxilina y eosina se utiliza rutinariamente en los laboratorios de histopatología, ya que proporciona al patólogo/investigador una visión muy detallada del tejido. Esta información es a menudo suficiente para permitir un diagnóstico de enfermedad basado en la organización de las células y también muestra cualquier

anormalidad o indicadores particulares en las células reales. Debido al volumen de tinción de hematoxilina y eosina necesario, la mayoría de los laboratorios clínicos utilizan sistemas totalmente automatizados y la tinción manual es ahora poco frecuente.

La hematoxilina no es un colorante, debido a que no presenta ningún grupo cromóforo, por lo que tiene que ser oxidada a la hemateína, mediante la exposición de la solución de hematoxilina a oxígeno atmosférico o por el uso de oxidantes. Sin embargo, el producto empleado en la tinción de la hematoxilina y eosina es un complejo formado a partir la hemateína y los iones de aluminio, conocido como hemateína de alumbre o hemalumbre.

Los cuatro factores más influyentes que determinan el tipo de tinción que se espera de la hemateína de alumbre son: la cantidad de colorante en la solución, la cantidad de mordiente, la relación entre el colorante y el mordiente y el pH. Los estudios muestran la existencia de complejos catiónicos de hemateína-aluminio, principalmente el rojo [Hemateína-Aluminio]²⁺ a pH 2,6, acidez adecuada para las soluciones de tinción.

El hemalumbre, colorante básico, está formado por moléculas que contiene grupos catiónicos que son los responsables de la carga global básica del colorante. La hemateína de alumbre colorea las estructuras ácidas de un color azul-púrpura, principalmente los ácidos nucleicos presentes en los núcleos celulares. El núcleo de los ribosomas y el retículo endoplasmático rugoso tienen gran afinidad por la hemalumbre debido a su alto contenido en ADN y ARN, respectivamente.

La eosina, por el contrario, es un colorante ácido, que contiene grupos fuertemente aniónicos y en general, tiñe estructuras proteicas básicas contenidas en los citoplasmas celulares, fibras del intersticio y membranas basales en una tonalidad rosácea.

La eosina también actúa como contracolor, cambiando los núcleos teñidos por el hemalumbre de un color azul a púrpura. Este cambio de color puede ser debido a la atracción de aniones de eosina a las cadenas laterales de los aminoácidos cargados positivamente del ADN.

La eosina se sintetiza mediante la bromación de la fluoresceína utilizando N-bromosuccinimida. Para la tinción con la eosina, primero, se ioniza el grupo amino del aminoácido y este grupo cargado es atraído por el anión eosina, mediante fuerzas iónicas y cuando el enlace iónico se ha formado, las atracciones de corto alcance tales las fuerzas de van der Waals ayudarán a mantener el enlace. El pH ideal de la solución debe ser 4,5-5,0.

En conclusión, la tinción de hematoxilina y eosina facilita el estudio de diversos tipos de tejidos y cambios morfológicos de las células, tiñendo de forma parcial, total o gradual las diferentes estructuras que constituyen las células. También, es una tinción que resulta fácil de llevar a cabo y requiere poca instrumentación.

10. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Méndez, A.; Colorantes químicos y alimentarios.
<http://quimica.laguia2000.com/general/colorantes-quimicos-y-alimentarios> (acceso: 29 de abril de 2017)
- [2] Cornago Ramírez, M^a del P.; Esteban Santos, S.; *Química Forense*, Universidad Nacional de Educación a Distancia: Madrid, España, **2016**; pp. 70-80
- [3] Cook, D. J; Warren, P.J.; *Cellular Pathology. An introduction to techniques and applications*, 3^a ed.; Scion Publishing Ltd: Reino Unido, **2015**; pp. 96-114
- [4] General introduction to the chemistry of dyes. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, **2010**, 99, pp. 55-77
- [5] *Diccionario de Química*. Editorial Complutense: Madrid, **2003**; pp. 64
- [6] The Chemistry of Dyes and Staining.
<https://www.nationaldiagnostics.com/histology/article/chemistry-dyes-and-staining>
(acceso: 12 de marzo de 2017)
- [7] Kumar, G. L.; Kiernan, J.A.; *Education Guide. Special Stains and H & E*, 2^a ed.; Dako, North America, Carpintería, Estados Unidos, **2010**
- [8] Anderson, J.; An Introduction to Routine and Special Staining.
<http://www.leicabiosystems.com/pathologyleaders/an-introduction-to-routine-and-special-staining/> (acceso: 14 de junio de 2017)
- [9] García Bermejo, M^a J.; *Técnico Especialista en Anatomía Patológica Del Servicio Gallego de Salud*, Volumen 2, 1^a ed.; Editorial Mad: España, **2006**; pp. 40-42
- [10] Pardo Mindán, F. J.; *Anatomía patológica*. Harcourt, Elsevier España: España, **1996**; pp. 18-20
- [11] Tissue sampling, processing and staining.
<http://tissuesampling.weebly.com/staining.html> (acceso: 23 de abril de 2017)

- [12] Chandler, D. E.; Roberson; R. W.; *Bioimaging: Current Concepts in Light & Electron Microscopy*. Jones & Bartlett Publishers: Massachusetts, Estados Unidos, **2009**, pp. 106-109.
- [13] Llewellyn, B. D.; Hematoxylin Formulae. *Stains File*, **2003**.
- [14] Allison, R. T.; Haematoxylin – from the Wood. *Clin Pathol*. **1999**, 52, 527–528
- [15] Ali, F.R; Orchard, G.E; Mallipeddi, R.; Hematoxylin in History - The Heritage of Histology. *JAMA Dermatol*. **2017**, 153(3), 328.
- [16] Titford, M.; The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry*. **2005**, 80(2), 73-78.
- [17] Avwioro, G.; Histochemical uses of Haematoxylin – A review. *Journal of Physics: Conference Series (JPCS)*. **2011**, 1, 24-34.
http://www.arpapress.com/volumes/jpcs/vol1/jpcs_1_05.pdf (acceso: 23 de abril de 2017)
- [18] Llewellyn, B. D.; Nuclear staining with alum hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry* **2009**, 84(4), 159-177.
- [19] Beiginejad, H.; Electrochemical oxidation of hematoxylin – Part 1: Experimental and theoretical studies in an aqueous acidic medium. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. **2006**, 681(1), 76-83.
- [20] Meister, A.; *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, Volumen 58; John Wiley & Sons, Nueva York, Estados Unidos, **1986**; pp. 62-64.
- [21] Schwarzer, K.; Adams, C. A.; Oxidative Stress and Animal Performance
<http://www.feedinfo.com/files/AGPoxi.pdf> (acceso: 8 de abril de 2017)
- [22] Técnicas histológicas. Protocolos. Hematoxilina. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/a-hematoxilina.php>. (acceso: 8 de abril de 2017)
- [23] Cooksey, C.; Hematoxylin and related compounds – an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications. *Biotechnic & Histochemistry*. **2010**, 85(1), 65–82
- [24] Bancroft, J. F.; *Theory and practise of histological techniques*, 6ª ed.; Elsevier Health Sciences, China, **2008**; pp. 126.
- [25] Massimine, K. M.; McIntosh, M. T.; Doan, L. T.; Atreya, C. E.; Gromer, S.; Sirawaraporn, W.; Elliott, D. A.; Joiner, K. A.; Schirmer, R. H.; Anderson, K. S.; Eosin B as a Novel Antimalarial Agent for Drug-Resistant Plasmodium falciparum. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2006**, 50(9), 3132–3141

- [26] Fatima, K.; Nosheen, S.; Azhar, H.; Azhar, M.; Synthesis and application of eosin. *Pakistan Journal of Agriculture Sciences*, **2009**
- [27] Orejarena Avila, L. P.; Obtención de fluoresceína. [Online]. Universidad del Quindío, Facultad de ciencias básicas y tecnologías programada de Química, Armenia, **2013**. <https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0ahUKEwjE7N6QwpfTAhWsLMAKHRO2D7cQFggjMAA&url=https%3A%2F%2Filanajuanda.files.wordpress.com%2F2013%2F12%2Fobtencic3b3n-de-fluorescec3adna-1.docx&usq=AFQjCNF-CL5GR4b-GGRdSoVvREiUE7CFLw&sig2=5-biwA6gt1fgXJWtHW9WtA&bvm=bv.152174688,d.d24&cad=rja> (acceso: 8 abril de 2017)
- [28] Chemistry Stackexchange. Fluorescein synthesis. <http://chemistry.stackexchange.com/questions/27251/fluorescein-synthesis> (acceso: 8 abril de 2017)
- [29] Aldabe, S.; Aramendia, P.; Bonazzola, C.; Lacreu, L.; Química 2. *Química en acción*, 1ª ed.; Ediciones Colihe, Buenos Aires, Argentina, **2004**; pp. 118-121
- [30] Paredes Martínez, J. M.; Síntesis, fotofísica y aplicación a la espectroscopía de correlación de fluorescencia de derivados xanténicos útiles como sondas fluorescentes “on/off”. Tesis doctoral [Online], Universidad de Granada, España, **2010**. <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/4877/1/18661725.pdf> (acceso: 8 abril de 2017)
- [31] Batistela, V. R.; Cedran, J.; de Oliveira, P. M.; Scarminio, I. S.; Ueno, L. T.; Machado, A.E.; Hioka, N.; Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. *Dyes and Pigments*, **2010**, 86(1), 15-24
- [32] Rathod, R. V.; Bera, S.; Singh, M.; Mondal, D.; A colorimetric and fluorometric investigation of Cu(II) ion in aqueous medium with a fluorescein-based chemosensor. *RSC Advances*, **2016**, 41.
- [33] Wang, N.; Dubler, R. E.; Ungemach, F. S.; Walters, R. L.; Thacker, S. A.; Fluorescence polarization immunoassay for tetrahydrocannabinoids. Patent EP0279308 B1, 28 Agosto 1996
- [34] Shodhganga: a reservoir of Indian theses. http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/56644/7/07_chapter%201.pdf (acceso: 1 de abril de 2017).
- [35] Benkovics, G.; Afonso, D.; Darcsi, A.; Béni, S.; Conoci, S.; Fenyvesi, E.; Szenté, L.; Malanga, M.; Sortino, S.; Novel β -cyclodextrin–eosin conjugates. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, **2017**, 13, 543–551

[36] The Chemistry Libretexts library. Radical chain reactions.

[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/17%3A_Radical_reactions/17.2%3A_Radical_chain_reactions](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Organic_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Organic_Chemistry_With_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/17%3A_Radical_reactions/17.2%3A_Radical_chain_reactions) (acceso: 1 de abril de 2017)

[37] College of Arts and Sciences Chemistry.

<http://www.chem.uky.edu/courses/che230/FL/chapter%2011.pdf> (acceso: 1 de abril de 2017)

[38] Química orgánica. Nitración de benceno. <http://www.quimicaorganica.net/benceno-nitracion.html> (acceso: 1 abril de 2017)

[39] Waheed, A.A.; Rao, K. S.; Gupta, P.D.; Mechanism of Dye Binding in the Protein Assay Using Eosin Dyes. *Analytical Biochemistry*. **2000**, 287, 73–79

[40] Ross, M. H.; Pawlina, W.; *Histología. Texto y Atlas color con Biología Celular y molecular*, 5ª ed.; Editorial Médica Paramericana: Buenos Aires, Argentina, **2007**; pp. 1-5

[41] Fisher, J. P.; Mikos, A. G.; Bronzino, J. D.; *Tissue Engineering principles and practices*, CRC Press: Boca Raton, Estados Unidos, **2013**; pp. 13-1, 13-3

[42] Agar Scientific. H and E Part Two: Method, Tips and Troubleshooting <http://www.agarscientific.net/h-and-e-part-two-method-tips-and-troubleshooting/> (acceso: 25 de mayo de 2017)