



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

14
2ij

**MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS E
HISTOPATOLOGICAS PARA MEDICOS VETERINARIOS
ZOOTECNISTAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA
P R E S E N T A :
CAROL ANDREA GAETE BALBOA

ASESOR: MVZ GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA
COASESORES: MVZ JOSE ALBERTO CHAVEZ ENRIQUEZ
MVZ MIGUEL ANGEL CORNEJO CORTES
MVZ SERGIO CORTES Y HUERTA

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEX.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN
P R E S E N T E .

AT'N: Ing. Rafael Rodriguez Ceballos
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 20 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Manual de técnicas histológicas e histopatológicas para
Médicos Veterinarios Zootecnistas "

que presenta lo pasante: Carol Andrea Gaete Balboa

con número de cuenta: 8977091-7 para obtener el TITULO de:
Medico Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 7 de mayo de 1996

PRESIDENTE MVZ. Sergio Cortés y Huerta

VOCAL M. en C. Rito A. del Castillo Rodríguez

SECRETARIO Dr. Jorge Tórtora Pérez

PRIMER SUPLENTE M. en C. Carlos García Tovar

SEGUNDO SUPLENTE M. en C. Juan Ocampo López

[Handwritten signatures of the board members]

DEDICATORIAS

A mi madre

*Que es la razón de mi ser y a
quién le debo su entrega y
dedicación. Y por que es
nuestra ejemplo a seguir.*

A mi padre

*Gracias por tu apoyo, tus
consejos y tu comprensión.*

A mis hermanos

*Claudia, Pablo y Marcelo por
las años que hemos estado
juntos.*

A toda mi familia

*Que esta a kilómetros de
distancia, pero que recuerdo
con mucho cariño.*

A mis mascotas

*En memoria de buby mi fiel
compañero y a los presentes
churi y sasha.*

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Por dentro de sus instalaciones, inicie el camino hacia mi desarrollo profesional y por que me siento orgullosa de haber sido parte de ella.

Al MVZ Germán Garrido Fariña

Por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, apoyarme y sobre todo, por sus horas dedicadas al asesoramiento del mismo. Gracias.

A los profesores:

MVZ. José Alberto Chávez Enríquez

MVZ. Miguel Ángel Cornejo Cortés

MVZ. Sergio Cortés y Huerta

M en C. Arcelia Rita del Castillo Rodríguez

Dr. Jorge Tórtora Pérez

M. en C. Carlos García Tovar

M. en C. Juan Ocampo López

Gracias por su tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, sus consejos y aportaciones al mismo. Pero sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo

A mis amigos y compañeros

Hilda, Ernesto, Diana, Bertha, Laura, Juan José, Mauricio, Manuel, Raúl, Alejandra, Sandra Luz y a los que se me escapan en este momento.

A todos ellos, con los que he compartido casi toda mi vida y a los que han estado conmigo en los últimos años. Gracias por los momentos que hemos pasado juntos, por lo que hemos aprendido y por lo que nos falta vivir.

En memoria de todos los animales que hicieron posible la práctica en la carrera. Gracias por ser parte de la vida.

Y por ultimo quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron de alguna forma a la elaboración de este trabajo

INDICE

RESUMEN	1
OBJETIVOS	2
INTRODUCCIÓN	3
UNIDAD I	5
A. GENERALIDADES PARA LAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E	
HISTOPATOLÓGICAS DE RUTINA	5
a) Aparatos y técnicas de observación.....	5
b) Reactivos	5
c) Equipo y material de laboratorio.....	7
d) Técnicas de estudio	8
e) Técnicas especiales de preparación.....	10
f) Procedimientos de conservación	12
UNIDAD II	14
A. APARATOS DE OBSERVACIÓN Y DE CORTE	14
a) Aparatos de observación.....	14
b) Tipos de microscopia más empleados.....	15
c) Técnica de observación	18
d) Aparatos de corte	20
UNIDAD III	23
A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	23
a) Obtención de la muestra	23
b) Toma y fijación	23
c) Disección sistemática, o necropsia	25
UNIDAD IV	28
A. REACTIVOS, PREPARACIÓN Y USOS	28
a) Reactivos inofensivos.....	28
b) Reactivos aisladores.....	29
c) Reactivos nutritivos	30
d) Reactivos fijadores	31
e) Reactivos aclarantes	36
f) Reactivos ablandadores.....	37
g) Reactivos colorantes.....	38
h) Reactivos opacantes.....	48
i) Reactivos conservadores	48

UNIDAD V	51
A. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA	51
a) Preparación y procesamiento de la muestra.....	51
b) Inclusión en los bloques de parafina	51
c) Corte de las piezas incluidas en parafina	54
d) Montaje de los cortes	54
UNIDAD VI	56
A. OBSERVACIÓN Y ARTEFACTOS	56
a) Observación	56
b) Artefactos	56
UNIDAD VII	61
A. TÉCNICAS GENERALES DE TINCIÓN E IMPREGNACIÓN, HISTOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS	61
UNIDAD VIII	67
A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA LAS CÉLULAS Y TEJIDOS	67
a) Citología exfoliativa.....	67
b) Embriología	71
c) Tejido epitelial.....	74
d) Tejido conectivo	74
e) Tejido muscular.....	77
f) Tejido nervioso	77
UNIDAD IX	80
A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA INCLUSIONES Y ACUMULACIONES EN LOS TEJIDOS	80
UNIDAD X	85
A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA MICROORGANISMOS	85
UNIDAD XI	90
A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA PARÁSITOS	90
a) Conservación de Helminintos	90
b) Métodos de Tinción general para céstodos, tremátodos y nemátodos.....	90
RECOMENDACIONES	93
APÉNDICE A (reactivos generales)	94
APÉNDICE B (figuras)	100
BIBLIOGRAFÍA	105

RESUMEN

Durante años se ha venido incrementando en la práctica de la medicina veterinaria y zootecnia la necesidad de un diagnóstico rápido y acertado, así como en otras disciplinas afines. Esto ha dado como consecuencia un avance en la tecnología (Instrumentos y procedimientos) y un desarrollo en los profesionistas del área de las ciencias biológicas.

Para el diagnóstico de enfermedades en histopatología, es importante conocer que las técnicas de estudio se dividen en inmediatas o vitales, que se realizan en tejidos vivos y en mediatas o postvitales, que se realizan en tejidos muertos.

Para la observación de los tejidos vivos o muertos existen diferentes métodos y procedimientos, que facilitan la apreciación de los elementos celulares así como los detalles estructurales. Esto permite al médico veterinario conocer la estructura celular y de la constitución de los órganos.

Una de las técnicas mediatas más comúnmente utilizadas en histología, es la de inclusión en parafina, la cual permite la obtención de preparaciones permanentes de tejidos histológicos.

El propósito de la realización de este manual, es reunir la información básica y necesaria, para la correcta aplicación de las técnicas histológicas más comunes y de diagnóstico en medicina veterinaria, que sirvan de apoyo y de guía para los médicos, técnicos y estudiantes del área.

En este manual se incluirán las técnicas histológicas e histopatológicas, que son utilizadas con más frecuencia en los laboratorios de Histología, Histopatología, Microbiología, Laboratorio Clínico y Parasitología, así como también recomendaciones prácticas, ventajas y desventajas de algunas técnicas.

OBJETIVOS

- a) Describir detalladamente las técnicas histológicas e histopatológicas, más usuales para el diagnóstico, respectivamente, dentro del trabajo del médico veterinario zootecnista.
- b) Reunir la información básica y necesaria para la mejor aplicación de las distintas técnicas histológicas e histopatológicas más comunes.
- c) Proporcionar recomendaciones técnicas que sirvan de apoyo en la aplicación práctica de las técnicas histológicas, para los médicos veterinarios zootecnistas, que requieran de éstas.
- d) Contribuir con la elaboración de material de apoyo para las asignaturas de Citología, Histología y Embriología, Patología general, Laboratorio clínico, Microbiología y Parasitología de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista.
- e) Elaborar una fuente de consulta técnica para los profesionistas del área de las ciencias biológicas y de la salud del país.

INTRODUCCIÓN

Histología es un término derivado de las raíces griegas *histos*, que significa tejido, y *logos*, que significa "estudio de". Entonces, literalmente, se refiere al conocimiento o ciencia de los tejidos, tanto vegetales como animales (1).

En el medio del médico veterinario, se ha incrementado la necesidad de un diagnóstico rápido y expedito, tanto de laboratorio como en la clínica (2).

La información básica necesaria para este propósito se encuentra por lo general dispersa, y es de difícil acceso para el estudiante y el profesional no relacionado con el tema. En este manual serán incluidas las técnicas de diagnóstico utilizadas con más frecuencia en los laboratorios de Histología, Histopatología, Laboratorio clínico, Microbiología y Parasitología; a partir de las siguientes muestras de tejido fijado, y trabajado por el método de rutina de inclusión en parafina, por medio de frotis, (exfoliación, punción, Impronta), útiles para el diagnóstico hematológico y de citología exfoliativa (2,3).

La necesidad del saber histológico surge como respuesta a la búsqueda de un sustrato anatómico elemental del organismo humano. Aristóteles señalaba que todos los seres vivos estaban constituidos por unos pocos elementos que se repetían en cada uno de ellos, estableciendo el concepto *pars* o partes similares para designar las unidades anatómicas elementales de estos seres vivos (4).

En el siglo XVII se comienza a usar un rudimentario microscopio óptico. Leeuwenhoek perfeccionó las lentes compuestas que permitieron el uso de aumentos mucho mayores en la observación. Surge la teoría fibrilar propuesta por Falopio y Fernel, en la que se tiene a la fibra como la unidad morfológica elemental, ellos delimitan que todas las partes sólidas de los organismos vivos están constituidos por fibras (4).

Hacia 1674 Roberto Hooke utiliza el término de *célula* o *celidilla* que quiere decir espacio vacío, al describir sus hallazgos acerca de la estructura del corcho, mediante lentes de aumento simples (4,5).

Hacia finales del siglo XVIII va a surgir un nuevo concepto de tejido, por la obra de Xavier Bichat. Bichat disecciona los distintos órganos hasta obtener fragmentos homogéneos que sometía a cocción, maceración, putrefacción, desecación o incluso tratamiento con sustancias químicas. Con Bichat queda definido el concepto de *tejido* como unidad morfológica funcional de los seres vivos, que se caracteriza por la homogeneidad y la constancia de su apariencia sensorial, los órganos de que proceda o las manipulaciones que sufra, según este concepto los órganos estarían formados por la combinación de sistemas simples y su función estaría determinada por la combinación de las actividades vitales de los tejidos (4).

En 1819, el anatomista Meyer de Bonn ideó el término *histología* para designar a la ciencia que estudia los tejidos (4,5).

En el siglo XVIII se abandona la teoría fibrilar y surge la teoría celular de Schlegden y Schwann (4).

Posteriormente, Rodolph Virchow establece que *allí donde nace una célula existía otra previamente*, con lo que se corrige la idea de la generación espontánea (4).

A fines del siglo XIX se desarrolló comercialmente el *micrótopo* (instrumento para preparar cortes de tejido para su estudio), y al mismo tiempo vino el desarrollo de las técnicas de fijación, inclusión y técnicas de tinción, las cuales se fueron perfeccionando con el paso de los años (1).

En la actualidad son casi innumerables los recursos prácticos empleados para la demostración de las partes más elementales de los organismos. Las técnicas histológicas se han convertido cada vez más sofisticadas y especializadas (1,5,6).

En los últimos 30 años, con el uso creciente del microscopio electrónico por los histólogos se ha extendido en gran medida el territorio de esta ciencia de tal modo que ahora incluye la ultraestructura de los tejidos y buena parte de la biología celular. Así la histología trata de la estructura de los seres vivos a todos los niveles de organización, desde el límite inferior de la observación visual directa hasta la estructura de las moléculas (7).

UNIDAD I

A. GENERALIDADES PARA LAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE RUTINA

Llámase técnica histológica al conjunto de operaciones destinadas a demostrar en un tejido, ya sea sano o con alguna lesión, sus características estructurales, relaciones topográficas, sustancias producidas y almacenadas natural o patológicamente, pigmentos y microorganismos (8,9).

La técnica histológica requiere esencialmente de cuatro aspectos básicos, para poder ser llevada a cabo:

1. Aparatos y técnicas de observación.
2. Reactivos, equipo y material de laboratorio.
3. Técnicas de estudio.
4. Procedimientos de conservación (10)

a) Aparatos y técnicas de observación

Gran parte del conocimiento acerca de las características microscópicas de los organismos, proviene de disecar pequeñas porciones representativas de los tejidos, y del corte de estas en rebanadas muy delgadas, conocidas como cortes histológicos, adecuados para la observación al microscopio. Los cortes deben ser lo suficientemente delgados como para permitir una transmisión apropiada de una onda de luz. En el microscopio óptico ésta proviene de la fuente de iluminación del mismo, y debe pasar íntegramente a través del grosor del corte, antes de llegar al lente del objetivo, la lente del ocular y finalmente al ojo (11).

Los aparatos más utilizados actualmente en el estudio histológico son: el de observación, (microscopio) y el de corte, llamado micrótomo (8).

b) Reactivos

Reactivo en histología, se considera, a la sustancia natural o sintética que provoca en los tejidos modificaciones físicas o químicas, que pueden ser apreciables o no, y que proporcionan características útiles para su ulterior procedimiento, conservación y estudio (10).

Se clasificarán los reactivos dando prioridad a la principal modificación que provoquen en el tejido:

Reactivos inofensivos

Se utilizan en general, en soluciones que alteran poco o nada la forma y vitalidad de los elementos anatómicos del sujeto de estudio. Siendo usados como en los métodos inmediatos por ejemplo: solución salina fisiológica (SSF), solución de Hanks, líquido de Ringer para mamíferos y para aves, líquido de Locke, líquido de Elzorer, plasma y anticoagulantes (10)

Reactivos nutritivos o medios de cultivo

Se usan principalmente para el desarrollo de cultivos de tejidos y de células, los medios utilizados se pueden agrupar en cuatro grandes grupos:

- a) Medios esenciales para sobrevivencia inmediata de las células.
- b) Medios esenciales para sobrevivencia prolongada de las células.
- c) Medios esenciales para el crecimiento celular indefinido.
- d) Medios esenciales para funciones especializadas.

Los más usados son: medio de Eagle, medio de Earle y medio 199 (12).

Reactivos alisadores

Rompen total o parcialmente los distintos puentes de unión que mantienen a las células unidas y formando al tejido. Los más empleados son: hidróxido de sodio al 40% , ácido nítrico al 25 % ó 30 %, líquido de Schiefferdecker, ácido sulfúrico concentrado o al 5 %, tripsina al 0.25 % y (10).

Reactivos ablandadores

Estos reactivos disminuyen la dureza del tejido, por la extracción o disolución de sales minerales propias de la estructura ósea o dentaria, o bien por el reblandecimiento de las estructuras cuticulares duras. Entre los más comunes tenemos: ácido nítrico al 5 %, ácido clorhídrico al 10 %, ácido pícrico en solución acuosa saturada, ácido fórmico al 30 % y ácido tricloroacético al 2 %, entre otros (10).

Reactivos fijadores

Tanto en histología como en histopatología, la mayor parte de las muestras que se procesan, son fijadas antes de ser examinadas o bien de ser procesadas.

Los reactivos fijadores previenen la autólisis y la descomposición producida por agentes bacterianos, mediante la coagulación y/o precipitación de las proteínas, confiriendo al tejido estabilidad por la formación de puentes de unión (grupos amino, imino, amido, peptido, guanidilo, hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo y anillos aromáticos), formando así un gel, que hace posible el manejo en los subsecuentes estudios de la técnica histológica (1,5).

La cualidad esencial de un buen fijador es su poder de penetración, es decir, que pueda fijar al mismo tiempo zonas profundas y las capas superficiales (13).

Ningún fijador por sí solo posee todas las cualidades deseables, por lo que se utilizan **fijadores simples**; constituidos por una sola sustancia química, o **compuestos o mezclas fijadoras**; cuando varias sustancias intervienen en su constitución. La elección de un fijador suele estar determinada por el tejido en particular o su componente que se va a estudiar y por su método de tinción que se usará (1, 14)

Algunos de los reactivos fijadores más usados son:

Formaldehído en solución, ácido pícrico, etanol, metanol, acetona, cloroformo, ácido acético, bromuro de amonio, bicloruro de mercurio, bicromato de potasio, trióxido de cromo y tetraóxido de osmio, nitrato de uranio, nitrato de plomo, cloruro de cadmio, nitrato de cobalto, dioxano, isopropanol, paraformaldehído y glutaraldehído (10).

Reactivos aclarantes

Actúan borrando o moderando los índices de refracción (es un medida de la densidad óptica de un objeto o la velocidad con que es atravesado por una onda luminosa) de los elementos tisulares. Mientras menos contraste más claros aparecerán y más fácil será la apreciación de los elementos coloreados. Los reactivos más usados en el laboratorio son: xileno, tolueno, benceno, cloroformo, butanol y creosota (1,5).

Reactivos opacantes

Actúan de modo contrario a los reactivos aclarantes, oscureciendo el contorno celular y robando transparencia a la preparación. Este efecto es útil cuando se observan células

sueltas, filamentos libres y superficies que exhiben expansiones delicadas. Entre estos tenemos: el aire, agua, alcohol y éter (5).

Reactivos colorantes e Impregnadores

Los reactivos colorantes son sustancias que ceden o confieren su color a otras sustancias o estructuras. Esto permite distinguir y diferenciar las estructuras que son ópticamente invisibles antes de ser coloreadas (10).

Los colorantes se clasifican:

A) Por su origen:

a) Colorantes naturales:

- 1) Animales: Carmín de la cochinilla
- 2) Vegetales: Hematoxilina del *Hematoxylum campechianum* (palo de campeche)
Orceína de los líquenes
Safranina del azafrán

b) Colorantes artificiales, conocidos como colorantes de anilina, colorantes de carbón o colorantes sintéticos:

Eosina, azul de metileno, fucsina ácida, cristal violeta, azul de anilina.

B) Por su pH:

a) Ácidos: eosina, ácido pícrico, verde luz, naranja G, carmín de índigo fucsina ácida

b) Básicos: hematoxilina, rojo nuclear sólido, fucsina básica y azul de toluidina.

c) Neutros: Sudan III y IV, Sudán B, rojo de aceite, azul de metileno (10,14,15).

Los reactivos impregnadores se depositan selectivamente, en ciertas estructuras del tejido, para después sufrir una reducción en su estructura química. Estos reactivos son el ácido ósmico, el nitrato de plata amoniacal, el cloruro de oro y el bicromato de potasio (5).

Reactivos conservadores

Son aquellas sustancias que protegen las preparaciones permanentes y perecederas, de la putrefacción, la pérdida de color y de las alteraciones que puedan sufrir durante las maniobras de obtención, fijación, corte y coloración. No se debe confundir con los reactivos fijadores. Como ejemplos podemos mencionar a la glicerina, bálsamo de Canadá, licor de Ferrant, solución de Von Apathy y las resinas sintéticas (10).

c) Equipo y material de laboratorio

Se llamara equipo a los distintos aparatos que se requieren en algún momento para: calentar, enfriar, incluir, cortar, flotar y colorear las muestras que se trabajan, y por otro lado, como material de laboratorio, a la cristalería y a los distintos utensilios que se necesitan para preparar y aplicar los distintos reactivos en la técnica histológica

Equipo

- Pinza, pincel, navaja
- Estufa bacteriológica
- Moldes individuales de plástico o aluminio

- Baño de flotación
- Charolas
- Estufa o platina eléctrica (5,17).

Materia de laboratorio (cristalería)

- Vasos de precipitados
- Matraces graduados y no graduados
- Probetas y pipetas graduadas
- Cajas de Petri. Cajas y vasos de Koplín
- Frascos goteros
- Frascos con tapón esmerilado para reactivos
- Cristalizadores
- Vidrios de reloj
- Frasco de boca ancha con tapón de rosca
- Cubreobjetos y portaobjetos
- Embudos y papel filtro (5).

d) Técnicas de estudio

Las técnicas de estudio en histología e histopatología, se dividen en dos grandes grupos: las técnicas inmediatas, vitales o practicadas en organismos y tejidos vivos; y las técnicas mediatas, postvitales o practicadas en organismos y tejidos muertos (14).

Técnicas inmediatas o vitales

Por técnica inmediata o vital se entiende la observación microscópica de los elementos anatómicos, hecha directamente sobre los elementos vivos; o al menos en un estado lo más próximo posible al que presentan durante la vida (14).

1. Organismos vivos, sin coloración.

A. Tejidos íntegros:

- Órganos transparentes (mesenterio, lengua y pulmón de rana)
- Líquidos orgánicos (plasma, líquido cerebroespinal)
- Explante de órganos (hígado de pollo, membrana sinovial)

B. Tejidos disociados:

- Cultivos celulares

2. Organismos vivos, coloreados:

- Coloración vital
- Coloración supravital (1,10,14)

Técnicas mediatas o postvitales

En organismos y tejidos muertos

Técnicas para hacer preparados permanentes:

Un preparado permanente debería mostrar la misma organización morfológica y composición química que tenían cuando estaban vivas las células. Sin embargo esto no es

posible, y por ello todos los preparados histológicos presentan artefactos que son imperfecciones producidas en las células por las técnicas utilizadas (16).

El corte histológico es un preparado permanente, el cual se prepara rebanando una porción pequeña de tejido fijado para obtener un fragmento muy delgado, que después se tiñe, se monta en un medio con un índice adecuado de refracción sobre un portaobjetos y finalmente se cubre con un cubreobjetos. Los diversos modos en que se puede preparar los cortes constituyen la técnica histológica (1).

1) Fijación

Es la primera etapa para la obtención de un preparado permanente y tiene como objetivos: 1. Coagulación o precipitación de los constituyentes celulares sin que estos se diluyan, desintegren o alteren. 2. Acción mordente, para producir condiciones de superficie en las estructuras fijadas, que las capaciten para retener los colorantes que las hacen visibles, y 3. Endurecimiento, para que resistan el corte (13).

2) Deshidratación

El propósito de la deshidratación es remover toda el agua libre del tejido fijado y lavado, y reemplazarla con un solvente orgánico y esto se logra sumergiendo el bloque en alcoholes de concentración creciente, hasta que ya no contenga agua sino solo alcohol absoluto.

3) Aclaración

El solvente más utilizado en el aclaramiento es el xileno. Se pasa la pieza de tejido deshidratado con alcohol etílico, a través del xileno en cambios sucesivos, hasta sustituir al alcohol por el xileno en la preparación para la inclusión. El uso de xileno es necesario porque el alcohol etílico no es miscible con el medio de inclusión (parafina), y el xileno es miscible con ambos (6,11,).

4) Inclusión

Antes de proceder a cortar las piezas fijadas, deben ser incluidas en un medio que confiere solidez, elasticidad y cohesión al tejido. Este medio de inclusión debe ser lo más químicamente neutro posible para no afectar la coloración y/o impregnación del tejido a nivel celular. Existen varios medios de inclusión, siendo uno de los más utilizados la parafina y la resina sintética; la inclusión en celoidina, se recomiendan para materiales de grandes dimensiones o excepcionalmente duros y la inclusión en gelatina, se utiliza como método previo para mantener unidos diferentes elementos heterogéneos, que deben cortarse por congelación (17).

5) Microtomía

Los bloques de parafina, que contiene los tejidos incluidos, son seccionados por la cuchilla de acero del aparato llamado micrótopo, obteniéndose generalmente cortes de 3 a 8 μm de espesor. Estos cortes son extendidos en agua caliente y después adheridos en láminas de portaobjetos (esto se explicara más adelante) (18).

6) Coloración

Se realiza con el fin de conocer la morfología de todos los constituyentes de un tipo celular, mediante diversos preparados que revelan determinadas estructuras. La mayoría de los colorantes en histología se comportan como ácidos o básicos. Sin embargo, no son netamente ácidos o bases, sino sales neutras que se disuelven en agua, en la cual se disocian dando aniones y cationes, que se unirán a la superficie o estructura de la preparación (8,16).

Para que una sustancia funcione como colorante debe contener dos clases de grupos químicos activos cromófilos y auxocromos. Los grupos cromófilos imparten la propiedad de color y los grupos auxocromos le confieren al colorante la capacidad de unirse al componente celular y para disolverse y disociarse en el agua (13).

En ciertos casos es necesaria una sustancia adicional para facilitar la reacción de coloración. Tales sustancias, llamadas mordentes, normalmente son sales de metales di y trivalentes; entre ellos están los sulfatos dobles conocidos como alumbres; la sal es capaz de combinarse con la estructura celular y con el colorante (13).

El tipo más simple de coloración es la tinción progresiva, en la que la intensidad del color que se imparte es proporcional al tiempo de inmersión en el colorante. Otro tipo de coloración es la que se denomina regresiva; ésta permite un exceso de tinción para después obtener el óptimo mediante una diferenciación con etanol y ácidos. Este proceso se denomina **diferenciación** (13,14).

e) Técnicas especiales de preparación

Impregnación

La impregnación metálica se basa en la producción de un fino precipitado de metal sobre determinados elementos de los tejidos. El metal puesto en contacto con ellos bajo la forma de solución salina es reducido en parte por la acción propia del tejido y en parte gracias a sustancias reductoras tales como la luz (19).

Coloraciones en bloque

Este método muy usado en otros tiempos, es aún utilizado, aunque poco, principalmente para el estudio de animales enteros. Las coloraciones en bloque son sobre todo directas, simples y progresivas y deben ser aplicadas con colorantes muy penetrantes como el carmín y la hematoxilina. Este procedimiento es muy económico y permite montar los cortes inmediatamente, pero no se obtienen nunca coloraciones tan delicadas como la tinción sobre los cortes.

Citología exfoliativa

Es el estudio de las células, específicamente abarca el examen microscópico de las células individuales que se han exfoliado de un determinado tejido o estructura. A diferencia de la histopatología, la citología no evalúa la arquitectura de un tejido en algunos casos no puede tener utilidad diagnóstica. La citología puede utilizarse para diferenciar las lesiones inflamatorias de las no inflamatorias, o una lesión inflamatoria de un tumor neoplásico. El

análisis citológico permite efectuar un diagnóstico muy específico y, para determinar muestras, como las de médula ósea o tumores de células cebadas, puede ser de mayor utilidad que un examen histopatológico. La citología es un complemento y no un sustituto de la histopatología (20).

Las muestras para estos estudios pueden ser: sangre, secreciones vaginales, cervicales, raspados conjuntivales, lavados traqueales, sedimento urinario, líquido cefalorraquídeo, improntas, biopsias con aguja fina, al igual que aspirados y secreciones de cualquier parte del cuerpo (21)

Histoquímica

El depósito de colorantes específicos en determinadas regiones sea resultados de propiedades químicas o físicas propias del tejido, constituye la base de la histoquímica. El objetivo de la misma es la localización de áreas específicas o componentes celulares de los compuestos químicos ya conocidos por medio de análisis bioquímico. En la actualidad se dispone de métodos histoquímicos para muchas sustancias inorgánicas y orgánicas. Ejemplo de las primeras es la adaptación de la reacción del azul de Prusia para el descubrimiento del hierro (1).

Inmunocitoquímica

Esta técnica es útil para la microscopía de luz y electrónica para identificar y localizar sustancias potencialmente antigénicas (proteínas, polisacáridos). El extracto purificado de la sustancia deseada se prepara e inyecta como un antígeno (Ag) en otro animal. Este desarrolla una respuesta inmunitaria y anticuerpos (Ab). Los anticuerpos se aíslan y purifican. La naturaleza del proceso siguiente está determinada por la técnica inmunoquímica usada. En la *técnica directa de anticuerpos fluorescentes* se une un colorante fluorescente, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) con el anticuerpo. El complejo FITC-Ab se une al espécimen muestra y con lavados subsecuentes se eliminan los restos del reactivo excepto el que está unido a el Ag-Ab-FITC. El examen con luz ultravioleta demuestra fluorescencia en la localización del antígeno (21).

Los marcadores usados en esta técnica no se limitan a colorantes fluorescentes. La enzima peroxidasa puede conjugarse con el anticuerpo o la antioglobulina. La visualización del complejo reactivo confirma la actividad de peroxidasa (21).

Esta técnica es útil en el diagnóstico bacteriano, pero también pueden usarse como antígenos muchos materiales histológicos, como hormonas hipofisarias, factores de liberación hipotalámicos, inmunoglobulinas específicas y otros. Con esta técnica puede localizarse cualquier sustancia corporal que pueda inducir una respuesta humoral de anticuerpos en otro animal (21).

Radioautografía

Esta técnica se basa en la sensibilidad de las emulsiones fotográficas a las radiaciones ionizantes. Como en las células no existen normalmente elementos radiactivos, si a un tejido de un organismo se le suministran de modo (que solo se incorporen a una o varias sustancias

determinadas), se puede seguir el camino de dichos isótopos por el tejido y, por lo tanto, de dichas sustancias, viendo a que tipos celulares del tejido en estudio se incorporan y, de esas células, a qué organelos o estructuras celulares lo hacen, y seguir, de este modo, la transformación de dichas estructuras (22).

f) Procedimientos de conservación

La protección de los cortes teñidos se consigue mediante el uso de cubreobjetos. Los cortes teñidos no aguantan la desecación, y es preciso interponer entre el portaobjetos un medio de montaje que reúna una serie de condiciones (17)

El medio de montaje protege la preparación teñida de las lesiones físicas y del aclaramiento o deterioro del colorante a consecuencia de las oxidaciones. El mejor medio de montaje debe tener un índice de refracción parecido al cristal, ser completamente miscible con el xileno y tolueno, inerte químicamente, y no cambiar de pH ni de color; debe solidificarse sin deformar o encoger los cortes de tejidos, y sin producir gránulos o grietas, ni dañar los colorantes, ni modificar el color con el tiempo. Un medio de montaje de este tipo pertenece a la categoría de permanente; también se conoce cierto número de medios de montajes temporales o semipermanentes (23).

Técnica de montaje permanente

El portaobjetos con el corte se saca con pinzas del baño de xileno; primero se limpian los extremos, para poder ver el número grabado con diamante, lo que permite identificar la cara superior (sobre la cuál se encuentra el corte). La cara inferior se seca con un paño limpio, seco y suave, y lo mismo se hace con la cara superior, hasta 2 ó 3 mm de los bordes del corte. Con un pequeño agitador de vidrio, se coloca en el centro de un cubreobjetos de tamaño conveniente una pequeña cantidad de medio de montar. Luego, el portaobjetos se pone vertical sobre su lado mayor, tocando el borde del cubreobjetos y se inclina gradualmente con el corte hacia abajo, hasta tocar el medio de montaje sobre el cubreobjetos. En este momento el medio de montaje se extiende rápidamente sobre todo el corte todavía húmedo de xileno, y alcanza los bordes del cubreobjetos (23).

La cantidad de medio de montaje que debe ponerse sobre el cubreobjetos se aprende con la experiencia: si se pone demasiado, sobresale de los límites del cubreobjetos, y debe cuidarse cuidadosamente con la uña cubierta con un paño fino mojado en xileno. Si se utiliza demasiado poco medio de montaje, o está demasiado diluido, en el momento del secado se retrae de los bordes del cubreobjetos, y debe repetirse el procedimiento, quitando primero el cubreobjetos en un baño de xileno. A veces pueden verse regiones nebulosas en los cortes montados; se deben a la humedad, y significa que la deshidratación no ha sido suficiente. En este caso, el cubreobjetos debe remojarse en xileno; luego se vuelve a deshidratar la preparación en dos baños de alcohol absoluto, se pone en dos baños más de xileno y se vuelve a montar (23).

Otra dificultad con que tropieza el principiante es la presencia de burbujas de aire en el corte montado. Si existen muchas burbujas de aire, es mejor repetir el procedimiento; si

solamente existen una o dos pueden ser expulsadas por presión ligera sobre el cubreobjetos, utilizando la punta de una aguja de montar (23).

Medios de montaje permanente

Son resinas sintéticas o naturales (ver en reactivos conservadores).

Medios de montaje semipermanentes y provisionales

Para ciertas preparaciones es imposible utilizar un medio de montaje permanente de resina disuelta en xileno, porque éste disuelve los colorantes principales; son ejemplos de este caso los colorantes de las grasas (grasas neutras teñidas en cortes por congelación mediante rojo de aceite, Sudan IV, etc.). (ver en reactivos conservadores) (23).

Sellado de montajes provisionales y semipermanentes

Las preparaciones montadas como las que se emplean para grasa, metacromasia y la mayoría de las reacciones citohistoquímicas, se pueden proteger y volver más permanentes sellando (redondeando) los bordes limpios y secos con distintos reactivos. Estos incluyen jalea de glicerina, solución de Von Apathy, parafina sólida, barniz para uñas o cualquiera de los numerosos pegamentos caseros. Es ventajoso un aplicador metálico en forma de T que puede prepararse a partir de lámina de cobre gruesa de 3.5 mm de espesor (23).

UNIDAD II

APARATOS DE OBSERVACIÓN Y DE CORTE

a) Aparatos de observación

Microscopio compuesto

El microscopio compuesto difiere del microscopio simple en que, en vez de que el objeto se observe directamente a través de una lente de aumento, primero se produce una imagen real mayor del objeto y después se utiliza una segunda lente de aumento para observar esta imagen. La primera lente que produce la imagen real del objeto (imagen primaria) se conoce como objetivo y la segunda lente, la que se utiliza como lente de aumento (imagen secundaria que percibe el ojo) se llama ocular (24).

Todo microscopio compuesto comprende una **parte mecánica**, que sirve de soporte y una **parte óptica** constituida por tres sistemas de lentes: el condensador, el objetivo y el ocular. Ambas se complementan y deben ser lo más perfectas posibles para obtener el mejor rendimiento (5).

La parte mecánica comprende el pie o estativo, el brazo o columna, la platina y el tubo principal. La parte óptica consta de espejo o prisma, que refleja la luz de la lámpara, además del condensador, objetivos y oculares (5).

La función del condensador es proyectar un cono de luz en el plano del preparado que se está examinando al microscopio. El haz luminoso en forma de cono después de atravesar las células alcanza el objetivo, que proyecta una imagen aumentada en el plano focal del ocular. El que nuevamente la amplía. Por último esta imagen dada por el ocular puede percibirse a la retina como una imagen situada a 25 cm. del ocular (16).

El aumento total o poder de amplificación del objetivo se determina multiplicando el poder de amplificación del objetivo por el ocular. el aumento máximo que en la mayoría de las condiciones se puede obtener cercano es de 100 veces (100 X); y la mayoría de los microscopios compuestos tienen lentes objetivos que amplifican 10 X , 40 X o 100 X. Estos lentes están montados en una pieza o base rotatoria llamada pieza nasal o revolver, para que los lentes puedan rotar fácilmente y moverse a la posición que sea necesario. La mayoría de los lentes oculares amplifican 10 X , aun cuando hay disponibles lentes de 1.5 X a 20 X. Así, utilizando el ocular 10 X con lentes objetivos varios, se obtienen amplificaciones totales de 100 X (10 x 10), 400 X (40 x 10) o 1000X (100 x 10). Las amplificaciones más pequeñas se usan para observar áreas grandes de los objetos relativamente grandes, y las amplificaciones mayores se emplean para las observaciones más detalladas o áreas seleccionadas de un objeto (25).

El microscopio compuesto permite identificar el objeto con mayor detalle. Si no se tiene claridad en el detalle, junto con la amplificación, la imagen será cada vez más borrosa y poco precisa. Por tal causa es importante diferenciar la magnitud en la cual aumenta el tamaño de un objeto con la imagen, que es la **amplificación** y la magnitud con que se reproducen fielmente los detalles de dicha imagen, aspecto llamado **resolución**. Esta última es el grado de separación que puede detectarse entre puntos vecinos (detalles) de la muestra. Cuando la

distancia que puede distinguirse entre dichos puntos, mayor será en detalle en la imagen. A distancias cortas tiene el aspecto de diferentes entidades para el ojo a simple vista, sólo si están separados por 0.2 mm (200 μm) o más, pero si se utiliza un buen microscopio de luz, es posible diferenciar puntos incluso a 0.25 μm de distancia; ésta es la menor que se detecta entre dos detalles cualquiera entre un objeto por empleo del microscopio de luz, y representa su *límite de resolución*. La fidelidad con cualquier microscopio reproduce la imagen de una cosa con todos los detalles presentes en la pieza es limitada, por que la resolución está en función de la longitud de onda de la energía (luz) utilizada para iluminación. particular, es utilizar energía con longitud de onda más pequeña, que se logra utilizando un haz de electrones (microscopio electrónico) en vez de rayos luminosos (11).

Objetivo con inmersión de aceite. El objetivo de este tipo debe ser llevado en íntima cercanía con la laminilla. Para realizar la maniobra anterior en forma apropiada, en primer lugar se empleará el tornillo de ajuste macrométrico, para descienda la platina antes de ajustar en su sitio el objetivo de inmersión en aceite. En este momento se aplica una gota pequeña del aceite al cubreobjeto, en tanto se rastrea la pieza con el objetivo de un lado a otro, y la platina se eleva hasta que el objetivo haga contacto con el aceite. Después se enfoca con el tornillo micrométrico, hasta que se observe la preparación. (11).

b) Tipos de microscopia más empleados

Microscopia de contraste de fases

Aunque las estructuras sin colorear no absorben la luz, la modifican, retrasando algunas longitudes de onda más que otras. De este modo, la luz puede penetrar en un preparado estando en fase es decir, con las crestas y los valles de las ondas integrantes en correspondencia; pero los componentes del espécimen, que poseen distintas densidades ópticas retrasan las ondas en forma diferencial y colocan unas fuera de fase respecto de otras. Estas diferencias de fase no son percibidas por el ojo humano. La función del microscopio de contraste de fases consiste en transformar las diferencias de fase en diferencias de amplitud, combinando las ondas retardadas con las que no están en fase, lo cual anula o disminuye la amplitud de las ondas retrasadas. El microscopio de contraste de fases permite así observar detalladamente la sustancia sin colorear, y de esta manera resulta adecuado para estudiar las células vivas (26).

Microscopia de campo oscuro

Este microscopio también produce contraste en el material no teñido. Su eficacia se basa en la exclusión del haz de luz central que llega al objetivo desde el condensador en el microscopio de luz visible. En cambio, aquí el espécimen es iluminado por la luz que viene en forma oblicua (desde los costados). Si existen objetos de mayor densidad óptica que el medio que los rodea como, por ejemplo, bacterias que se muevan en un medio líquido, desviarán la luz en el objetivo del microscopio y aparecerán como imágenes brillantes sobre un fondo oscuro. El efecto es similar al de las partículas de polvo que se ven en un haz de sol en una

habitación oscura. Esta técnica que revela poco o nada de la estructura interna de las partículas brillantes, especialmente para la identificación de las bacterias móviles en líquidos, y muchas veces se la ha reemplazado por la del microscopio de contraste de fases (26)

Microscopía de Interferencia

Este microscopio se basa en principios similares, que los anteriores, pero tiene la ventaja de proporcionar resultados cuantitativos. Con este microscopio se pueden determinar cambios en el índice de refracción, y las variaciones de fase se pueden reflejar en cambios de color tan acentuados que una célula viviente es capaz de aparecer coloreada (22).

Una variante de este microscopio es el microscopio de *Nomarski*, en el que el rayo de luz tras atravesar el objeto y el objetivo, por medio de un prisma birrefringente, se divide en dos rayos que interfieren entre sí. La imagen resultante tiene un efecto de relieve característico. Este microscopio es particularmente útil en el estudio *in vivo* de las células (22).

Microscopía de luz ultravioleta

Se basa en el empleo de luz ultravioleta en vez de luz visible. Su sistema óptico suele ser de cuarzo, puesto que el vidrio óptico tiende a absorber la luz ultravioleta. La imagen producida por la radiación en el ocular del microscopio se registra en un filme fotográfico, ya que la luz ultravioleta es invisible y daña la retina. El valor de este microscopio reside en el hecho de que ciertas estructuras celulares muy importantes, en especial las que contienen ácidos nucleicos, absorben la luz ultravioleta y pueden así ser demostrados. Como la longitud de onda de la luz ultravioleta es más corta que la de la luz visible, este microscopio posee una resolución algo superior a la del microscopio común (1,26)

La luz ultravioleta también se emplea en la *microscopía de fluorescencia*. Muchas sustancias tienen la propiedad de emitir luz visible cuando se irradian con rayos invisibles. Cuando la luz ultravioleta se enfoca sobre una de estas muestras, ésta brilla y se puede observar por su fluorescencia emitida. La fluorescencia se puede presentar en su forma natural dentro de la muestra o puede ser resultado de introducir colorantes fluorescentes que se ligan a ciertos componentes específicos de ella (1).

Microscopía electrónica

En física se establece que el *límite de resolución*, es decir, la resolución máxima del microscopio común o de luz, es de $0.2 \mu\text{m}$, aproximadamente, que es impuesto por la longitud de onda de la luz visible. Sin embargo el descubrimiento de que podían utilizarse lentes electromagnéticas para "adaptar" y enfocar un haz de electrones, acelerado por voltaje, es muy pequeña, y de ese modo, permitió una resolución mucho mayor de la que se obtenía con los rayos luminosos. Se conoció esta técnica como *microscopía electrónica*, y se basa en el principio de usar un haz de electrones, en vez de rayos luminosos. El instrumento puede lograr resoluciones de 1 nm en muestras biológicas (1 nm es igual a la milésima de micrómetro o micra) (11).

Microscopio electrónico por transmisión. Las características ópticas son las siguientes: los electrones son desviados por los campos electromagnéticos variables de las lentes electromagnéticas. Todo instrumento, en esencia, es tubo de rayos catódicos en el cual se necesita conservar el vacío por medio de bombeo continuo, porque los electrones hacen viajes muy cortos en el aire. De un cátodo calentado eléctricamente, que es un filamento de tungsteno en forma de , los electrones se desplazan y son acelerados hacia el ánodo (generalmente por una diferencia potencial de 50 a 100 kilovoltios). El ánodo posee una abertura a través de la cual pasa el haz de electrones, para ser enfocado por la lente del condensador, en la pieza (11).

Al pasar los electrones por la muestra, algunos se dispersan y desvían del haz, por acción de las partes electrificadas de la pieza. Los electrones dispersos son eliminados del haz por la acción bloqueante de una *abertura ínfima*, que está exactamente por arriba de la lente objetivo. Tal abertura tiene como función brindar mayor contraste en la imagen. Los electrones que no son dispersos por las partes electrificadas de la muestra, son enfocados por la *lente objetivo* para producir una imagen ampliada de ésta. La imagen es ampliada todavía más, en primer término, por una lente conocida como *intermedia* y después por una *lente de proyección* que es la que proyecta la imagen en una *pantalla fluorescente* o en una *película fotográfica* para lograr así microfotografías electrónicas (11).

Microscopio electrónico de alto voltaje. En este aparato especial, la mayor aceleración de los electrones por medio de una diferencia de potencial mucho más grande (1000 a 3000 kilovoltios), incrementa en grado sustancial su capacidad de penetrar en los tejidos, y así usar cortes más gruesos e incluso observar todo el espesor de una capa de células en cultivo, incluso de 3 micrómetros de espesor. Este tipo de microscopio electrónico permite una mayor resolución (0.2 nm) y también la impresión de profundidad (11).

Microscopio electrónico de barrido. En el microscopio electrónico por barrido o tridimensional el haz de electrones rastrea la superficie de la muestra, en vez de pasar a través de ella. Los electrones reflejados y emitidos en forma secundaria desde un recubrimiento fino de metal pesado, se transforman en señales eléctricas que generan una imagen de la superficie en una pantalla de televisión. El registro de la imagen recibe el nombre de *microfotografía electrónica por barrido* (11).

La *lente condensadora* se usa para producir un haz angostísimo "a manera de un lápiz" de electrones, que pasa por una espiral de rastreo que se desplaza hacia un lado y otro sobre la superficie de la muestra en movimiento rápido, que corresponde al patrón de rastreo en la pantalla de televisión. En cada sitio en que el haz incide con la muestra, se emiten electrones secundarios desde el recubrimiento de su superficie, los que son reunidos por *detectores de electrones*, y su energía se convierte en una señal eléctrica, cuya intensidad se muestra en la posición correspondiente en una *pantalla de televisión*. El haz de rastreo sigue el mismo trayecto que el punto productor de imagen en la pantalla de televisión y viaja en sincronía con él para así generar la imagen. Las microfotografías se obtienen al captar la imagen de la pantalla de televisión (11).

Microscopio electrónico por transmisión. Las características ópticas son las siguientes: los electrones son desviados por los campos electromagnéticos variables de las lentes electromagnéticas. Todo instrumento, en esencia, es tubo de rayos catódicos en el cuál se necesita conservar el vacío por medio de bombeo continuo, porque los electrones hacen viajes muy cortos en el aire. De un cátodo calentado eléctricamente, que es un filamento de tungsteno en forma de , los electrones se desplazan y son acelerados hacia el ánodo (generalmente por una diferencia potencial de 50 a 100 kilovoltios). El ánodo posee una abertura a través de la cual pasa el haz de electrones, para ser enfocado por la lente del condensador, en la pieza (11).

Al pasar los electrones por la muestra, algunos se dispersan y desvían del haz, por acción de las partes electrónicas de la pieza. Los electrones dispersos son eliminados del haz por la acción bloqueante de una *abertura finísima*, que está exactamente por arriba de la lente objetivo. Tal abertura tiene como función brindar mayor contraste en la imagen. Los electrones que no son dispersos por las partes electrónicas de la muestra, son enfocados por la *lente objetivo* para producir una imagen ampliada de ésta. La imagen es ampliada todavía más, en primer término, por una lente conocida como *intermedia* y después por una *lente de proyección* que es la que proyecta la imagen en una *pantalla fluorescente* o en una *película fotográfica* para lograr así microfotografías electrónicas (11).

Microscopio electrónico de alto voltaje. En este aparato especial, la mayor aceleración de los electrones por medio de una diferencia de potencial mucho más grande (1000 a 3000 kilovoltios), incrementa en grado sustancial su capacidad de penetrar en los tejidos, y así usar cortes más gruesos e incluso observar todo el espesor de una capa de células en cultivo, incluso de 3 micrómetros de espesor. Este tipo de microscopio electrónico permite una mayor resolución (0.2 nm) y también la impresión de profundidad (11).

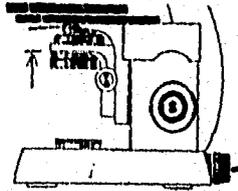
Microscopio electrónico de barrido. En el microscopio electrónico por barrido o tridimensional el haz de electrones rastrea la superficie de la muestra, en vez de pasar a través de ella. Los electrones reflejados y emitidos en forma secundaria desde un recubrimiento fino de metal pesado, se transforman en señales eléctricas que generan una imagen de la superficie en una pantalla de televisión. El registro de la imagen recibe el nombre de *microfotografía electrónica por barrido* (11).

La *lente condensadora* se usa para producir un haz angostísimo "a manera de un lápiz" de electrones, que pasa por una espiral de rastreo que se desplaza hacia un lado y otro sobre la superficie de la muestra en movimiento rápido, que corresponde al patrón de rastreo en la pantalla de televisión. En cada sitio en que el haz incide con la muestra, se emiten electrones secundarios desde el recubrimiento de su superficie, los que son reunidos por *detectores de electrones*, y su energía se convierte en una señal eléctrica, cuya intensidad se muestra en la posición correspondiente en una *pantalla de televisión*. El haz de rastreo sigue el mismo trayecto que el punto productor de imagen en la pantalla de televisión y viaja en sincronía con él para así generar la imagen. Las microfotografías se obtienen al captar la imagen de la pantalla de televisión (11).

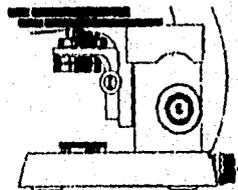
Las microfotografías por barrido son más fáciles de interpretar que las de transmisión, porque muestran la estructura en tres dimensiones. Sin embargo, la capacidad de resolución del microscopio por barrido no es tan grande como la del microscopio de transmisión (3 a 5 nm en el microscopio de barrido, en comparación con 1 nm del microscopio de transmisión) (11).

c) Técnica de observación según Köhler

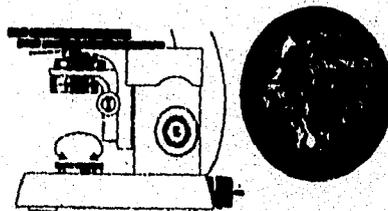
1. Subir completamente el condensador con la lente frontal introducida.



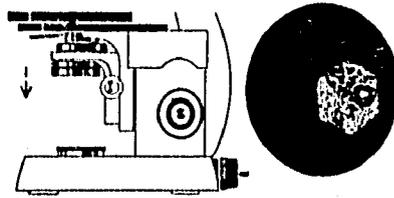
2. Enfocar la preparación con los objetivos 6,3, ó 10.



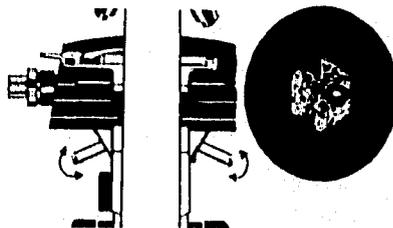
3. Observar y cerrar el diafragma dispuesto en el pie del microscopio.



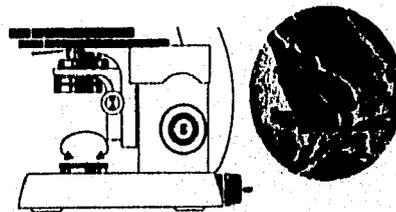
4. Bajar algo el condensador, hasta obtener máxima nitidez de la imagen del diafragma.



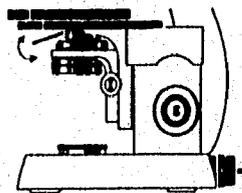
5. Centrar el diafragma de campo luminoso en el campo visual, recurriendo a los dos tornillos del condensador.



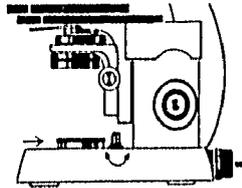
6. Abrir el diafragma de campo luminoso casi hasta el borde del campo visual, centrarlo con exactitud y abrirlo hasta que desaparezca detrás del borde del campo visual.



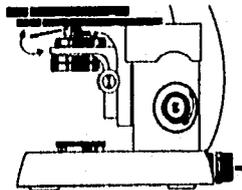
7. Regular el contraste de la imagen con la ayuda del diafragma del condensador



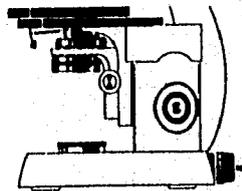
8. Insertar el filtro azul, regular la intensidad de la luz con el control de voltaje ó bien con la ayuda de los filtros neutros.



9. A cada cambio de objetivo: a) enfocar con el micrométrico. b) Contrastar con el diafragma del condensador.



10. Al utilizar objetivos panorámicos de bajo aumento (lupas) 2.8 X 3.2 X 4 X ó 5 X rebatir la lente frontal del condensador sin alterar su altura (27).



d) Aparatos de corte

Micrótomos

Son máquinas o instrumentos constituidos para obtener láminas muy delgadas (cortes) de tejidos. Según el tipo de trabajo, la forma en que se hizo la preparación y la inclusión del tejido, se emplean muchos tipos de micrótomos; algunos están adaptados para un trabajo especial. Generalmente, se consideran cinco clases de micrótomos: 1) de deslizamiento; 2) rotatorios, 3) de balanceo; 4) de congelación (criotomo), y 5) para cortes ultradelgados que se usan en microscopía electrónica. Estos pueden ser subdivididos según que las cuchillas sean móviles o fijas, o también según el plano de sección sea vertical u horizontal (23).

Micrótopo de deslizamiento. Los aparatos de este tipo, con cremallera vertical, fueron introducidos en 1798 por Adams. Ahora se dividen en un tipo en el cual la cuchilla es móvil y otro en el cual la cuchilla se mantiene entre pinzas. La variedad con cuchilla fija, donde lo que se desliza es la pieza de tejido, resulta superior para usos generales. Schanze, hace aproximadamente un siglo, diseñó un sujetador de cuchillas ajustable tanto para ángulos de deslizamiento horizontal como de deslizamiento angular. Este micrótopo (Leitz o M.S.E. Base Sledge Plano) es el preferido ya que es rígido, resistente, de diseño y construcción sencillos, fácil de mantener, y que calidad de los cortes obtenidos con él es difícilmente igualada por la de cualquier otro instrumento. Asimismo permite obtener grandes cortes y resulta fácil hacer cortes seriados (23).

Micrótopo rotatorio. Fue inventado por Minot en 1885-1886. El micrótopo rotatorio es probablemente el más empleado en Norteamérica (lo que dice mucho de su calidad). En el micrótopo rotatorio, sólo puede emplearse una longitud de cuchilla relativamente pequeña, y la cuchilla ocupa una situación peligrosa (con el filo hacia arriba). Además su diseño y construcción son complicados, lo que significa un costo elevado. Realiza cortes en series y la mayor parte de los investigadores lo encuentran más rápido en caso de cortes numerosos de bloques ordinarios (23).

Micrótopo de balanceo. Este micrótopo fue inventado por Caldwell y Trefall en 1881. Probablemente es el tipo más simple de todos los micrótopos; el bloque de tejido se monta en el extremo de un brazo móvil de resorte y la cuchilla se mantiene rígida en posición horizontal con el filo hacia arriba y ligeramente inclinado hacia el bloque. Este micrótopo se usa ampliamente en el Reino Unido, donde se le considera muy satisfactorio, especialmente en la preparación de cortes seriados. Fácilmente pueden obtenerse con él series de 60 a 90 cortes; éstos sin embargo no son absolutamente planos, si no que muestran una ligera curvatura (23).

Micrótopo por congelación. En general posee una cremallera central sobre la cual se coloca el sujetador del bloque, el cual es perforado y unido por un tubo a un cilindro conteniendo dióxido de carbono. Una simple válvula permite la liberación de chorros rápidos e intermitentes de dióxido de carbono que congelan el bloque y el tejido. La cuchilla suele ir montada en un pivote por encima del bloque. Este tipo de montaje fue iniciado por Queckel en 1948 (23).

Procedimiento de cortes por congelación, mediante dos variantes de micrótopo de congelación

Criostato

1. Encenderlo a 95° C de 1 a 2 horas
2. Bajar la temperatura a - 15° C durante 24 horas
3. Introducir la cuchilla, pincel, aguja o portaobjetos
4. Impregnar la pieza en solución saturada de sacarosa o azúcar común durante 24 horas
5. Pegar la pieza al portaobjetos del *criostato* y congelar

6. Aproximar la pieza a la cuchilla para cortarla, ajustando el ángulo de incidencia para obtener cortes sobre la superficie del protector de acrílico
7. Recuperar los cortes con el pincel y llevarlos a una solución fijadora, o se pueden recuperar del protector de acrílico con un portaobjetos limpio, que este a temperatura ambiente
8. Continuar el proceso con la técnica elegida (28).

Criotomo

1. Impregnar la pieza en una solución saturada de sacarosa o azúcar común
2. Abrir la llave del gas para enfriar y congelar, unas gotas de jarabe en el portaobjetos del criotomo
3. Colocar la pieza sobre la superficie ya preparada y abrir el gas para congelar la superficie
4. Deslizar la cuchilla para obtener cortes que no se enrollen o se fragmenten
5. Recuperar los cortes con un pincel y depositarlos en un vidrio de reloj, con el fijador elegido
6. Continuar el proceso con la técnica elegida (28).

UNIDAD III

A. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

a) Obtención de la muestra

Las muestras de tejido que se recolectan para los distintos procedimientos, en histología e histopatología, se deben manejar de acuerdo a su origen, tamaño y tipo de procesamiento que sufrirán posteriormente, por lo que la calidad y resultado de una técnica de estudio o diagnóstico dependerá directamente de la correcta obtención de las muestras y del manejo, que se les da inmediatamente después de colectadas (20).

b) Toma y fijación

Frotis

La sangre o el exudado, se deberá homogeneizar bien, agitando suavemente para colocar una pequeña gota en uno de los extremos del portaobjetos, el cual debe estar sobre una superficie sólida y plana. Con otro portaobjetos con borde aserrado (para extender), se coloca el extremo contra la superficie del primero, sosteniéndolo a un ángulo de 30° aproximadamente y deslizando suavemente, para extender la gota. Se seca al aire y se fija con alcohol metílico, 5 minutos. El método seguido para la preparación de los frotis no es importante si el resultado es una capa de espesor unicelular con células separadas unas de otras (29,30).

Citología exfoliativa

Los métodos de preparación en el portaobjetos son:

a) Biopsia por aspiración con aguja fina.

Esta técnica se realiza para la punción y aspiración de masas sólidas, con una aguja y jeringa calibre 20 ó 22 de una pulgada de largo. Se realizan medidas asépticas de la zona. Después se sujeta la masa firmemente y se introduce la aguja en el centro de la misma, se aplica presión negativa (esto se logra jalando el embolo de la jeringa) que abarque $\frac{3}{4}$ de la capacidad de la jeringa, esta presión se mantiene durante todo el proceso, la aguja se debe redirigir a varias zonas de la lesión procurando que la aguja no salga en ningún momento de la masa de tejido, esto con la finalidad de obtener una población celular representativa de toda la zona, cuando se considera que la muestra es suficiente se libera totalmente la presión negativa y se retrae la aguja de tejido. El material aspirado se expulsa sobre un portaobjetos, colocándose un segundo portaobjetos sobre este, una vez hecho esto, por simple adhesión se expande el material sobre el portaobjetos, y en caso de que esto no suceda se puede aplicar presión digital (suave) para que el material se expanda; el segundo portaobjetos es deslizado suave y rápidamente sobre el primero y es separado (técnica por aplastamiento, para la preparación del frotis) (20,31)

b) Impronta

Puede realizarse de lesiones ulceradas y de biopsias extirpadas durante la cirugía y a la necropsia. Se limpia suavemente (con material absorbente) la cara que se va a imprimir, debe estar lo más seca y libre de sangre que se pueda, pues el exceso de fluido disminuye la adhesividad de las células al portaobjetos dando como resultado una escasa celularidad. Se

procede a realizar las impresiones sobre el portaobjetos, éstas se deben realizar sin ejercer presión al momento de contactar ambas superficies, procurando realizar varias impresiones en una sola laminilla (31).

c) Raspados de superficies epiteliales

Puede utilizarse una navaja de bisturí, en donde se coloca la hoja de bisturí perpendicular a la lesión y se "raspa" muy suave para obtener una pequeña cantidad de células, las cuales van a ser depositadas sobre un portaobjetos, para la preparación del frotis por la técnica de aplastamiento o como se realiza en las muestras sanguíneas (31).

Otra manera de realizar el raspado es mediante la utilización de hisopos (en superficies mucosas). El hisopo a utilizar debe ser previamente humedecido en SSF estéril, esto es importante ya que evita la deshidratación del material o que este sea absorbido por el hisopo durante el raspado. Para tomar la muestra, se frota suavemente el hisopo sobre el área de interés y posteriormente este se coloca sobre un portaobjetos deslizándolo con movimientos circulares, sobre toda la laminilla (31).

Nota: el tipo de fijación de las preparaciones antes mencionadas, va depender de la técnica de fijación a emplear.

En citología existen dos métodos de fijación:

- 1) Fijación en seco. Se fija la laminilla al aire lo mas rápido posible, cuando ya esta seco se procede a colocar gotas del fijador o a sumergir la laminilla de 3 a 5 minutos y finalmente se seca al aire. Este tipo de fijación se utiliza para las tinciones tipo Romanowsky (Wright, Giemsa)
- 2) Fijación en húmedo. Una vez realizado el frotis se debe sumergir inmediatamente en el fijador, sin permitir que la muestra se seque y permanecer en el por un periodo mínimo de 15 minutos; posteriormente se retira del fijador y se seca. Este tipo de fijación se utiliza para las tinciones como la de Papanicolaou, Hematoxilina - Eosina, Fontana Masson, Ziehl - Neelsen entre otras (31).

Muestras para examen histopatológico

Un pequeño fragmento de tejido llamado bloque se obtiene por biopsia, procedimiento que consiste en la extracción de un fragmento, con fines diagnósticos a la resección quirúrgica o postmortem. Si se obtiene la muestra de un cadáver, es esencial extraerla lo más pronto posible después de la muerte, para evitar la autólisis. Es necesario disecar el tejido con cuidado, por medio de instrumentos cortantes, para no deformar su imagen microscópica (11).

Las muestras de los diversos órganos deben cortarse con un espesor menor de 1 cm (preferiblemente 7 mm) y deben colocarse en un volumen por lo menos 10 veces mayor de solución de formol al 10 %. El que sean cortes delgados asegura que el fijador penetre de modo adecuado. Los tejidos deben permanecer en el fijador por lo menos 24 horas, o el tiempo indicado para cada mezcla fijadora (32).

Raspado cutáneo

Se utiliza una hoja de bisturí no muy filosa o un portaobjetos limpio. El raspado debe obtenerse de la periferia de una lesión activa, de diferentes sitios y debe abarcar zonas profundas de la dermis (en animales vivos hasta que empiecen a salir "puntos" de sangre). Para estudios microscópicos de hongos o ectoparásitos, los raspados se pasan a un recipiente limpio y seco sin necesidad de fijarlos o se pueden conservar en glicerina (3,30).

Obtención de orina

Esta se obtiene por cateterización de la vejiga, introduciendo una sonda por la uretra del animal lo más asépticamente posible, para evitar la introducción de bacterias. Otra forma de obtención es a la necropsia, puncionando la vejiga una vez expuesta en la cavidad pélvica, con una aguja gruesa aspirándola en una jeringa estéril. Se vacía en frascos estériles de vidrio o de plástico (3).

Es importante que cualquiera de las muestras antes mencionadas, sean acompañadas de una historia clínica detallada para ayudar al personal de laboratorio, a realizar un diagnóstico. Este informe debe identificar la especie, raza, morbilidad y mortalidad, sexo, edad y dueño; debe describir los signos clínicos, aspecto macroscópico, tamaño y localización de la lesión o lesiones; debe indicar si la afección había sido tratada previamente y si era así, que tipo de tratamiento fue administrado y el momento de la recurrencia, día y hora, muerte o sacrificio (32).

Selección del material de necropsia para estudio de laboratorio

La selección del material de necropsia para el estudio de laboratorio depende del tiempo transcurrido desde la muerte, de la preservación del cadáver, de las circunstancias en que ocurrió la muerte, de la posible causa de ésta (13).

La selección del material apropiado requiere necesariamente una historia clínica adecuada y el conocimiento de los lugares en donde se localizan las sustancias tóxicas, microorganismos. Los tejidos y otros especímenes recogidos se refrigeran y se remiten al laboratorio bien empacados tan pronto como sea posible (13).

c) Disección sistemática o necropsia

Es importante tener en cuenta que la necropsia no se lleva a cabo sólo para exponer lesiones, tomar muestras y colocarlas rápidamente en formalina o frascos estériles. En cada necropsia se deben establecer las relaciones estructurales y funcionales relevantes de los cambios encontrados. Las lesiones deben evaluarse junto con la historia clínica antes y durante el curso de la necropsia, para llevar a cabo una selección de muestras pertinentes que se enviarán para solicitar estudios de laboratorio (33).

La necropsia se dividirá en tres tiempos principales:

1. Inspección externa

Se realiza en el animal vivo, sacrificado o en el cadáver, poniendo especial atención en: la especie, raza, sexo, edad, señas particulares (color de la capa, manchas, marcas o tatuajes), el estado de las membranas mucosas de los orificios naturales, del integumento común y sus anexos (3)

Las muestras que se pueden recolectar en este momento son:

Líquido cefalorraquídeo, líquido sinovial, líquido de abscesos cutáneos, biopsia de piel, raspado cutáneo, exfoliación vaginal, punción para sangre, recolección de parásitos en piel y conducto auditivo externo (3).

2. Incisión primaria

Se realiza en posición decúbito dorsal. Se hace una incisión sobre la línea mediana sobre la piel, desde la sínfisis mandibular hasta el ano, teniendo cuidado de no cortar o lesionar los músculos abdominales, los órganos genitales y la glándula mamaria. La piel se separa con los músculos cutáneos, para dejar al descubierto la mayor parte de la tela subcutánea, músculo estriado esquelético, y nodos linfáticos. A la altura de los miembros torácicos se cortan los músculos pectorales, para que los miembros queden apoyados sobre la mesa. Para los miembros pelvianos se incidirán los músculos pélvicos que rodean a la articulación de la cadera para desarticularla y exponer las superficies articulares (33,34).

Se examinan las características de la tela subcutánea, los músculos estriados y de todos los nodos linfáticos subcutáneos. Se pueden tomar muestras de la tela subcutánea, músculo estriado esquelético, nodos linfáticos y líquido sinovial coxofemoral (34).

3. Incisión secundaria

Se inicia con la revisión de la cavidad oral, separando la musculatura del cuerpo de la mandíbula. Para retraer caudalmente la lengua, laringe, tráquea y esófago, es necesario desarticular del hueso hioides. En este momento se examina y se pueden obtener muestras de la mucosa oral, faríngea, nodos linfáticos y glándulas salivales. Se retrae la lengua caudalmente y se cortan a cada uno de sus lados los músculos del cuello, a lo largo del trayecto de la tráquea, se examinan y muestran la tiroides y paratiroides (3).

Cavidad abdominal

Para dejar al descubierto las vísceras abdominales y revisarlas en su lugar natural, se hace una incisión de la musculatura abdominal, desde el cartílago xifoides hasta la sínfisis púbica, el tejido colgante se logra separando los músculos del borde caudal de la última costilla y la musculatura del borde ventral del cuerpo del hueso ilíaco, hasta la espina y cresta del mismo hueso (34).

En este momento se revisa la posición de las vísceras, el líquido peritoneal y se toman las muestras bacteriológicas, con el fin de evitar la contaminación (3).

Cavidad torácica

Se deberá constatar el vacío que provocan los pulmones sanos dentro de la cavidad, escuchando la entrada de aire, a través de una pequeña incisión en el diafragma. En este momento se colapsan los pulmones sanos (34).

La apertura se realiza, cortando lateralmente las costillas y los músculos intercostales y el diafragma en su inserción en el arco costal, lo más cerca posible del techo de la cavidad (ventrocaudalmente). Ventralmente se cortará el ligamento trénico pericárdico y la pleura mediastínica (34).

De este modo es posible obtener *in situ* a las vísceras y anexos de la cavidad torácica. En este momento se puede revisar y recolectar por punción: el líquido pleural y pericárdico. Se pueden obtener muestras de quistes parasitarios, abscesos y formaciones neoplásicas. También se puede tomar muestra del parénquima pulmonar y corazón. (3).

Exploración de vísceras

Después de haber explorado las cavidades abdominal y torácica, con las vísceras en su sitio, se procede a vaciar las cavidades (3).

Cavidad torácica: se retraen tráquea y esófago caudalmente separando las uniones pleurales del mediastino y la línea diafragmática, para extraer así laringe, tráquea,

pulmones, nodos linfáticos mediastínicos, corazón, la mayor parte del arco aórtico y aorta descendente y pericardio íntegro (3).

Una vez hecho esto se liga el esófago y se separa de la tráquea para extraer el paquete visceral, se explora y se toman las muestras de tejido necesarias (3).

Cavidad abdominal: la porción torácica ligada del esófago, se jala hacia la cavidad abdominal, aprovechando esto para cortar los ligamentos de las vísceras abdominales y extraerlas junto con las glándulas accesorias; en el recto se realiza doble ligadura. Se corta y se extrae el paquete visceral, para separarlo, inspeccionarlo y tomar las muestras necesarias de tejido (3).

Cavidad pélvica: Una vez extraídas las vísceras torácicas y abdominales, se revisan los órganos genitales y urinarios, tanto del macho como de la hembra. Se tomará muestra de orina por medio de punción de la vejiga urinaria (3).

Los riñones, ureteres, vejiga, uretra así como los órganos masculino o femenino, se dejan en su lugar. Se examinarán estos órganos dentro y fuera de la cavidad abdominal, tomando las muestras necesarias de los mismos (3,33).

Antes de inspeccionar los riñones se localizan las glándulas adrenales, se examinan y, si es necesario se toma muestra, mediante un corte longitudinal. (33).

Cráneo y cavidades de la cabeza

Cuando se sospecha de alguna enfermedad que involucre al sistema nervioso central, es necesario examinar y tomar muestras del encéfalo y anexos (3).

Para abrir la cavidad craneal y extraer el encéfalo completo, se separa la cabeza del cuerpo, cortando la musculatura del cuello y los ligamentos de la articulación occipito atlantoidea, se retrae la piel y los músculos rostralmente para hacer en la cúpula del cráneo, tres cortes: los dos primeros en el foramen magno del hueso occipital, en dirección del proceso cigomático del hueso frontal (hasta la comisura externa del ojo), el tercero uniéndolo a los dos primeros, sobre el hueso frontal (3,34).

UNIDAD IV

A. REACTIVOS, PREPARACIÓN Y USOS.

a) Reactivos inofensivos

Usados para mantenimiento de la viabilidad de los tejidos y células, dispuestas para su posterior estudio.

Solución salina fisiológica (SSF) (12)

Cloruro de sodio	0.9	g
Agua destilada	100.0	ml

Solución salina de Hanks (12)

Cloruro de sodio	80.0	g
Cloruro de potasio	4.0	g
Cloruro de calcio	1.4	g
Agua destilada	1000.0	ml

Solución salina balanceada de Hanks (12)

Hanks concentrado 10 X (ver apéndice A)	10.0	ml
Carbonato de sodio al 7.5 %	7.0	ml
Rojo de fenol al 0.5 %	4.0	ml
Penicilina 200 000 UI/ml	1.0	ml
Estreptomicina 500 000 mcg/ml	0.4	ml
Agua desmineralizada	889.0	ml

Líquido de Ringer (28)

Cloruro de sodio	0.90	g
Cloruro de calcio	0.02	g
Cloruro de potasio	0.02	g
Bicarbonato de sodio	0.02	g
Agua destilada	100.00	ml

Líquido de Ringer para ave (28)

Cloruro de sodio	7.0	g
Cloruro de calcio	0.240	g
Cloruro de potasio	0.420	g
Agua destilada	1000.0	ml

Se usa durante el manejo de embriones de pollo

Restauración de propiedades basófilas (28)

Método I

Bicromato de sodio en solución acuosa al 5 % en agua destilada

Método II

Sulfato de amonio en solución acuosa al 5 % en agua destilada

Método III

Acido peryódico en solución acuosa al 5 % en agua destilada

Método IV

Carbonato de litio en solución acuosa al 1 % en agua destilada.

1. Procedimiento (Igual para los cuatro métodos):

- Se sumergirá la pieza después de ser descalcificada toda la noche.
- Para cortes después de ser desparafinados, se sumergirán durante 4 a 12 horas.
- Lavar con agua destilada.

2. Indicaciones

Se aplica principalmente a las secciones de tejido que han estado guardadas por mucho tiempo, así como, a las piezas que han sufrido procedimientos agresivos, como la descalcificación, lijación con metales pasados. El objetivo de este procedimiento es devolver la capacidad electromagnética de algunas regiones, en moléculas alineadas con los colorantes.

b) Reactivos aisladores**Acido nítrico (10)**

Acido nítrico en solución acuosa al 25 %, sumergir de 12 a 24 horas

Recomendado para músculo estriado y tejidos conectivos.

Acido pícrico (10)

Acido pícrico en solución acuosa saturada, sumergir durante 24 - 48 horas

Recomendado para fibras tendinosas, músculo liso y cardíaco.

Alcohol metílico (10)

Alcohol al 30 %, sumergir durante 12 - 36 horas

Recomendado para epitelios frescos, músculo liso.

Bicromato de potasio (10)

Bicromato de potasio en solución acuosa (1:300), sumergir de 2 - 5 días

Recomendado para Sistema Nervioso Periférico.

Tripsina al 0.2 % (12)

Tripsina (1:300) 2.0 g

Solución buffer salina fosfatada (PBS) 1000.0 ml

(ver apéndice A)

1. Procedimiento:

- Mezclar la tripsina y el PBS, agitando hasta disolver
- Almacenar a 4° C.

2. Indicaciones

Uso principalmente en la disgregación de monoestratos, también en la obtención de células provenientes de tejidos embrionarios.

c) Reactivos nutritivos

Usados en los procedimientos de cultivo celular, pero también en revisiones de células vivas durante un tiempo prolongado

Medio de mantenimiento mínimo de Earle (12) (concentrado 10x)

Solución A:

Cloruro de sodio	60.0	g
Cloruro de potasio	4.0	g
Sulfato de magnesio	2.0	g
Fosfato de amonio	1.25	g
Glucosa	10.0	g
Agua destilada cbp	800.0	ml

Solución B:

Cloruro de calcio	2.0	g
Agua destilada cbp	200.0	ml

1. Procedimiento:

- Disolver y esterilizar en autoclave por separado
- Enfriar a temperatura ambiente
- Mezclar las dos soluciones para completar así 1000 ml, pH final 7 - 7.2
- Almacenar a 4° C

Medio de mantenimiento de Earle (12)

Solución de trabajo

Earle concentrado 10 X	100.0	ml
Suero fetal bovino ultrafiltrado	20.0	ml
Carbonato de sodio al 7.5 %	9.0	ml
Rojo de fenol al 0.5 %	4.0	ml
Penicilina 200 000 UI/ml	1.0	ml
Estreptomicina 500 000 mcg/ml	0.4	ml
Agua destilada cbp	867.0	ml

1. Procedimiento:

- Mezclar en el orden antes mencionado, pH final 6.8 - 7
- Almacenar a 4° C

Suero (12)

1. Procedimiento:

- Colectar la sangre asépticamente para que posteriormente coagule a temperatura ambiente.
- Refrigerar a 4° C.
- Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 15 min a 4° C.
- Remover el sobrenadante del suero
- Esterilizar por filtración positiva
- Refrigerar a 6° C por 30 min para homogeneizar la temperatura antes de congelar.
- Almacenar en congelación a -20° C

d) Reactivos fijadores

A. Fijadores simples

Formol al 10 % (10)

El formol comercial o formalina, es una disolución del gas al 40 %, de la que parte para hacer las soluciones fijadoras, que varían las concentraciones de 10, 25 y 100.

Alcohol etílico y el alcohol metílico (31)

Estos fijadores son utilizados principalmente en citología exfoliativa.

Acetona (14)

Es buen fijador para el estudio de enzimas, pues las preserva muy bien, especialmente las fosfatasas y lipasas.

Tetróxido de osmio al 1 ó 2 % (14)

Es un fijador enérgico, aunque poco penetrante. Conserva bien las estructuras celulares y es muy usado en los estudios con microscopía electrónica.

Bicromato de potasio al 3 y 5 % (14)

Este fijador se emplea para obtener del tejido nervioso y la poscromización de los tejidos fijados con otros líquidos (estudio de las mitocondrias del condrioma).

Cloruro de mercurio (sol. saturada) (17)

Este fijador tiene gran velocidad de penetración, endurece mucho, excelente mordente para la posterior tinción del tejido y debe ser eliminado con un compuesto yodado.

B. Fijadores compuestos o mezclas fijadoras

Fijador de Aoyama (28)

1. Preparación inmediata antes del uso:

Cloruro de cadmio	1.0	g
Formol neutro al 10 %	100.0	ml

(cuidadosamente decantado el exceso de Carbonato de calcio).

2. Poder de penetración: 2 mm

3. Tiempo de fijación: 3 - 4 horas

4. Después de la fijación

Lavado en agua destilada de 3 a 4 horas

5. Indicaciones

Citología: aparato reticular interno de Golgi

Fijador de Bouin (28)

1. Preparación:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75.0	ml
Formol químicamente puro (Q.P.)	25.0	ml
Ácido acético	5.0	ml

2. Poder de penetración: 3 - 5 mm

3. Tiempo de fijación: 1 - 24 horas (72 horas óptimo)

4. Después de la fijación
Etanol al 70 % para conservación y eliminación del ac. pícrico
5. Indicaciones
Histología general (testículo), embriología y mitosis
No se usa en riñón

Fijador de Cajal (10)

1. Preparación (Inmediata antes del uso):

Nitrato de uranilo	1.0 - 2.0 g
Formol QP	5.0 ml
Agua destilada cbp	85.0 ml
2. Poder de penetración: 2 mm
3. Tiempo de fijación: 3 a 4 horas
4. Después de la fijación
Lavado en agua destilada
5. Indicaciones
Citología: aparato reticular interno de Golgi

Fijador de Carnoy (10,28)

1. Preparación (mezclar en el momento de uso):

Alcohol absoluto	60.0 ml
Cloroformo	30.0 ml
Acido acético glacial	10.0 ml
2. Poder de penetración: 5 mm
3. Tiempo de fijación: 2 a 6 horas ó 18 horas a 0° C
4. Después de la fijación
Pasará a alcohol absoluto 2 veces, xileno y parafina; 30, 30 y 60 minutos respectivamente.
5. Indicaciones
Citología: núcleos con alteración media del citoplasma
Histoquímica: glucógeno, DNA, RNA

Fijador de Baker o formol de calcio (10,28)

1. Preparación (se conserva varios meses)

Formol QP	10.0 ml
Cloruro de calcio	1.0 g
(o acetato de calcio)	2.0 g
Agua destilada cbp	90.0 ml
2. Poder de penetración: 1 cm, término medio
Conserva encéfalos completos para revisiones macroscópicas en anatomía
3. Tiempo de fijación:
Fragmentos: menores de 3 mm, de 2 a 3 horas a 55° C
 medianos de 5 - 7 mm, de 1 a 2 días
 mayores de 10 mm, duración indefinida (hasta su completa fijación)
4. Después de la fijación
Lavar abundantemente en agua, para la eliminación del pigmento formólico del corte
5. Indicaciones
Histología general, fijador de rutina para el Sistema Nervioso
Histoquímica de lípidos y fosfolípidos
6. Contraindicaciones
Detección de calcio

Fijador formol neutro al 10 % (10,28)

1. Preparación:

Formol QP	10.0	ml
Agua destilada	90.0	ml
Carbonato de calcio	1.0	g (a saturación)

Se conserva varios meses
2. Poder de penetración: 1 cm. en término medio, aunque
Conserva encéfalos completos para revisiones macroscópicas en anatomía
3. Tiempo de fijación
Fragmentos: menores de 3 mm, de 2 a 3 horas a 55° C
 medianos de 5 - 7 mm, de 1 a 2 días
 mayores de 10 mm, duración indefinida
4. Después de la fijación
Lavar abundantemente con agua, para la eliminación del pigmento formólico, del corte.
5. Indicaciones
Histología general: fijador de rutina para Sistema Nervioso.
Histoquímica: lípidos, proteínas, aminas biógenas (serotonina)

Fijador formol neutro amortiguado (10)

1. Preparación:

Formol QP	10.0	ml
Fosfato monosódico	0.4	g
Fosfato disódico anhidro	0.65	g

Agua destilada 90.0 ml

La mezcla conserva bien sus propiedades químicas
2. Poder de penetración: 1 cm término medio
3. Tiempo de fijación: como formol neutro al 10 %
4. Después de la fijación
Lavar abundantemente en agua, en relación con el tiempo de fijación y tamaño de la pieza
(el mismo tiempo de fijación, del formol neutro al 10 %)
Eliminación del pigmento formólico sobre el corte.
5. Indicaciones
Principalmente detecciones histoquímicas numerosas, sobre todo de lípidos y proteínas.

Fijador formol - sacarosa amortiguado (28)

1. Preparación:

Formol QP	10.0	ml
Sacarosa	7.5	g
Buffer fosfato pH 7.2	100.0	ml
2. Poder de penetración: 5 mm
3. Tiempo de fijación: de 1 a 2 dos días, a 4° C
4. Después de la fijación: como formol neutro al 10 %
5. Indicaciones
Citología: excelente conservador de estructuras finas
Histoquímica: fosfolípidos y ciertas enzimas.

Fijador de Zenker (10,28)

1. Preparación:

Solución madre

Cloruro de mercurio	5.0	g
Bicromato de potasio	2.5	g
Sulfato de sodio facultativo	1.0	g
Agua destilada cbp	100.0	ml

2. Poder de penetración: 3 mm

3. Tiempo de fijación

De 6 a 18 horas a temperatura ambiente, hasta 48 horas a 4° C, dependiendo del espesor de la pieza (como en el formol neutro al 10 %)

4. Después de la fijación

Si no se incluye inmediatamente, lavar en agua corriente durante un tiempo similar al de la fijación, posteriormente realizar dos cambios en etanol al 70 %, en los que se puede conservar indefinidamente. Si la pieza se incluye se eliminará el precipitado mercurial lavando en lugol, 30 a 60 minutos, después se quita el exceso de iodo en agua corriente, se remueve el iodo restante con tiosulfato de sodio (solución acuosa 2.5 %), se lava en agua destilada y se continua con la técnica elegida.

Si se quieren demostrar mitocondrias, inmediatamente después de la fijación (sin lavado), hacer postcromización, que consiste en prolongar el efecto mordente del bicromato de potasio.

5. Indicaciones

Histología fina: órganos hematopoyéticos

Citología: mitocondrias

Fijador de Zenker o fijador de Helly (10,28)

1. Preparación:

Solución madre de Zenker	100.0	ml
Formol QP	5.0 - 10.0	ml

2. Poder de penetración: 3 mm

3. Tiempo de fijación: como en el fijador de Zenker

4. Después de la fijación: como en el fijador de Zenker

5. Indicaciones

Histología fina: órganos hematopoyéticos

Citología: mitocondrias

Fijador de Marchi (28)

1. Preparación (Inmediata antes del uso):

Tetraóxido de osmio al 1 %	50.0	ml
Bicromato de potasio en solución acuosa al 2.5 %	100.0	ml
Sulfato de sodio	1.0	g

2. Poder de penetración: 2 mm

3. Tiempo de fijación: de 1 a 3 días

4. Después de la fijación: lavado en agua corriente, de 6 a 48 horas

5. Indicaciones

Citología: citoplasma

Núcleos: afinidad pobre hacia el colorante

Fijador metanol (10)

1. Preparación
Se utiliza metanol absoluto, para fragmentos de 3 - 5 mm y al 96 % para citología exfoliativa.
2. Poder de penetración: 3 mm
3. Tiempo de fijación:
De 3 a 4 hora, para fragmentos
De 15 a 30 minutos, para biopsias
De 5 a 10 minutos, para frotis
4. Después de la fijación
Para fragmentos y biopsias, aclarar e incluir
Para frotis secado al aire o platina térmica
5. Indicaciones:
Investigación de ARN sobre frotis
Fragmentos de tejido con poca consistencia

Fijador de Dafano (28)

1. Preparación (inmediata antes del uso):

Nitrito de cobalto	1.0 g	
Formol	6.0 ml	tejidos embrionarios
.....	15.0 ml	tejidos adultos
Agua destilada cbp	100.0 ml	
2. Poder de penetración: 2 mm
3. Tiempo de fijación: 3 - 4 horas
4. Después de la fijación: lavado en agua destilada
5. Indicaciones
Histología: Aparato reticular interno de Golgi

Fijador para médula ósea obtenida por punción (23)

1. Preparación

Formol QP	200.0 ml	
Acido acético glacial	165.0 ml	
Sulfato de sodio	60.0 g	
Agua destilada cbp	1000.0 ml	
2. Indicaciones
Cuando se prepararon frotis con el material recién obtenido, el resto de médula se debe poner en 50 a 100 ml de fijador.

e) Reactivos aclarantes (10,28)

Sustancia química	Ventajas	Desventajas	Consideraciones Prácticas
1.- Tolueno	Relativamente rápido Endurece poco los tejidos. Punto óptimo de clarificación fácil de apreciar.	Tóxico	Uso común
2.- Xileno	Rápido. Punto óptimo de Clarificación fácil de apreciar.	Endurece más que el tolueno Cancerígeno	Uso Común
3.- Benceno	Endurece un poco más los tejidos que el tolueno. Punto óptimo de clarificación fácil apreciar.	Es un poco más rápido	Reactivo de reemplazo
4.- Metilciclohexano	Relativamente rápido. Endurece poco. No tóxico. Punto óptimo de clarificación fácil de apreciar.	Más inflamable que los anteriores	Uso corriente con precaución
5.- Cloroformo	Endurece poco	Caro, olor desagradable Punto óptimo de clarificación imposible de apreciar	Producto de reemplazo
6.- Eter	Endurece poco buenos resultados	Peligroso, inflamable y explosivo	Producto de reemplazo
7.- Tetracloruro de carbono	No inflamable	Muy tóxico	Producto de reemplazo
8.- Esencia de Cedro	No endurece	Proceso largo Técnica delicada y cara	Para piezas duras y delicadas
9.- Acetato de amilo	No endurece mucho		Piezas duras
10.- Benzoato de metilo	No endurece		

f) Reactivos ablandadores

Acido nítrico (28)

Acido nítrico en solución acuosa al 5 %

1. Procedimiento de la descalcificación

- Fijación de las piezas en cualquier fijador a base de formol
- Lavar en agua destilada
- Sumergir en etanol al 80 %
- Sumergir en el descalcificante de 1 a 4 horas y renovar el líquido cada hora
- Para controlar la descalcificación lavar cada 24 horas
- Neutralizar con formol al 10 %, con exceso de carbonato de calcio o magnesio (verificar con tira reactiva)
- Deshidratar, aclarar e incluir

2. Indicaciones

Descalcificante de uso general

Para evitar artefactos del núcleo agregar 0.1 % de urea a la solución de ácido nítrico

Acido clorhídrico (28)

Acido clorhídrico concentrado	4.0 ml
Acido acético	3.0 ml
Cloroformo	10.0 ml
Etanol absoluto	3.0 ml
Agua destilada	10.0 ml

1. Procedimiento de la descalcificación

- Colocar piezas de 5 mm máximo, en el líquido por 48 horas (4 a 6 días para piezas más gruesas, ej. corte transversal de costilla).
- Hecha la descalcificación lavar el pigmento, en baños consecutivos de etanol al 95% (hasta que no quede pigmento)
- Continuar la deshidratación, clarificación e inclusión.

2. Indicaciones

Descalcificante de uso general

Acido tricloroacético de Bouin (28)

Etanol al 80 %	150.0 ml
Formol al 35 %	60.0 ml
Acido pícrico	1.0 g
Acido tricloroacético en solución acuosa al 2 %	15.0 ml

1. Procedimiento de la descalcificación

- Fijar hasta la descalcificación total
- Lavar con etanol al 95 %
- Deshidratar, aclarar e incluir

2. Indicaciones

Descalcificante para piezas delicadas o embriones

g) Reactivos colorantes

A. Colorantes simples

Azul de Alciano (28)

1. Preparación

Azul Alciano 0.1 a 1 %

Solución ácido acético 3 %

2. Indicaciones

Utilizado para la tinción de mucopolisacáridos

Azul de anilina (28)

1. Preparación

Azul de anilina 2.5 g

Acido acético 2.0 ml

Agua destilada cbp 100.0 ml

2. Indicaciones

Se utiliza para la Coloración tricrómica de Masson.

Azul de metileno (10)

1. Preparación

Azul de metileno 0.1 a 0.2 hasta 1.0 % en agua destilada

2. Indicaciones

Coloración vital y supravital por inyección.

Azul de metileno (28)

1. Preparación

Azul de metileno 0.5 g

Acido acético 0.5 ml

Agua destilada 100.0 ml

Utilizada en la técnica de File - Farraco

Azul de metileno de Loeffler (10)

1. Preparación

Azul de metileno a saturación en agua destilada 30.0 ml

Hidróxido de potasio en sol. acuosa (1:10000) 100.0 ml

2. Indicaciones

Utilizado en para tinción en citoplasma

Carbol fucsina (9,28)

o de Ziehl

Solución madre

1. Preparación

Fucsina básica 0.5 g

Etanol absoluto 5.0 ml

Cristales de fenol 2.5 g

(fundidos al calor en matraz)

Agua destilada cbp 50.0 ml

Solución de trabajo

Formol al 5 %	50.0 ml
Acido acético	20 gotas
Solución madre	25 gotas

2 Indicaciones

Colorante empleado en coloraciones nucleares y de organismos ácido resistentes.

Utilizado en la técnica de Fite - Farraco

Carmín al alumbre de Grenacher (10)**1. Preparación**

Carmín	1.0 g
Alumbre de potasio	4.0 g
Agua destilada cbp	100.0 ml

Hacer hervir a fuego lento de 15 a 20 minutos, enfriar, filtrar y agregar 1g de timol. Coloración en 30 min.

2. Indicaciones

Colorante nuclear

Carmín de Best (10)**1. Preparación****Solución madre**

Carmín	2.0 g
Carbonato de potasio	1.0 g
Cloruro de potasio	5.0 g
Agua destilada cbp	60.0 ml

a. Disolver en agua destilada

b. Hervir a fuego lento por 5 minutos, reposar y filtrar

c. Agregar al filtrado 20 ml de amoníaco.

Conservación 3 meses a 0 - 4° C

Solución de trabajo

Solución madre	15.0 ml
Amoníaco	12.5 ml
Alcohol metílico absoluto	12.5 ml

Solución utilizable de 2 a 3 semanas

2. Indicaciones

Colorante para glucógeno

Colorante de Shorr (30)**1. Preparación**

Alcohol etílico al 50 %	100.0 ml
Escarlata de Blebrich (soluble en agua)	0.5 g
Naranja G	0.25 g
Verde rápido FCF	0.075 g
Acido fosfotúngstico	0.5 g
Acido fosfomolibdico	0.5 g
Acido acético glacial	1.0 ml

2. Indicaciones

Utilizado en la tinción de Shorr, para citología exfoliativa

Colorante de Wright (30)

1. Preparación

Colorante de Wright	0.1	g
Alcohol metílico exento de acetona	20.0	ml

Disuélvase y déjese madurar toda la noche

2. Indicaciones

Utilizado en la coloración de Wright

Cristal violeta con oxalato de amonio (35)

1. Preparación

Solución A:

Cristal violeta	2.0	g
Alcohol etílico al 95 %	20.0	ml

Solución B:

Oxalato de amonio	6.8	g
Agua destilada cbp	80.0	ml

Mezclar solución A y B, almacenar durante 24 horas y filtrar a través de papel.

2. Indicaciones

Utilizada en la tinción de Gram

Cristal violeta con bicarbonato de sodio (35)

1. Preparación

Solución primaria:

Cristal violeta	2.5	g
Agua destilada cbp	1000.0	ml

Solución secundaria:

Bicarbonato de sodio	12.5	g
Agua destilada cbp	1000.0	ml

Mezclar la solución primaria con la secundaria.

Eosina alcohólica (37)

1. Preparación

Eosina Y soluble en agua	2.0	g
Etanol al 95 %	160.0	ml
Agua destilada cbp	640.0	ml

2. Indicaciones

Colorante nuclear

2. Indicaciones

Colorante nuclear

Eosina Y - B (28)

1. Preparación

Solución madre de eosina alcohólica

Eosina Y o amarilla	1.0	g
Eosina B o azulada	1.0	g
Etanol absoluto	100.0	ml

Solución de trabajo	
Eosina alcohólica	50.0 ml
Agua destilada cbp	300.0 ml
2. Indicaciones	
Colorante nuclear	

Eosina de Carnegle (37)

1. Preparación	
Eosina Y amarillenta	2.0 g
Etolal al 96 %	50.0 ml
Agua destilada cbp	150.0 ml
Solución de trabajo	
Sol. eosina stock al 1 %	1 parte
Etolal de 80 %	3 partes
2. Indicaciones	
Utilizado en la tinción hematoxilina eosina para tejidos embrionarios	

Eosina - Azufre 50 (EA 50) (30)

1. Se prepara una solución madre al 10 % de cada uno de los siguientes colorantes: verde claro S.F. amarillento; pardo Bismark; Eosina Y.

2. De cada una de las soluciones acuosas madres al 10 % se preparan tres soluciones madres con etanol como sigue:

A. Verde claro S.F. amarillento, solución al 0.05 % en etanol al 95 %.

B. Pardo Bismark, solución al 0.5 % en etanol al 95 %.

C. Eosina Y, solución al 0.5 % en etanol al 95 %.

3. Solución colorante EA 50:

Solución madre A	90.0 ml
Solución madre B	20.0 ml
Solución madre C	90.0 ml
Acido fosfotúngstico	1.2 g

Se filtra y se guarda en un frasco de color ámbar.

Se utiliza en la tinción de Papanicolaou

Fucsina básica (35)

1. Preparación	
Fucsina básica en solución saturada con etanol al 95 %	100.0 ml
Agua destilada cbp	900.0 ml
2. Indicaciones	
Colorante de contraste utilizado en la tinción de Gram (Modificación de Reed)	

Fucsina Fénicada (35)

1. Preparación	
Fucsina básica	3.0 g
Alcohol etílico al 95 %	100.0 ml
Fenol al 5 %	900.0 ml
2. Indicaciones	
Colorante utilizado en la tinción de Ziehl-Neelsen	

Hematoxilina de Erlich (9, 36)

1. Preparación

Hematoxilina	6.4	g
Alumbre de amonio o de potasio	40.0	g
Alcohol etílico	322.0	ml
Glicerina	322.0	ml
Acido acético glacial	32.0	ml

Madurar de 6 a 8 semanas a 25 %, se puede acelerar el proceso de maduración, agregando yodato de sodio (1.28 g).

2. Indicaciones

Laca de hematoxilina utilizada como colorante nuclear.

Hematoxilina de Groat (17)

1. Preparación

Solución 1:

Acido sulfúrico concentrado	0.8	ml
Alumbre férrico	1.0	g
Agua destilada cbp	50.0	ml

Solución 2:

Hematoxilina	0.5	g
Etol al 95 %	50.0	ml

Una vez disuelto, se mezclaran las dos soluciones, dejar reposar 1 hora y filtrar. Se conserva unos tres meses.

Se utiliza en la coloración tricrómica de Groat.

Hematoxilina de Harris (10,28)

1. Preparación

Cristales de hematoxilina	5.0	g
Alcohol absoluto etílico	50.0	ml
Alumbre de amonio o potasio	100.0	g
Oxido rojo de mercurio	2.5	g
Acido acético	2.0 - 4.0	ml
(por cada 100 ml del total de la sol. preparada)		
Agua destilada cbp	1000.0	ml

- Disolver la hematoxilina en alcohol
 - Disolver el alumbre en agua, y calentar ligeramente
 - Sacar del fuego y mezclar las soluciones
 - Llevar a ebullición tan rápido como sea posible (limitar el calentamiento a menos de un minuto, agitando frecuentemente).
 - Sacar del fuego inmediatamente, agregar muy lentamente oxido de mercurio
 - Calentar nuevamente a fuego lento hasta que forme color púrpura oscuro; sacar del fuego inmediatamente y sumergir el recipiente en una vasija con agua fría, hasta que se enfríe.
- Madurar 15 días.

2. Indicaciones

Utilizada en la técnica de Papanicolaou, tinción de Shorr y como colorante nuclear.

Hematoxilina tñlada de Welgert (36)

1. Preparación

Solución madre de hematoxilina

Solución de hematoxilina al 10 % en etanol absoluto	10.0	ml
Solución acuosa saturada de carbonato de litio	7.0	ml
Agua destilada cbp	80.0	ml

Está solución debe prepararse sólo inmediatamente antes de su uso.

Preferible emplearla una sola vez

La solución madre de hematoxilina en alcohol absoluto debe madurar como mínimo tres meses, si se ha madurado más tiempo se puede mezclar con otra solución de preparación más reciente.

2. Indicaciones

Se utiliza para la coloración de fibras melinizadas.

Hematoxilina de Thomas (28)

1. Preparación

Solución A:

Cristales de hematoxilina	2.5	g
Dioxane	49.0	ml
Peróxido de hidrogeno	1.0	ml

Solución B:

Acido fosfomolibdico	10.5	ml
Dietilen glicol	11.0	ml
Agua destilada cbp	44.0	ml

La solución B se filtra y 50 ml se le agregan a la solución A, se reposa 24 horas.

2. Indicaciones

Utilizada en la técnica de Thomas

Hematoxilina de Welgert (9)

1. Preparación

Solución A:

Solución de hematoxilina al 1 % en etanol al 96 %

(en 1 g de hematoxilina aforar con etanol hasta 100 ml)

Solución B:

Cloruro férrico	3.8	g
Acido clorhídrico en solución acuosa al 25 %	2.0	ml
Agua destilada cbp	196.0	ml

Preparar 10 minutos antes de utilizarse.

Agregar solución B a la solución A. Coloración 20 -30 minutos.

Laca de hematoxilina muy resistente al contacto posterior de algunas técnicas.

2. Indicaciones

Coloración que define medianamente las estriaciones del músculo esquelético, uniones celulares y melanina. Utilizada en la coloración tricrómica de Gomori y de Gallego

Solución de Hematoxilina

1. Preparación

Solución alcohólica de hematoxilina al 10 %	5.0	ml
(madurada al menos un mes)		
Glicerina	5.0	ml
Agua destilada	40.0	ml

2. Indicaciones

Utilizada en la hematoxilina férrica de Regaud

Orange G6 (OG 6) (30)

Se prepara una solución acuosa (madre) al 10 % de Naranja G

Solución madre al 10 % de Naranja G	25.0 ml
Alcohol etílico al 95 %	25.0 ml
Acido fosfotúngstico	0.075 g

Picrofucsina (38)

1. Preparación

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	100.0 ml
Fucsina ácida	0.1 g

También se puede preparar:

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	100.0 ml
Solución acuosa de fucsina ácida al 1 %	10.0 ml

2. Indicaciones

Colorante citoplasmático en la coloración tricrómica de Van Gieson

Picrocarmín de Indigo (PIC) (28)

1. Preparación

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	100.0 ml
Carmín de Indigo	0.25 g

Filtrar antes de usar

Cuando los cortes se fijaron con tetraóxido osmio o bicromato de potasio, la solución se prepara de la siguiente forma:

Solución acuosa de ácido pícrico	100.0 ml
Carmín de Indigo	0.40 ml

Colorear 30 segundos

2. Indicaciones

Colorante citoplasmático en la coloración tricrómica de Cajal, Gallego y Groat

Rojo sólido ó rojo nuclear o laca alumínica de Kernechtrot (10)

1. Preparación

Rojo nuclear sólido	0.1 g
Sulfato de aluminio y amonio	5.0 g
Agua destilada cbp	100.0 ml

Disolver en caliente y llevar a ebullición, enfriar y filtrar agregar un cristal de timol cloral; filtrar en el momento de uso, desechar si se deposita.

2. Indicaciones

Colorante nuclear combinado con picrocarmín de Indigo o con picronegro-Naftol.

Utilizado en la reacción de Pearls, reacción de azul alcian de Mowry y Von Kossa.

Safranina O (10)

1. Preparación

Solución safranina al 2.5 % en alcohol etílico al 95 %	10.0 ml
Agua destilada	100.0 ml

2. Indicaciones

Colorante utilizado en la tinción de Gram

Solución azul de anilina (28)

Azul de anilina	0.1 g
Acido oxálico	2.0 g
Acido fosfomolibdico	15.0 g
Agua destilada	300.0 ml

Utilizada en la coloración distintiva de fibras colágenas, reticulares y elásticas

Solución picro - eosina (37)

1. Preparación

Eosina Y soluble en agua	10.0 g
Dicromato de potasio	5.0 g
Solución saturada de ácido pícrico	100.0 ml
Etanol al 100 %	100.0 ml
Agua destilada cbp	800.0 ml

Solución Stock de eosina al 1 % (28)

1. Preparación

Eosina Y soluble en agua	10.0 g
Acido acético	2.0 ml
Agua destilada cbp	1000.0 ml

Solución rojo de aceite (28)

1. Preparación

Solución madre

Rojo de aceite	0.5 g
Alcohol isopropílico al 90 %	100.0 ml

Solución de trabajo

Sol. madre	6.0 ml
Agua destilada	4.0 ml

Solución de trabajo preparada por lo menos una hora antes de su uso, máximo 24 horas. Filtrar

2. Indicaciones

Se utiliza para colorear lípidos en fase líquida

Solución de Giemsa (stock) (28)

1. Preparación

Giemsa	1.0 g
Glicerina	66.0 ml
Alcohol metílico	66.0 ml

2. Indicaciones

Utilizada en la tinción de frotis sanguíneos y citología exfoliativa.

Solución escarlata de Blebrich (37)

1. Preparación

Solución escarlata de Blebrich al 1 %	90.0 ml
Solución fucsina ácida al 1 %	10.0 ml
Acido acético	1.0 ml

2. Indicaciones

Se utiliza para tricrómica de Masson

Solución de Ziehl - Nielsen (35)

1. Preparación

Carbol fucsina concentrada:

Solución A:

Fucsina básica	10.0	g
Alcohol etílico absoluto	100.0	ml

Guardar a 37° C, 12 horas

Solución B:

Fenol	5.0	g
Agua destilada cbp	10.0	ml

Solución de trabajo

Agregar 10 ml de solución A en 100 ml de solución B

2. Indicaciones

Utilizada en la tinción de bacterias ácido-alcohol resistentes

Sudán III o IV (10)

1. Preparación

Sudán III o IV	1.0	g
Etolal al 70 %	50.0	ml
Acetona	50.0	ml

Conservar bien tapado

Filtrar antes del uso

2. Indicaciones

Utilizada en la tinción de lípidos

Tioxihemateína férrica de Hansen (28)

1. Preparación

Solución A:

Alumbre de hierro	10.0	g
Sulfato de amonio	1.4	g
Agua destilada cbp	150.0	ml

Solución B:

Hematoxilina (cristales)	1.6	g
Agua destilada cbp	75.0	ml

Preparar en caliente

Cuando se enfrió la solución B, se agrega la solución A. Se lleva a ebullición, se enfría rápidamente, se filtra antes del uso. Se conserva más de un año bien tapada.

2. Indicaciones

Colorante nuclear utilizado en la reacción de azul de alcian de Mowry.

Tinción de Jiménez (28)

1. Preparación

Fucsina básica al 10 % en 95 % de etanol	100.0	ml
Fenol al 1 %	250.0	ml
Agua destilada cbp	650.0	ml

Solución buffer fosfato de sodio 0.1 N a pH 7.45

(mezclar 3.5 ml de NaH₂PO₄, 15 ml de 0.2 M Na₂HPO₄ y 19 ml de agua destilada).

Solución acuosa de oxalato verde de malaquita al 0.8 %

Para preparar la solución de trabajo de carbol fucsina, mezclar 4 ml. de solución 1 con 10 ml. de buffer (pH 7.45); filtrar inmediatamente antes de cada tinción. La solución de trabajo se mantiene satisfactoriamente cerca de 40 horas.

Una capa muy delgada secada al aire, (fijación por calor no es necesaria para fines citológicos pero se puede usar por seguridad); se cubre con carbol fucsina filtrado y se deja por 1 - 2 minutos, se lava con agua corriente, se cubre con la solución verde de malaquita por 6 - 9 segundos y se vuelve a lavar en agua corriente; finalmente se seca la laminilla con papel absorbente.

2. Indicaciones

Utilizado para tinción de clamidias

Tricrómica de Horen (45)

Cromótopo 2R.C.129;	0.6	g
Verde rápido F.C.F.	0.3	g
Acido fosfotúngstico	0.7	g
Acido acético glacial	1.0	ml
Agua destilada	100.0	ml

Violeta de cresilo (28)

1. Preparación

Violeta de cresilo	0.1	g
Agua acética al 2 %	100.0	ml

2. Indicaciones

Coloración nuclear, de 2 a 3 minutos

Violeta de cresilo (28)

Solución A:

Violeta de cresilo	2.0 g/100 ml de agua destilada
--------------------------	--------------------------------

Solución B:

Ácido acético	6.1 ml/994 ml de agua destilada
---------------------	---------------------------------

Solución C:

Acetato de sodio	3.61 ml/1000 ml de agua destilada
------------------------	-----------------------------------

1. Preparación:

Mezclar: Sol. A	5.0	ml
Sol. B	92.0	ml
Sol. C	8.0	ml

2. Indicaciones

Utilizada para la tinción de amiloide

Verde Luz (37)

1. Preparación

Verde luz	7.5	g
Acido acético	2.0	ml
Agua destilada caliente	200.0	ml
(hasta que se disuelva)		

2. Indicaciones

Se utiliza para coloración tricrómica de Masson

Verde luz (37)

1. Preparación

Verde luz	5.0	g
Acido acético	2.0	ml
Agua destilada cbp	100.0	ml

Se mezcla y se usa al 50 % en coloración en bloque

2. Indicaciones

Utilizada en la tinción en bloque para embriones

Verde malaquita (28)

1. Preparación

Verde malaquita	0.5	g
Agua destilada cbp	100.0	ml

Utilizado en la tinción de Schaeffer y Fulton

Verde de metilo - pironina (28)

1. Preparación

Solución acuosa de pironina Y o G	12.5	ml
Solución acuosa de verde de metilo	7.5	ml
Agua destilada cbp	80.0	ml

2. Indicaciones

Esta tinción permite poner de manifiesto simultáneamente y de manera diferencial, la cromatina y el nucléolo.

h) Reactivos opacantes (10)

- Aire
- Agua
- Alcohol
- Eter

**i) Reactivos conservadores
(medios de montaje)****A. Semipermanentes**

1. Agua: tiene un bajo índice de refracción; es bastante transparente, por lo que permite una buena visibilidad; pero es el menos permanente de todos, pues seca rápidamente (23).

2. Glicerina: tiene un elevado índice de refracción (1.46) y es muy conveniente como medio de montaje provisional, que puede durar meses si se maneja con cuidado y se sella; también se ejerce una acción protectora. Una ligera dilución con agua (1:1) (cortes húmedos) ayuda a la observación (23).

3. Aceite mineral (parafina líquida): es un medio de montaje provisional útil para frotis teñidos con tinciones tipo Romanowsky, los cuales se deben secar antes del montaje (23).

4. Solución de Apathy

Jarabe simple	50.0 ml
Goma arábica espesa	50.0 ml

Se añade al líquido un cristal de timol para su conservación. Es un medio de montaje excelente y muy usado para la conservación de las preparaciones que contienen grasa coloreada como el Sudán III o Sudán IV. La periferia de la preparación se endurece y el cubreobjetos queda fijo (10,23).

Gelatina cromada (10)**1. Preparación**

Gelatina en polvo	1.0 g
Alumbre de cromo y potasio	0.05 g
Agua destilada cbp	100.0 ml

- Los portaobjetos se sumergen en la solución, se escurren y se secan al aire
- Se coloca el corte sobre el portaobjetos, preparando horizontalmente
- Con papel filtro presionando ligeramente agregar unas gotas de formol al 10% sobre el papel en la zona del corte
- Presionar ligeramente otra vez con otro portaobjetos sobre el papel
- Quitar el segundo portaobjetos y aplicar algunas gotas de agua destilada sobre el papel, que se retirara cuidadosamente.

2. Indicaciones

Utilizada como medio de montaje para cortes hechos por congelación

Glicerogel (10)**1. Preparación**

Gelatina en polvo	15.0 g
Glicerina	100.0 ml
Agua destilada cbp	100.0 ml

- Preparar en frasco tapado, a 60° C, agitando de tiempo en tiempo hasta homogeneizar totalmente, y agregar un cristal de timol
- Medio de montaje hidrosoluble que se utiliza a 60 °C sobre el portaobjetos, al igual que el cubreobjetos.
- La preparación permanecerá horizontalmente, con un peso ligero sobre ella, a la temperatura del laboratorio

2. Indicaciones

Se utiliza para proteger las reacciones histoquímicas

Licor de Ferrart (28)

Goma arábica	100.0 g
Glicerina	2.0 ml
Timol	1 cristal
Agua cbp.....	100.0 ml

B. Permanentes

1. Bálsamo de Canadá. Es una oleoresina que se recoge de una vesícula de la corteza de una variedad de abeto, que se encuentre en Canadá. Es transparente, casi incoloro en capas delgadas, se adhiere firmemente al cristal y adquiere una consistencia muy dura sin granulación. El bálsamo de Canadá se oscurece ligeramente con el tiempo, y se vuelve lentamente ácido porque oxida el xileno en ácidos toluico y ftálico. Esta acidez borra gradualmente con el tiempo (23)

2. Resinas sintéticas. Son los medios de montaje más utilizados. Son solubles al xileno y el índice de refracción es similar al del cristal. Estas resinas se adquieren comercialmente y llevando el nombre del laboratorio como Merck o Sigma (3,23).

UNIDAD V

A. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

a) Preparación y procesamiento de la muestra

Se limita la preparación y procesamiento de una muestra, desde el momento posterior a su fijación, hasta que la pieza de tejido será incluida en parafina.

Después de la fijación se retiran las piezas del fijador y se procede al lavado para eliminar los restos del mismo, para evitar que se endurezcan demasiado los tejidos o tomen un pigmento extraño al de su naturaleza. Las piezas fijadas en líquidos a base de ácido ósmico y de bicromatos (Zenker, Holly) deberán ser lavados en agua corriente de 12 a 24 horas; en cambio las fijadas en mezclas a base de ácido pícrico (Bouin) no se lavarán (14).

Estas piezas se llevarán a etanol al 70 % para su conservación o para iniciar el proceso de deshidratación previo a la inclusión (14).

Existen varias técnicas para la deshidratación, aclaración e inclusión en parafina. Las más usuales son: la inclusión en parafina para histoquímica de rutina, hasta la inclusión rápida de Robinson y Fayon.

b) Inclusión en bloques de parafina

La inclusión es una operación cuyo objeto es conservar la pieza por estudiar, en el seno de una masa plástica que la penetra íntimamente hasta la profundidad de sus elementos estructurales más delicados. Se tienen así bloques fácilmente manejables, en cuyo interior las piezas por más pequeñas que sean, se pueden orientar perfectamente y cortar en un sentido determinado. Además los tejidos adquieren cierta consistencia que permite cortarlos, en cortes extremadamente delgados, sin modificar las relaciones y la forma de sus elementos (19).

La parafina, químicamente hablando, es una mezcla de hidrocarburos saturados y a veces de ceras; la composición de la mezcla puede ser muy variable, por lo que existen varias clases de parafinas. La propiedad más interesante es, sin duda el de ser químicamente neutras, solubles en numerosos disolventes y fáciles de cortar con la cuchilla. El único carácter físico que tiene que considerar el histólogo es su punto de fusión; en seguida indica la dureza de la mezcla; cuanto más elevado sea el punto de fusión de una parafina mayor es su dureza (17).

De manera general hay que tener en cuenta la dureza del objeto a incluir y del medio de inclusión. Cuanto más resistente sea un material, mayor será la dureza de la parafina a emplear. No es aconsejable la inclusión del material con parafina blanda antes de hacer la inclusión definitiva con una parafina más dura; efectivamente, la parafina blanda no puede eliminarse bien en el momento de la inclusión definitiva, provocando que el bloque quede heterogéneo en cuanto a su dureza, inconveniente muy lamentable en el momento de proceder a efectuar los cortes. Por consiguiente la inclusión y la confección del bloque se harán siempre con parafinas de calidad equivalente (17).

Tras pasar el líquido intermediario, se procede a una cuidadosa impregnación del material por la parafina líquida; esta impregnación se efectúa en caliente, en una estufa bacteriológica cuya temperatura esté regulada según el punto de fusión de la parafina escogida para hacer la inclusión, o a una temperatura ligeramente superior (1° ó 2° C). También en este caso es conveniente pasar por tres baños sucesivos de parafina para eliminar totalmente los vestigios del líquido intermediario. La duración óptima de los baños de parafina se elegirá empíricamente para cada clase de material; oscila desde algunas horas, en caso del páncreas

de vertebrado, a tres días, en caso de que se incluya la cabeza de un insecto grande. La duración de la inclusión en parafina depende también del líquido intermediario utilizado que se habrá de eliminar: cuanto más volátil sea, más corta será la inclusión y viceversa. En general, más conveniente alargar los baños que acortarlos, ya que es imposible obtener buenos cortes después de una inclusión defectuosa (17).

Proceso de inclusión

- Para este fin podemos usar rejillas múltiples de aluminio, moldes individuales de aluminio, plástico e incluso de papel y las escuadras de Leuckart (10,17).
- Cualquiera de los moldes elegidos estarán entre 5° y 10° C, por debajo de la temperatura ambiente, limpios y debidamente engrasados con vaselina o glicerina (28).
- La parafina para la inclusión deberá estar limpia, filtrada y a la temperatura de la última jarra de inclusión (28).
- Las identificaciones aplicadas a los bloques, se pegarán en una pared en el interior del molde, o en la base se utilizan bloques de madera como base para el cabezal de microtomo (10,28).
- Una vez hechos los bloques se deberán enfriar rápidamente, para obtener una fina cristalización de la parafina, de no ser así los cristales de parafina serán de gran tamaño y provocarán fracturas y los consiguientes artefactos en el tejido que contienen (28).

La deshidratación, el aclaramiento y la impregnación pueden hacerse manualmente pero también pueden ser realizados automáticamente por un aparato especial llamado **histoquinette** (39).

Inclusión de rutina o histoquinette (28)

1. Después de la fijación, proceder según las indicaciones del fijador utilizado
2. Deshidratación e inclusión
A temperatura ambiente sumergir consecutivamente
Etanol al 70 %, con 2 cambios de 1 hora cada uno
Etanol al 80 %, con un cambio de 1 hora
Etanol al 90 %, con dos cambios de 1 hora cada uno
Etanol al 96 %, con dos cambios de 1 hora cada uno
Etanol absoluto, con dos cambios de 1 hora cada uno
Etanol - xileno (50:50 %), con dos cambios de 1 hora cada uno
Xileno con dos cambios de 1 hora cada uno
Parafina con un cambio de 1 hora
Parafina con un cambio de 1 hora
3. Indicaciones
Para tejidos embrionarios, deshidratación desde alcohol de 70 %

Inclusión semirápida (28)

1. Después de la fijación, proceder según las indicaciones del fijador utilizado
2. Deshidratación e inclusión
Sumergir consecutivamente a una temperatura de 37° C
Etanol al 50 % media hora
Etanol al 60 % media hora

Etanol al 70 % media hora
 Etanol al 70 % media hora
 Etanol al 80 % media hora
 Etanol al 90 % media hora
 Etanol al 96 % media hora
 Etanol al 96 % media hora
 Etanol al absoluto I media hora
 Etanol absoluto II media hora
 Xileno I media hora
 Xileno II media hora
 Parafina I una hora
 Parafina II una hora

3. Indicaciones

Cada frasco que siga en el orden, debe estar dentro el tiempo que estuvo el anterior.
 Deshidratación para tejidos embrionarios desde, alcohol de 50 %
 Deshidratación para tejidos adultos , desde alcohol de 70 %.

Inclusión rápida de Robinson y Fayen (28)

1. Fijación con: formol al 10 % a 80° C
2. Deshidratación e Inclusión
 - Etanol al 96 %, 5 minutos
 - Etanol al 96 %, 5 minutos
 - Etanol al 100 %, 5 minutos
 - Etanol al 100 %, 5 minutos
 - Etanol al 100 % - acetona 1:1, 5 minutos
 - Acetona, 5 minutos
 - Acetona - xileno, 5 minutos
 - Xileno, 5 minutos
 - Parafina a 60° C (Hasta desaparecer burbujas), 5 minutos
 - Parafina a 50° C, 5 minutos
 - Incluir

Inclusión en parafina de tejidos embrionarios (28)

1. Fijación en Bouin 12 horas
 - Lavar en etanol de 70 %, hasta quedar blanco el tejido
2. Deshidratación e Inclusión
 - Etanol al 85 %, 5 minutos
 - Etanol al 85 %, 10 minutos
 - Etanol al 96 %, 5 minutos
 - Etanol al 96 %, 10 minutos
 - Etanol al 100 %, 5 minutos
 - Etanol al 100 %, 10 minutos
 - Etanol al 100 % - aceite de cedro 1:1, 2 horas
 - Aceite de cedro, toda la noche
 - Aceite de cedro - cloroformo 1:1, 2 horas
 - Cloroformo puro, 2 horas
 - Cloroformo - parafina 1:1, 30 minutos
 - Parafina I, 30 minutos

Parafina II, 30 minutos
 Parafina Liberry, 30 minutos
 Incluir

c) Corte de las piezas incluidas en parafina

Su ejecución implica el uso de micrótomos especiales, diseñados al efecto. Los mejores son aquellos en los que la navaja queda fija y la pieza es móvil, correspondiendo a este tipo los micrótomos de sistema Minot (19).

El corte de las piezas se realiza de la siguiente manera:

- Una vez fríos y extraídos de los moldes, los bloques se conservarán en refrigeración hasta su corte
- Se cortarán los bloques dándoles forma de trapecio a 5 mm. alrededor de la pieza, para facilitar su manejo con las pinzas y la obtención de tiras o series.
- Se expondrá totalmente la superficie de la pieza, con una cuchilla desechable o una cuchilla empleada para este efecto.
- El grosor del corte, dependerá de la técnica, de las características del tejido y del diagnóstico que se quiera realizar
- Para obtener cortes de buena calidad y de grosor adecuado, se tendrá especial cuidado en la calidad de las cuchillas, que deberán estar limpias, aceitadas y bien afiladas. Los extremos del filo, si son afilados se les protegerá con cinta adhesiva de color (28).

d) Montaje de los cortes

- El baño de flotación (baño circular con control termostático, de 15 a 30 cm de Ø y 7.5 a 10 cm de profundidad; la superficie interna debe ser negra, para ver mejor los cortes) contendrá agua limpia a una temperatura entre los 40° y 50° C, dependiendo de las cualidades de la piezas.
- Al baño de flotación le podemos agregar :
 - 1) gelatina 1g/litro, para mejorar la adhesión de los cortes al portaobjetos
 - 2) detergente aniónico, una pizca, para aumentar la tensión superficial en el agua
- Para mejorar la fijación de los cortes al portaobjetos, podemos aplicar (con el dedo envuelto en una gasa) a una de las caras de la laminilla albúmina de Mayer, y esperar que esta seque para recuperar el corte del baño de flotación
- Después de seccionar el bloque, la tira de parafina resultante la podremos guardar, sobre papel limpio en un lugar fresco y sin polvo o bien se montarán varios cortes en un portaobjetos o individualmente de la siguiente manera:
- Separando el corte de la cuchilla por medio de pinza o pincel, para depositarlo en un portaobjetos, agregaremos al corte unas gotas de etanol al 70 %, para que este se extienda y se deslice sobre la superficie del agua del baño de flotación

- Una vez que el corte se ha extendido y aparentemente no tiene pliegues o burbujas, se sacará con otro portaobjetos limpio que tenga algún adherente seco (albúmina Mayer).
- Hecho esto la laminilla se oscurece y se seca a la temperatura ambiente. Para marcarla, se utiliza tinta indeleble (para cristal). Después se dejará la laminilla, de 12 a 24 horas en la estufa bacteriológica (que mantenga la temperatura relativamente constante entre 55° y 60° C) o platina a 40° C para que se adhiera al corte mejor al cristal
- Habiendo cortado, montado y marcado los cortes, se procede a la aplicación de la técnica de coloración elegida o bien al almacenamiento de la misma (23,28).

UNIDAD VI

A. OBSERVACIÓN Y ARTEFACTOS

a) Observación

Recomendaciones para la observación

Para la revisión y la observación microscópica de las preparaciones, se deberá contar en la medida de lo posible, con un lugar destinado exclusivamente para este fin, ya que de este modo se facilita la clasificación, revisión y observación sin cometer errores en la colocación y disposición de las preparaciones en las series o colecciones (6,10,28).

Se recomienda tener a la mano xileno - etanol 1:1, para limpiar las laminillas o etanol al 70 %; algodón y una franela limpia y absorbente para el cuidado del microscopio; cajas para acomodar y guardar las preparaciones y una franela para limpiar el área de trabajo antes y después de cada sesión de observación (6,10,28).

Al iniciar la observación, nuestra posición será cómoda, esto es, en la que tengamos libertad de movimiento en las dos manos, en la que nuestra espalda no sufra de extensiones o flexiones innecesarias para tener los lentes oculares a la altura de nuestros ojos (28).

Antes de encender el equipo de observación, se revisa y limpia el polvo y aceite que hubiesen quedado en los objetivos, platina, condensador y filtros. Se procederá a corregir en los oculares las dioptrías y la distancia interpupilar, la preparación (debidamente identificada) se coloca con el cubreobjetos limpio y hacia arriba. Para la identificación se considera, tanto por su estructura como por las anotaciones marginales (se usan etiquetas autoadhesivas) (28).

Se procederá a la iluminación según Köhler, disminuyendo al mínimo la intensidad de la luz. Esto con el objeto de aprovechar al máximo la luz en el sistema óptico y no irritar con una luz muy brillante la retina (5).

Al iniciar la observación se utiliza el objetivo panorámico o una lupa, de 4X o 6X, esto es útil para reconocer el órgano, su orientación, la posición, el grado de lesión, los artefactos o seleccionar como material didáctico. Apreciaremos así con mayor claridad las características propias de la muestra, revisándola en toda su extensión. Posteriormente la observación se realiza con 10X, 40X ó 60X y finalmente con el objetivo de inmersión (10,28).

b) Artefactos

El artefacto es un cambio artificial en el corte preparado. En histología, es término comprende las características no deseadas de cortes. Son numerosos los artefactos o imperfecciones que dificultan la observación de los cortes, por una inadecuada selección, preparación, toma, manejo, fijación y procesamiento de las muestras. Se deberán tener en cuenta las distorsiones provocadas por algunos de estos motivos, al hacer la observación y el diagnóstico (11).

Entre los artefactos provocados por una inadecuada selección, se incluyen excoriaciones, necrosis avanzadas con pérdida de la morfología básica, maceración, inflamación y artefactos provocados durante la tinción por la presencia de medicamentos (40).

Los artefactos provocados por una inadecuada preparación de la zona muestreada, incluyen: pseudovesículas, pseudohendidura, fractura por deslizamiento, pseudopapilomas, pseudonódulos, pseudoosclerosis, pseudosenos, pseudoquistes, y formaciones globulares por alguna sustancia presente normalmente en el tejido, aplastamiento por el uso de pinzas o fórceps, deshidratación, elongación, edema intercelular, hendidura y vesículas por fricción (40).

A continuación se hará referencia a los errores y accidentes más comunes antes y durante la técnica histológica que provocan distintos artefactos y algunas soluciones para intentar en lo posible corregirlos.

Artefactos producidos durante la selección y toma de las muestras

Autólisis y putrefacción

La mayoría de los tejidos animales inician el proceso autolítico al disminuir la tensión de oxígeno; el pH cambia precipitando la salida y activación de diversas enzimas lisosómicas, las cuales actúan, distorsionando así la arquitectura del tejido, la célula y los organelos celulares (11,28).

Putrefacción. Después de la muerte ya no actúan las defensas corporales y las bacterias pueden multiplicarse indiscriminadamente. El cambio del pH en cadáver favorece el crecimiento de algunas bacterias. Las enzimas y toxinas bacterianas son las que desintegran el tejido (33)

Prevención

1. Tomar las muestras de animales sacrificados con este propósito, lo más rápidamente posible; si se requiere muestrear un cadáver se deberá eviscerar y refrigerar (o mantener lo más fresco posible) hasta su revisión y muestreo.
2. Se evitará en lo posible tomar muestras de animales que ya no presenten *rigor mortis* (20).

Artefactos provocados por una selección inadecuada

Se evitará la toma de muestras en zonas de necrosis avanzada, maceramiento, inflamación crónica, regiones en las que se haya aplicado un fármaco recientemente y tejidos preservados por congelamiento. Esto evitará pérdida de morfología, fracturas, fijación heterogénea y variaciones de las técnicas de coloración (6,28,40).

Artefactos provocados por una toma de muestras inadecuada

Las piezas seleccionadas para el proceso histológico deberán ser tomadas con instrumentos afilados y limpios, siempre que sea posible, de lo contrario se respetará un área de la pieza que no se haya pinzado, macerado o desgarrado para posteriormente seccionarlo adecuadamente. Para el diagnóstico histopatológico se tomarán muestras que presenten en apariencia macroscópica una parte del área de lesión y una parte del tejido aparentemente sano (3,28,40).

Cuando se requieren muestras para diagnóstico microbiológico, virológico, y/o micótico, se tomarán primero. Para diagnóstico parasitológico se tomarán las muestras al final de la necropsia (3).

Artefactos debidos a la fijación deficiente

Cada fijador tiene un tiempo óptimo de utilización. Si la fijación es demasiado corta, las afinidades tintóreas de los constituyentes celulares son débiles; por el contrario, una fijación excesivamente larga provocará demasiada afinidad para los colorantes, y algunas ocasiones, pérdida de constituyentes químicos (17).

Para histología normal se preferirá la toma de muestras después de una perfusión general o regional. Las piezas no serán mayores de 1 - 2 cm. de ancho por 3 - 4 cm. de largo (10).

La fijación de las piezas para diagnóstico histopatológico se realizará sumergiéndolas en el fijador inmediatamente después de ser separadas (20).

Para evitar la mayor parte de los artefactos debidos a una deficiente fijación, se procurará:

- Disponer de la cantidad adecuada de fijador para el volumen de las piezas
- Las piezas deberán estar separadas de las paredes del recipiente que las contenga
- El pH del fijador será el adecuado y sin precipitados.
- Usar en la medida de lo posible agua destilada para la preparación de las mezclas de fijadores o en su defecto agua limpia sin residuos y sin exceso de sales minerales (6,11,28,40).
- Los principales artefactos debidos a una mala fijación son:
- Aparición de autólisis en forma irregular
- Irregularidad en la deshidratación e infiltración, que a su vez provoca dificultad para cortar
- Después de la fijación se deberán retirar con lavado abundante, aquellos fijadores que así lo indiquen su uso, para evitar pigmentos y acumulaciones artificiales (6,11,28,40).

Artefactos producidos por una deshidratación y/o aclaramiento deficientes

Para prevenir una deshidratación deficiente se deberá comprobar regularmente el grado alcohólico de los distintos recipientes en los que se realiza la deshidratación. (28).

La deshidratación insuficiente se notará en la poca afinidad del tejido con el reactivo aclarante que se utilice, antes de la infiltración heterogénea, incluso notándose microscópicamente zonas blandas en las piezas y dificultad en el corte que se caracteriza por la fractura y "desmoronamiento" de la pieza al contacto con la cuchilla (11,28).

En relación al aclaramiento se deberá revisar el aclarante periódicamente, para que no tenga una concentración de alcohol o de agua muy elevada (Garrido comunicación personal).

Artefactos provocados por inclusión deficiente

Estos artefactos son provocados principalmente por una deshidratación y/o aclaramiento deficientes, impidiendo que el medio de inclusión penetre correctamente. Las burbujas se producen por la falta de tiempo en la parafina. Los errores cometidos en este paso se notará por una o varias zonas blandas dentro de la pieza, las cuales se perciben al tacto y al tratar de cortarlas se comparan con la elasticidad del hule (6,11,28,38).

Entre los errores más comunes de la inclusión se pueden mencionar:

- El manejo excesivo al orientar la pieza provocando distorsiones en la morfología

- Burbujas y fracturas en el bloque y en la pieza o separación de la pieza, y la parafina del bloque, provocados por una temperatura distinta entre la pieza y la parafina que se vierte en el molde (6,11,28,38).

Las fracturas de los bloques al desmontarlas se previenen poniendo a las paredes del molde glicorina o aceite mineral (28).

Artefactos provocados en el momento del corte

Los artefactos que resultan del contacto de la cuchilla con la superficie del bloque son: fracturas, enrollamiento, desmoronamiento, separación o curvatura de la tira de cortes.

Se pueden remediar en su mayoría corrigiendo lo siguiente:

1. El punto de fusión de la parafina con respecto a la temperatura ambiente, será: para una época fría, una parafina con bajo punto de fusión y para época cálida parafina con alto grado de fusión (en países con temperaturas extremas).
2. El ángulo de incidencia de la cuchilla sobre el bloque debe ser tal que el bisel de contacto tenga un ángulo entre 5° y 10°.
3. El sistema mecánico del micrótopo deberá estar engrasado, sin movimientos laterales y con el bloque fijo en posición correcta en el cabezal.
4. La superficie de corte deberá ser un trapecio con los lados horizontales paralelos.
5. Eventualmente se podrá "calentar" o "enfriar" el bloque con agua tibia o manteniéndolo en refrigeración respectivamente. Se vigilará que el grosor de los cortes sea uniforme dado a la contracción y expansión de la pieza provocadas por los cambios de temperatura.
6. La cuchilla debe estar perfectamente afilada y asentada comprobando esto con una lupa u objetivo panorámico. La superficie de contacto se debe limpiar de los fragmentos resultantes del corte. Con lo anterior se evitará en gran medida "rayas" o impresiones, pliegues o distintas profundidades en el corte (11, 28,38,40).

Artefactos en el momento de la flotación y montaje sobre portaobjetos

En este paso de la técnica histológica se deberá conservar una temperatura constante y adecuada en el baño de flotación, para evitar la falta de extensión y las arrugas a consecuencia de la temperatura baja o la extensión excesiva y burbujas provocadas por la temperatura alta (17,28).

Para el montaje sobre portaobjetos, las laminillas deberán estar limpias y con el pegamento que se escoja después de rescatar los cortes del baño; se escurrirá el agua que tenga en exceso o se secará con papel filtro. Posteriormente se calentará en horno o platina. Estos cuidados evitarán la formación de burbujas por el agua evaporada, el desplazamiento del corte sobre el portaobjetos y errores en la apreciación del lado en que se encuentra el corte sobre la laminilla (17,28).

El cambio diario del baño evitará la contaminación de los cortes con colonias bacterianas o de hongos (Garrido comunicación personal).

Artefactos de Coloración: defectos, precipitados y poca aptencia tintorial

La culminación en la realización de una laminilla es la obtención de coloración adecuada. Los principales artefactos debidos a este proceso son:

- Falta de filtrado antes de la coloración, caducidad del colorante, cambios de pH y contaminación de los colorantes.
- Poco volumen de colorante y homogeneidad de la mezcla.

- El fijador será el adecuado para conservar la aptencia tintorial, si esto no es posible se hará una postfijación.
- Para cortes montados o archivados sin coloración se les debe dar un tratamiento para recuperar sus propiedades basófilas (28).
- Falta de reacción del colorante con el metal de la canastilla, por lo que recomienda usar canastillas de cristal (Ocampo y Romero comunicación personal).

UNIDAD VII

A. TÉCNICAS GENERALES DE TINCIÓN E IMPREGNACIÓN, HISTOLÓGICAS E HISTOPATOLÓGICAS

TÉCNICA HEMATOXILINA EOSINA (28,40)

Principio

Coloración bicrómica que usa una hematoxilina como colorante básico, para las estructuras ácidas y una eosina como colorante ácido para las estructuras básicas.

Fijación

Cualquier fijador.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Teñir con hematoxilina de Harris 3 minutos
3. Lavar con agua corriente, 15 minutos
4. Diferenciar en alcohol ácido o/y carbonato de litio, 5 minutos
5. Lavar en agua corriente, hasta que vire a color azul
6. Enjuagar con agua destilada
7. Teñir con eosina, 1 minuto
8. Deshidratar en etanol al 96 %, en dos pasos
9. Deshidratar en etanol absoluto, en dos pasos, 5 minutos cada uno
10. Aclarar con xileno, en dos pasos, 5 minutos cada uno
11. Cubrir con medio de montaje.

Resultados

Núcleos: negro - azul

Citoplasma: rosa - naranja.

TÉCNICA DE GIEMSA PARA CORTES EN PARAFINA (28,40)

Principio

Tinción panóptica única por la mezcla neutra de Giemsa, para colorear por metacromasia las células de la sangre.

Fijación

Alcohol de 70% o formol bufferado.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Lavar en agua destilada
3. Sumergir en alcohol metílico, 2 minutos
4. Teñir con solución de Giemsa de trabajo
5. Lavar con agua neutra

6. Diferenciar con una solución, compuesta por: 1 parte acetona
1 parte alcohol metílico
1 parte alcohol etílico absoluto
7. Aclarar con xileno, dos pasos
8. Cubrir con medio de montaje.

Resultados

Eritrocitos: rojo pálido a rosa
 Núcleos: distintos tonos de azul
 Granulaciones neutrófilas: violeta
 Basófilas: azul a violeta
 Eosinófilas: naranja
 Citoplasma de neutrófilos y linfocitos: azul claro.

Observaciones

Para obtener mejores resultados se puede probar con soluciones a distintos pH's, variando de 3.5 a 9.5.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE CAJAL (10,28)

Principio

Coloración nuclear por fucsina básica (colorante básico), coloración de las demás estructuras por dos colorantes ácidos decrecientes: ácido pícrico y carmín de índigo.

Fijación

Fijador de Bouin o postfijación en Bouin sobre el corte.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Fucsina básica o fucsina de Ziehl, 10 a 15 minutos ó 1 minuto, respectivamente
3. Lavado abundante con agua corriente
4. Ácido acético al 1 %, en agua durante 1 minuto
5. Solución de Cajal, PIC, 10 minutos
6. Lavar en agua destilada y diferenciar
7. Diferenciar en ácido acético al 2 %, en agua durante 2 minutos
8. Detener la diferenciación en alcohol al 96 %, rápidamente
9. Diferenciar en alcohol absoluto, hasta que el azul del tejido conjuntivo sea nítido
10. Detener la diferenciación por inmersión rápida en xileno
11. Aclarar con xileno
12. Cubrir con medio de montaje.

Resultados

Núcleos: rojo
 Citoplasma: amarillo y rosa
 Colágena: azul.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE GROAT (28)

Principio

Coloración nuclear, por una laca férrica de hematoxilina y dos colorantes ácidos: ácido pícrico e índigo carmín.

Fijación

Cualquier buen fijador.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Teñir con hematoxilina de Groat, 2 a 5 segundos
3. Lavar con agua destilada, 5 a 10 segundos
4. Teñir con PIC, 5 segundos
5. Deshidratar
6. Aclarar
7. Cubrir con medio de montaje.

Resultados

Núcleo: negro

Citoplasma: amarillo

Conjuntivo: azul

Hemaltes: amarillos.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE VAN GIESON (38)

Principio

Coloración directa progresiva, por la hematoxilina de Weigert, coloración del citoplasma y colágena, por la mezcla de dos colorantes ácidos: ácido pícrico y fucsina ácida.

Fijación

Cualquiera, de preferencia Bouin.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Hematoxilina de Weigert, 5 minutos ó trioxihemateína, 4 minutos
3. Lavar, 5 minutos
4. Picrofucsina sobre la preparación, 5 a 10 segundos
5. Deshidratar en alcohol absoluto, directamente
6. Aclarar
7. Cubrir con medio de montaje.

Resultados

Núcleos: negros

Citoplasma: amarillo

Colágena: rojo o púrpura.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE GOMORI (28)

Principio

Coloración nuclear, por una taca de hematoxilina directa progresiva; coloración de estructuras acídófilas, con dos colorantes ácidos: cromotropo 2R y verde luz.

Fijación

Bouin si se fija con formol al 10 % neutralizado, prelavado con lijador de Bouin.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar, hasta agua destilada
2. Lavar hasta desaparecer el colorante amarillo de Bouin, si no es así, lavar en alcohol al 70 %, hasta desaparecer el mismo colorante
3. Teñir con hematoxilina, según Weigert, 10 a 15 minutos
4. Lavar en agua corriente, 10 minutos y después con agua destilada
5. Teñir con la solución de Gomori, de 5 a 10 minutos
6. Lavar en agua destilada o agua acética
7. Deshidratar con alcohol al 100 % o 96 %
8. Aclarar
9. Cubrir.

Resultados

Fibras musculares: rojo

Colágena: verde

Núcleos: azul a negro.

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE GALLEGO (10)

Principio

Coloración nuclear, por el colorante fucsina acética (fenicada de Ziehl) y coloración de las demás estructuras por el complejo PIC.

Fijación

Formol al 10 %, por 24 horas o más.

Procedimiento

1. Deshidratar hasta agua destilada y lavar con formol al 1 %
2. Sumergir en una solución de formol al 2 % con 30 gotas de ácido acético, durante 5 a 10 min.
3. Sumergir en una solución de agua destilada (30 ml), con 3 gotas de ácido acético y 10 gotas de fucsina fenicada de Ziehl, durante 2 a 4 minutos
4. Lavar rápidamente en una solución de formol al 2 %, con 3 gotas de ácido acético
5. Sumergir en una solución de formol al 1 %, durante una hora
6. Sumergir en PIC, durante 10 min.
7. Lavar en agua destilada rápidamente.

Resultados

Núcleo: rojo violáceo
 Colágena: azul
 Músculo: verde amarillento

COLORACIÓN TRICRÓMICA DE MASSON (9)**Principio**

La coloración nuclear por hematoxilina directa progresiva y las coloraciones de las estructuras, con coloración de acidofilia decreciente.

Fijación

Pueden emplearse todos los fijadores habituales, y evitando los que contengan tetraóxido de osmio.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Solución Bouin, 1 hora a 56° C, si se fijó en formol
3. Lavar con agua corriente, hasta quitar el colorante
4. Lavar en agua destilada
5. Teñir con hematoxilina de Weigert, 10 minutos
6. Lavar en agua destilada
7. Sumergir en sol. Escarlata de Bielrich, 5 min.
8. Lavar agua destilada
9. Sumergir en sol. ácido fosfotúngstico o fosfomolibdico, de 10 a 15 min.
10. Teñir con sol. azul de anilina al 1 %, de 10 a 15 min.
11. Teñir con verde luz al 1 %, 5 min.
12. Lavar en agua destilada
13. Sumergir en sol. de ácido acético al 1 %, de 3 a 5 min.
14. Deshidratar
15. Aclarar
16. Montar.

Resultados

Núcleos: negros
 Citoplasma, queratina, músculo y estrías : rojo
 Colágena y moco: azul a verde.

COLORACIÓN AL ROJO NUCLEAR (28)**Principio**

Coloración nuclear por una laca aluminica del ácido carmálico, el rojo nuclear sólido; coloración de las estructuras ácidas por el PIC.

Fijación

Bouin, Zenker, Helly.

Procedimiento

1. Desparafinar y rehidratar
2. Teñir con rojo sólido, 10 minutos o más
3. Lavar rápido en agua corriente
4. Teñir con PIC al 40 %, 15 segundos o más
5. Enjuagar agua acética al 0.5 %
6. Deshidratar con alcohol al 100 %
7. Aclarar
8. Cubrir.

Resultados

Núcleo: rojo
 Citoplasma: rosa pálido, gris o amarillo
 Fibras colágenas: azul.
 Hematíes: amarillos

TÉCNICA ARGÉNTICA SIMPLE AL CARBONATO DE PLATA (DE CAJAL) (46)**Principio**

Las micelas de nitrato de plata de la solución, se adhieren en el momento de la reducción, sobre las estructuras argirofilas.

Fijación

Formol neutro.

Procedimiento

1. Corte por congelación de 10 a 15 micrómetros
2. Lavar con agua destilada
3. Carbonato de plata al 2 % más 3 gotas de piridina, 20 minutos frío, agitando suavemente
4. Lavado rápido en agua destilada
5. Pasar a solución de formol al 1 % en agua destilada por 2 a 5 minutos
6. Lavar en agua destilada. (la mitad se queda en el agua y la otra mitad se pasa a cloruro de oro al (1:500) más 1 gota de ácido acético durante 5 minutos en frío y 5 a 10 minutos en caliente)
7. Hiposulfito de sodio en solución acuosa al 5 % , 3 minutos a todas
8. Lavado en agua destilada
9. Coloración contraste con picrocarmin de Indigo (de Cajal), durante 3 minutos
10. Lavar en agua destilada para después juntar todos los cortes
11. Alcohol de 96 % en tres pasos
12. Creosota
13. Cubrir con medio de montaje (ver nota).

Resultados

Núcleos: café tabaco o morado
 Citoplasma y sustancias intercelulares: amarillo.

Nota: Si se pone contraste de picrocarmin de Indigo, no se debe montar de ordinario porque al pasarlo a creosota pierde el color, se debe hacer un montaje especial con xileno.

UNIDAD VIII

A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA LAS CÉLULAS Y TEJIDOS

a) CITOLOGÍA EXFOLIATIVA

TÉCNICA DE GIEMSA PARA FROTIS (28)

Procedimiento

1. Frotis, previamente secado al aire o con calor
2. Fijar con alcohol metílico, 2 a 5 min
3. Secar al aire
4. Colorear con la solución de trabajo de Giemsa de 35 a 40 min (ver reactivos colorantes)
5. Lavar en agua destilada
6. Diferenciar con alcohol metílico, 5 min
7. Escurrir y secar
8. Cubrir con medio de montaje

Resultados

Eritrocitos: rojo pálido a rosa
 Núcleos: distintos tonos de azul
 Granulaciones neutrófilas: violeta
 Basófilas: azul a morado
 Eosinófilas: naranja
 Citoplasma de neutrófilos y linfocitos: azul claro

REACCIÓN NUCLEAR DE FEULGEN Y ROSSENBECK (28)

Principio

La hidrólisis ácida rompe selectivamente las uniones glucosídicas entre bases púricas y desoxirribosa, produciendo grupos pseudo-aldehídicos que reaccionan con el reactivo de Schiff dando un color característico de rojo púrpura.

Fijación

Fijadores nucleares, crómicos, ósmicos y alcohólicos.

Procedimiento

1. Desparafinar
2. Colodionar e hidratar (ver apéndice A)
3. Hidrolizar con ácido clorhídrico a temperatura de medio ambiente, 1 min
4. Teñir con reactivo de Schiff, 30 min (ver apéndice A)
5. Lavar en tres baños de agua corriente
6. Lavar en agua corriente, 30 min
7. Colorear el fondo con PIC
8. Deshidratar con etanol absoluto
9. Aclarar
10. Cubrir.

Resultados

ADN: rojo púrpura

COLORACIÓN DE WRIGHT (30,42)**Principio**

El colorante Wright, es una mezcla de colorantes ácidos y básicos que colorean de manera distinta, los citoplasmas de los elementos figurados sanguíneos, así como los núcleos.

Fijación

Etanol absoluto

Procedimiento

1. Cubrir el frotis completamente con la solución colorante de Wright, 2 min
2. Añadir una solución de lavado y amortiguador de fosfatos, dejar 6 min
3. Lavar con agua corriente
4. Secar al aire y observar en inmersión

Resultados

Eritrocitos: rojo amarillento

Neutrófilos:

Núcleo: rojo oscuro

Gránulos: lila

Citoplasma: rosa pálido

Eosinófilos:

Núcleo: rojo oscuro

Gránulos: rojo

Citoplasma: rosa pálido

TÉCNICA DE PAPANICOLAOU (30,42)**Principio**

Coloración múltiple de los citoplasmas para diferenciar las células patológicas de las normales.

Fijación

Etanol al 96 %

Procedimiento

1. Después de fijar
2. Enjuague con agua corriente 3 seg
3. Tefir con Hematoxilina de Harris, 1 min (ver reactivos colorantes)
4. Enjuagar gentilmente con agua corriente
5. Diferenciar en alcohol ácido al 1 %, pase rápido
6. Lavar en agua corriente, 5 min o hasta alcanzar un color azul nuclear
7. Enjuagar en agua destilada y pasar a etanol al 96 %, tres veces
8. Tefir en OG6 , 2 min (ver reactivos colorantes)

9. Lavar en dos cambios de etanol al 96 %
10. Teñir en EA 50, 3 min (ver reactivos colorantes)
11. Deshidratar en etanol al 96 %, tres cambios de pocos seg cada uno
12. Deshidratar en etanol absoluto, tres cambios
13. Aclarar en xileno, tres cambios
14. Cubrir.

Resultado

Núcleo: azul con buen detalle

Citoplasma: tonalidades de rosa, azul, amarillo, verde y gris.

TÉCNICA DE FONTANA - MASSON (9)

Principio

Demostración de las estructuras argentafines por medio de la unión con radicales libres en un coloides de nitrato de plata.

Fijación

Cualquier buen fijador, sin metales pesados

Procedimiento

1. Desparafinar
2. Enjuagar en etanol al 95 %
3. Lavar en agua destilada directamente
4. Sumergir en nitrato de plata, 1 hora a 56° C
5. Lavar en agua destilada, 3 baños
6. Sumergir en solución de cloruro de oro al 1 %, 10 min
7. Lavar en agua destilada
8. Sumergir en tiosulfato de sodio al 5 %, 5 min
9. Lavar en agua destilada
10. Contraste con eosina
11. Lavar con agua destilada
12. Aclarar
13. Cubrir.

Resultados

Granulaciones argentafines: negro

Núcleos: rojos

IDENTIFICACIÓN DEL APARATO RETICULAR INTERNO (DE GOLGI) (10)

Impregnación argéntica de Dafano

Principio

Después de la fijación con una sal de cobalto, se utiliza la capacidad argentafín del aparato reticular interno de Golgi.

Fijación

Fijador de Dafano

Procedimiento

1. Fijar de 2.5 a 48 horas
2. Lavar en agua destilada
3. Impregnación en nitrato de plata al 1.5 % de 24, 48 a 72 horas en la oscuridad
4. Lavar en agua destilada, varios cambios (3 o 4)
5. Reducir con la solución reductora de Cajal, por 24 horas (ver apéndice A)
6. Lavar en agua corriente
7. Deshidratar e incluir en parafina
8. Cortes 5 μm de espesor
9. Virar rápidamente en cloruro de oro al 0.2 %
10. Lavar en agua destilada
11. Fijar rápidamente por tiosulfato de sodio al 5 %
12. Lavar cuidadosamente
13. Colocar el fondo con azul de toluidina, 10 min
14. Deshidratar
15. Aclarar
16. Cubrir.

Resultados

Aparato reticular Interno de Golgi: negro

Observaciones

Coloración no específica

Se puede suprimir el paso del cloruro de oro y la contra coloración.

TINCIÓN DE SHORR (40,42)

Principio

Las células epiteliales cornificadas se tiñen de rojo anaranjado brillante, mientras que las no cornificadas aparecen verdes.

Fijación

El frotis sin que se seque, se fija sumergiéndolo en una solución 50:50 de alcohol etílico y eter dietílico durante 30 min o puede permanecer en el fijado hasta su tinción.

Procedimiento

1. Sumergir la laminilla 10 a 15 veces de etanol al 95 % y después en etanol al 70 %
2. Dejar la laminilla en hematoxilina de Harris 60 seg
3. Decolorarla sumergiéndola 5 veces en ácido clorhídrico al 0.1 %
4. Sumergirla en agua de la llave 15 veces
5. Dejar la laminilla en colorante de Shorr 60 seg
6. Sumergir 15 veces en etanol de 70 %, 95 % y etanol absoluto(en c/u)
7. Aclarar en xileno
8. Cubrir.

Resultados

Núcleos: azul marino
 Eritrocitos: naranja a rojo
 Queratina: naranja
 Músculo: rojo
 Fibras elásticas: rojo púrpura
 Tejido conectivo: verde brillante
 Cuerpos de Inclusión: rojo intenso
 Tejido nervioso: gris claro

b) EMBRIOLOGÍA**TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE EMBRIONES DE POLLO (37)****Materiales:**

Cristallizador
 Solución Ringer o Salina fisiológica
 Tijeras de Mayo para disección
 Pinzas mosquito de Halsted curvas
 Pinzas de Kelly rectas
 Cajas de Petri
 Papel filtro
 Gotero o pipetas
 Fijador de Bouin (recientemente preparado)

1. El huevo embrionado se fija a una base de cartón conveniente
2. Se rompe el cascarón en la circunferencia de la cámara de aire y se vacía en una caja de Petri
3. El embrión se extrae del saco amniótico
4. Con las pinzas rectas se sujeta al embrión por el cordón o anillo embrionario y se corta separándolo de los demás tejidos.
5. Se enjuaga con solución salina fisiológica
6. Retirar el exceso de la solución salina fisiológica con papel filtro
7. Sumergir en el fijador al menos 12 horas, a temperatura de medio ambiente

TINCIÓN EN BLOQUE**HEMATOXILINA DE EHRLICH (37)****Principio**

Técnica en la que se aprovecha el porcentaje de agua en los tejidos para tefir el cuerpo completo del embrión

Fijación

Fijador de Bouin. Después de la fijación, lavado abundante y conservación en etanol al 70 %

Rehidratación

1. Etanol al 70 %, 30 min
2. Etanol al 50 %, 30 min
3. Etanol al 35 %, 30 min
4. Agua destilada, 30 min.

Coloración

5. Hematoxilina de Ehrlich hasta color rojo - anaranjado (macroscópicamente)
6. Agua destilada hasta que no destiña
7. Alcohol ácido, hasta obtener un color rosa mexicano (macroscópicamente)
8. Agua de la llave, 20 min
9. Carbonato de litio, hasta obtener un color azul (macroscópicamente)
10. Agua de la llave, 20 min
11. Enjuagar en agua destilada.

Deshidratación

12. Etanol al 35 %, 30 min
13. Etanol al 50 %, 30 min
14. Etanol al 70 %, 30 min
15. Etanol al 85 %, 30 min
16. Etanol al 96 %, 30 min
17. Etanol al 100 %, dos cambios de 1 hora.

Aclaración

18. Salicilato de metilo + etanol absoluto 1:1, 30 min
19. Salicilato de metilo, 2 ó 3 días
20. Salicilato de metilo + xileno 1:1, 10 min
21. Xileno I, 15 min
22. Xileno II, 15 min

Montaje

23. Con resina sintética o bálsamo de Canadá

Resultados

Núcleos: negro - azul
Citoplasma: rosa - naranja

**TINCIÓN EN BLOQUE
VERDE LUZ (28)****Fijación**

Fijador de Bouln

Hidratar

1. Etanol al 70 %, 30 min
2. Etanol al 50 %, 30 min
3. Etanol al 35 %, 30 min
4. Agua destilada, 30 min

Coloración

5. Verde luz, 5 a 30 seg
6. Agua destilada, hasta que no destiña.

Deshidratación

7. Etanol al 35 %, 30 min
8. Etanol al 50 %, 30 min
9. Etanol al 85 %, 30 min
10. Etanol al 96 %, 30 min
11. Etanol al 100 %, 1 hora

Aclaración

12. Salicilato de metilo + etanol absoluto 1:1, 30 min
13. Salicilato de metilo, 3 -4 días
14. Salicilato de metilo + xileno 10 min
15. Xileno I, 15 min
16. Xileno II, 15 min
17. Montaje.

Resultados

Todas las estructuras se colorean con distintas tonalidades de verde

HEMATOXILINA EOSINA PARA TEJIDOS EMBRIONARIOS (37)**Fijación**

Fijador de Bouin. Después de la fijación, lavado abundante y conservación en etanol de 70%.

Procedimiento

1. Xileno I, 5 min
2. Xileno II, 5 min
3. Etanol absoluto, 2 min
4. Etanol al 100 %, eter, celoldina, 1 min
5. Etanol al 85 %, 2 min
6. Etanol al 70 %, 2 min
7. Etanol al 50 %, 2 min
8. Etanol al 35 %, 2 min
9. Agua destilada, 5 min
10. Hematoxilina de Harris, 75 seg
11. Agua destilada, 3 min
12. Viraje rápido con alcohol ácido
13. Virar con agua de la llave y amoníaco
14. Agua destilada 3 min
15. Eosina de Carnegie 3 min
16. Etanol al 96 % I, rápido
17. Etanol al 96 % II, rápido
18. Etanol al 100 %, rápido
19. Etanol al absoluto + éter 1:1, 5 min

20. Etanol absoluto + éter 1:1, 5 min
21. Xileno III, 5 min
22. Xileno IV, 5 min
23. Montar.

Resultados

Todas las estructuras se colorean con distintas tonalidades de rojo y rosa

TRANSPARENTADO DE EMBRIONES SEGÚN DAWSON (28)

Procedimiento

1. Etanol al 96 %, +/- 7 días
2. Acetona 1 semana o +/- 10 días
3. Etanol de 96 %, +/- 4 días
4. Hidróxido de potasio al 1 %, +/- 3 semanas, (hasta tener los huesos visibles)
5. Rojo de Alizarina 0.1 g en solución de Hidróxido de potasio al 1 %, +/- 30 min.

Coloreado en solución de:

6. Hidróxido de potasio 1 g., 20 ml de glicerina, en agua destilada 79 ml +/- 7 días
7. 2 ó 3 cambios para quitar el exceso de colorante
8. Solución KOH 8 ml al 1 % y glicerina 20 ml.
9.

Glicerina	KOH al 1 %	Tiempo
45 ml	60 ml	1 semana
60 ml	40 ml	
80 ml	20 ml	
100 ml	0	

Se sustituye el agua del tejido (embrionario) con glicerina y se le agrega un cristal de timol para su conservación.

c) TEJIDO EPITELIAL

Para la observación de este tejido se puede usar cualquier técnica que brinde un contraste alto entre el núcleo y el citoplasma de las células epiteliales y tejido conectivo. Coloración Tricrómica de Gallego, Coloración Tricrómica de Cajal, Coloración Tricrómica de Groat, Tricrómica de Van Gieson

d) TEJIDO CONECTIVO

COLORACIÓN DISTINTIVA DE FIBRAS COLAGENAS, RETICULARES Y ELÁSTICAS (28)

Principio

Aplicación sucesiva sobre el mismo corte de la impregnación para fibras reticulares y decoloración para fibras elásticas y colágenas.

Fijación

Boulin, de preferencia, aunque se puede hacer postfijación sobre los cortes.

Procedimiento

1. Cortes en parafina de 3 - 5 μ m
2. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
3. Sumergir en una solución acuosa de piridina al 15 %, 15 min
4. Sumergir en etanol de 95 %, 3 min
5. Lavar en agua corriente, 5 min
6. Sumergir en solución acuosa de ácido peryódico al 0.5 %, 15 min
7. Sumergir en agua corriente, 5 min
8. Lavar en agua destilada a 37° C, algunos seg, para que los cortes alcancen la temperatura del agua
9. Complejo amoniacal de plata a 37° C de 1 hora y media a 2 horas, hasta que tome un color tabaco muy claro
10. Lavado breve en agua amoniacal (una gota de amoniaco por 100 ml de agua destilada)
11. Lavar en agua destilada
12. Enjuagar en distintos baños de solución bufferada de formol al 10 %, durante 5 min, para obtener la precipitación adecuada de la plata sobre el corte.
13. Cuatro baños de agua destilada, de 30 seg cada uno hasta que no se formen nubes blancas en el baño.
14. Solución de viraje de 10 a 40 seg, hasta que el amarillo vire a púrpura gris
15. Lavar en agua destilada, 5 min
16. Sumergir en solución acuosa de hiposulfito de sodio al 5 %, de 1 a 3 min
17. Sumergir en agua corriente, 5 min
18. Eventual colodionaje (solución de colodión, ver en apéndice A) previo, a la deshidratación por etanol al 95 %
19. Enjuagar en etanol al 70 %
20. Sumergir en solución de orceina a 37° C, 15 min (ver apéndice A)
21. Enjuagar en etanol al 70 %
22. Lavar en agua destilada
23. Sumergir en solución acuosa de ácido fosfomolibdico al 5 %, 10 a 15 min
24. Lavado rápido en agua destilada
25. Teñir con solución de azul de anilina, 5 a 10 min
26. Lavado rápido en agua destilada
27. Teñir con solución acuosa de naranja G al 2 %, 1 a 2 min
28. Lavado muy rápido de agua destilada
29. Sumergir en solución de ácido acético al 1 %, 5 min o más
30. Deshidratar, comenzando por etanol de 95 %
31. Aclarar
32. Cubrir

Resultados

Fibra colágena: azul

Fibras reticulares: negras

Fibras elásticas: café rojizo

Núcleos: café oscuro
 Músculo estriado: gris azul
 Músculo liso: café claro
 Epitelios: de gris a café oscuro.

TÉCNICA DE REYES MOTA (41) PARA FIBRAS ELÁSTICAS

Principio

Coloración selectiva de las fibras elásticas por la fucsina.

Fijación

Preferentemente con Bouin.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Sumergir en agua destilada 2 min
3. Cloruro de oro 1:500, 1 - 12 horas a 50° C 15 -20 min
4. Hiposulfito de sodio al 5 %, 5 min
5. Lavar con agua destilada
6. Sumergir en formol al 10 %, 10 min
7. Sumergir en solución I, 10 min (ver apéndice A)
8. Lavar rápido en agua destilada
9. Sumergir en solución II, 3 min (ver apéndice A)
10. Lavado rápido en agua destilada
11. Teñir con PIC de 1 a 2 min
12. Lavar en agua destilada
13. Deshidratar
14. Aclarar
15. Cubrir.

Resultados

Fibras elásticas: púrpura

TÉCNICA DE THOMAS (28)

Principio

Tinción del tejido conectivo por la taca de hematoxilina, según la técnica de Thomas
 Solución B se filtra y 50 ml se agregan a la solución A, se reposa 24 horas.

Fijación

Cualquier buen fijador

Procedimiento

1. Desparafinar hasta agua destilada
2. Teñir con hematoxilina de Thomas, 2 min
3. Lavar en agua destilada

4. Diferenciar en solución de ácido pícrico al 0.5 %
5. Lavar en agua corriente
6. Deshidratar
7. Cubrir.

Resultados

Colágena y reticulina gruesa: violeta - negro
 Células argentafines: negro
 Núcleo: azul pálido
 Células Paneth: anaranjadas.

e) TEJIDO MUSCULAR

El tejido muscular puede ser observado con las técnicas de rutina generales, para su observación particular se pueden usar las hematoxilinas con alumbre, impregnaciones y hematoxilinas regresivas.

También se recomienda utilizar técnicas para diferenciar el músculo con el tejido conectivo que lo rodea, el cuál puede ser muy abundante y denso. Como ejemplo la técnica de Van Gieson, para diferenciar la colágena de músculo.

f) TEJIDO NERVIOSO

TÉCNICA DE KLUVER Y BARRERA (28,36,43)

Principio

Coloración mielínica por el azul luxol rápido; aprovechando la afinidad de los ácidos grasos por este colorante básico y contrastando con el violeta de cresilo, para algunas estructuras ácidas.

Fijación

Formol al 10% neutralizado.

Procedimiento

1. Cortes en parafina de +/- 10 μ m
2. Desparafinar y llevar al etanol al 95 %
3. Solución de luxol 30 min, 16 a 24 horas a 4° C (18 horas a 56° C)
4. Eliminación del exceso de colorante en etanol al 95 %, controlando microscópicamente, bajo el criterio del observador
5. Lavar en agua destilada para detener el lavado
6. Sumergir en solución acuosa de carbonato de litio al 0.05 %, algunos seg, controlando microscópicamente hasta el color verde - azul
7. Lavar en etanol al 70 %
8. Lavar en agua destilada
9. Diferenciar cuantas veces sea necesario, para obtener un contraste marcado entre la sustancia blanca teñida de azul a verde y la gris incolora
10. Colorear 6 minutos en la solución de violeta de cresilo
11. Deshidratar en etanol al 95 % con ácido acético, (5 gotas por cada 100 ml)

12. Deshidratar en etanol al 96 %
13. Deshidratar en etanol al 100 %
14. Aclarar
15. Cubrir.

Resultados

Cuerpos celulares: violeta
Mielina: verde azul

PROCEDIMIENTO DE BIELSCHOWSKY (23)

Este método presta excelentes servicios para la exhibición de las terminaciones gruesas nerviosas periféricas, motrices y sensitivas; es menos seguro para revelar las arborizaciones finas de las fibras autónomas y del sistema simpático, donde la reacción fracasa frecuentemente, y puede dar lugar a errores de interpretación, por impregnar a veces selectivamente fibras aisladas de procolágena o de reticulina. Es más segura la impregnación en bloque que en cortes.

VARIANTE DE BOEKE AL PROCEDIMIENTO DE BIELSCHOWSKY (23,36)

Fijación

Formol neutro (neutralizado con carbonato de magnesio), al 12 %, durante 15 o más días y menor de 1 a 2 meses.

Procedimiento

1. Lavado rápido en agua destilada e inmersión en piridina pura por 3 días
2. Lavado por 8 horas en agua destilada, renovar con frecuencia
3. Impregnación con nitrato argéntico al 3 %, durante 5 a 6 días, en estufa a 35° C
4. Tras un lavado rápido en agua destilada, inmersión en bloques, por 24 horas, en solución diluida de óxido argéntico amoniacal de Bielschowsky * en la estufa a 27° - 35° C
5. Lavado en agua destilada, renovándola varias veces en el transcurso de 2 ó 3 horas, en estufa de 27° a 35° C
6. Reducción en formol neutro al 20 % durante 1 día
7. Lavado, inclusión rápida en parafina pasando por el xileno, obtención de cortes, virado al oro de los mismos
8. Cubrir con bálsamo de Canadá.

* Este baño, base del proceder de Bielschowsky, se obtiene añadiendo a 5 ml de una solución de nitrato de plata al 10 %, 5 gotas de hidróxido de potasio al 40 %, con el que se origina un precipitado de color oscuro de óxido de plata. Se adiciona después amoniaco, y se agregan 25 ml de agua destilada.

Resultados

Este método suministra bellas impregnaciones de las terminaciones periféricas, motrices y sensitivas, y también de las terminaciones de las fibras simpáticas, aunque no con la constancia de aquellas.

TINCIÓN SUPRAVITAL CON AZUL DE METILENO (23) (para terminaciones nerviosas)

Solución colorante

Consiste en 0.3 g de azul de metileno y 8.5 g de cloruro de sodio, disueltos en 1000 ml de agua destilada

Método

Las estructuras delgadas como el mesenterio se pueden teñir por inmersión durante 1 ó 2 horas a 37° C, con observación microscópica ocasional para establecer el estado de tinción de los nervios. Otros tejidos se perfunden con el colorante a 37° C (perfusión segmentaria o del animal entero), manteniendo una oxigenación suficiente de los tejidos (so pena que el colorante se reduzca a leucobase) durante la maniobra y después. Unos 30 minutos después de terminada la perfusión, se sacan los tejidos y se fijan bajo forma de cortes delgados (1 mm) durante 1 a 12 horas en molibdeno de amonio al 8% en agua, recién preparado; se forma así un complejo con el azul metileno. Luego los fragmentos se lavan de 1 a 6 horas en agua corriente, y se pueden preparar cortes por congelación o en crióstato. Si se prefiere, se deshidrata en varios baños de alcohol butílico terciario, se aclara en xileno y se incluye en parafina; se preparan cortes de 10 a 40 μ m que se pasan a portaobjetos y se montan directamente después de xileno.

IMPREGNACIONES PARA CÉLULAS GLIALES, TUMOR DE CÉLULAS GLIALES Y GLIOSIS (23,36)

Fijación

Formol al 10%, por varios días.

Procedimiento

1. Desparafinar, colodionar (eventualmente)
2. Hidratar en etanol al 80%
3. Impregnar en solución con 8g de nitrato de plata disuelto en 10 ml de agua y diluido en 90 ml de etanol al 95% de 6 a 48 horas a 37° C
4. Lavar rápidamente en etanol al 95%
5. Reducir 1 min aprox. en una solución con 5 g. de ácido pirogálico, disuelto en 5 ml formaldehído y 95 ml de etanol)
6. Lavar
7. Fijar en tiosulfato de sodio, 1 minuto
8. Deshidratar,
9. Aclarar
10. Cubrir.

Resultados

Glia patológica: gris a negro

Axones: gris

Fondo: Gris violeta.

Observaciones

Añadir 0.25 - 0.5 ml de ácido nítrico en el baño argéntico, que puede requerirse para evitar la impregnación de las células de glía normales.

UNIDAD IX**A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA INCLUSIONES Y ACUMULACIONES EN LOS TEJIDOS****REACCIÓN DE PEARLS (CON AZUL DE PRUSIA) (28)****Principio**

Los iones férricos en presencia de ferrocianuro de potasio, dan origen al ferrocianuro férrico o azul de Prusia, el cuál se observa como un precipitado azul de características insolubles en el tejido.

Fijación

Preferible formol neutro, u otras que no contengan cromo.

Procedimiento: cortes en parafina

1. Desparafinar, (colodonar eventualmente, ver solución de colodón) y rehidratar
2. Tratar con el reactivo de Pearis, 30 min (ver apéndice A)
3. Lavar varias veces en agua destilada
4. Colorear el fondo con rojo sólido, o naranja G 20 seg
5. Deshidratar
6. Aclarar
7. Cubrir.

Resultados

Reacción específica de los compuestos férricos (hemosiderina, ferrina y otros con Fe férrico) coloreándose de azul verdoso.

REACCIÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE BILIRRUBINA (KUTUK) (28)**Principio**

Oxidación de la bilirrubina transformada en biliverdina, para poder observar el pigmento de color verde esmeralda.

Fijación

Formol o Bouin.

Procedimiento: cortes en parafina

1. Desparafinar y rehidratar
2. Solución acuosa de alumbre de fierro al 15 %, 15 min
3. Lavado rápido en agua destilada, para quitar el exceso de alumbre de fierro
4. Enjuagar en etanol al 95 %

5. Colorear el fondo rápidamente con una solución de amarillo de metanilo al 1 % en etanol al 95 %
6. Deshidratar en etanol al 95 %
7. Secar con papel filtro
8. Aclarar
9. Cubrir.

Resultados

Bilirrubina transformada en biliverdina: verde esmeralda.

REACCIÓN DE AZUL DE ALCIANO DE MOWRY (28)

Principio

El azul de alciano a pH ácido (2.6), se fija sobre grupos ácidos de mucopolisacáridos y glicomucoproteínas, probablemente por enlaces salinos (formados entre grupos de carga opuesta de las cadenas laterales de los aminoácidos).

Fijación

Carnoy, formol calcio o Bouin.

Procedimiento: cortes en parafina

1. Desparafinar y rehidratar
2. Baño en solución acuosa de ácido acético al 3 %, 2 min
3. Colorear de 5 a 30 min en una solución acuosa de azul de alciano al 1 % en ácido acético al 3 % (filtrar antes del uso)
4. Lavar en agua destilada
5. Colorear con iaca: rojo nuclear sólido o trioxihomatelna férrica de Hansen
6. Lavar en agua destilada
7. Deshidratar
8. Aclarar
9. Cubrir.

Resultados

Mucopolisacáridos y glicomucoproteínas ácidas con grupos carboxílicos; azul turquesa (ciertos mucopolisacáridos sulfatados también reaccionan).

REACCIÓN DEL ÁCIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (PAS) (17,40)

Principio

El ácido peryódico, rompe por oxidación las uniones entre dos carbonos, de los grupos químicos glicol 1-2, hidroxil-1, amonio-2, hidroxil, alquilamina-2 y ceto-2, haciendo aparecer grupos aldehídicos, que forman con el reactivo de Schiff un producto de condensación de color púrpura.

Fijación

Carnoy, Bouin

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar con agua destilada
2. Oxidar con la solución de ácido peryódico al 0.5 %, 5 min
3. Lavar en agua corriente, 5 min
4. Lavado breve en agua destilada
5. Tratar con el reactivo de Schiff de 15 a 30 min (ver apéndice A)
6. 3 baños de agua sulfurosa o agua destilada (ver apéndice A)
7. Lavar en agua corriente, 3 min
8. Teñir con la hematoxilina de Harris, 3 min
9. Lavar y colorear con PIC, 1 min
10. Deshidratar con alcohol absoluto
11. Aclarar
12. Cubrir.

Resultados

Glúcidos, ciertas proteínas, lipopigmentos y glucolípidos: rojo violáceo.

TÉCNICA DE CARMÍN DE BEST (5)**Principio**

Coloración empírica del glucógeno por el ácido carmínico.

Fijación

Fijador altamente alcohólico, específico para glucógeno (Carnoy)

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Coloración nuclear, cualquier taca de hematoxilina, según la técnica elegida
3. Solución carmín 15 a 30 min
4. Sumergir directamente en la solución diferenciadora, 10 a 15 seg (ver apéndice A)
5. Deshidratar con etanol absoluto
6. Aclarar
7. Cubrir.

Resultados

Glucógeno, galactógeno y algunos mucopolisacáridos: rojo (el primero más intensamente)

Núcleo: azul

Observaciones

Se deberán hacer digestiones enzimáticas como control de la reacción .

REACCIÓN DE BIURET

(para identificación de proteínas) (28)

Principio

Los enlaces peptídicos dan en presencia de hidróxido de sodio y de sulfato de cobre, una reacción coloreada. Reacción general de las proteínas, no específica.

Fijación

Cualquier fijador, evitar metales pesados

Procedimiento

1. Desparafinar y rehidratar
2. Reactivo de Sols puro o diluido al 50 %, 10 min (ver apéndice A)
3. Lavar en agua destilada
4. Deshidratar
5. Aclarar
6. Cubrir.

Resultados

Todas las proteínas en azul oscuro.

Observaciones

Reacción muy destructiva

MÉTODO DE AZUL DE ALCIANO PARA AMILOIDE (6)**Principio**

El azul de Alciano tiñe el amiloide y es precipitado por una postalcalinización con solución saturada de Bórax, en etanol al 80 %.

Fijación

No crítica

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
2. Lavar en alcohol ácido
3. Teñir con solución azul de Alciano, 2 horas (ver reactivos colorantes)
4. Lavar en alcohol ácido
5. Lavar en agua destilada
6. Sumergir en solución de etanol al 80 % saturada de Bórax, 30 min como mínimo
7. Lavar abundantemente
8. Contrastar con azul celeste hemalumbre y Van Gieson.

Resultados

Amiloide joven, mastocitos, moco cerolide: verde brillante

Amiloide viejo: verde pálido

Colágena: rojo

Músculo: amarillo.

MÉTODO DE VON KOSSA

(para demostrar la presencia de calcio) (6)

Principio

Demostración de aniones, de sales de calcio por medio de plata reducida

Fijación

Etanol absoluto, preferentemente o formol bufferado al 10 %, neutro.

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Sumergir en solución de nitrato de plata al 5 %, 30 min
3. Lavar en agua destilada
4. Sumergir en solución acuosa de tiosulfato de sodio al 5 %, 3 min
5. Lavar en agua destilada
6. Teñir con rojo nuclear sólido, 5 min
7. Lavar en agua destilada
8. Deshidratar
9. Montar.

Resultados:

Depósitos de calcio y sales: negro

Núcleo: rojo

Citoplasma: rosa.

Observaciones

Demostración para la presencia de calcio

No utilizar fijadores con calcio.

UNIDAD X

A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA MICROORGANISMOS

TINCIÓN DE GRAM (35)

Principio

El colorante básico entra al microorganismo (mo) donde forma una con el yodo una laca insoluble en agua. El alcohol o acetona deshidrata las paredes del mo Gram (+), tratados con un mordente y forman una barrera de laca que no pueden atravesar. Los mo Gram (-) los lípidos de la pared (más abundantes que en los mo Gram +) se disuelven por este tratamiento, lo que permite el escape del complejo cristal violeta con yodo (23).

Fijación

Física (calor)

Procedimiento

1. Teñir con cristal violeta y oxalato de amonio, durante 30 seg (ver reactivos colorantes)
2. Lavar perfectamente con agua de la llave
3. Aplicar solución de lugol durante 30 seg (ver apéndice A)
4. Escurrir la solución de lugol, pero no lavar
5. Decolorar con algunas gotas de acetona pura, menos de 2 seg
6. Lavar rápidamente con agua
7. Contrastar con safranina al 0.5 %, durante 30 seg (ver reactivos colorantes)
8. Lavar y dejar secar.

Resultados

Microorganismos Gram positivos: azul o púrpura

Microorganismos Gram negativos: rojo

TINCIÓN DE GRAM (MODIFICACIÓN DE REED) (35,44)

Principio

Obtener un colorante primario más estable que el original, ya que este se deteriora rápidamente y reducir el tiempo requerido para completar la técnica.

Fijación

Física (calor)

Procedimiento

1. Teñir con cristal violeta más bicarbonato de sodio (solución sensibilizante), 15 seg (ver reactivos colorantes)
2. Lavar con agua corriente
3. Iodo en Gram, 15 seg (ver apéndice A)
4. Lavar con agua corriente
5. Decolorar con alcohol - acetona, de 2 a 3 seg (ver apéndice A)

6. Lavar con agua corriente
7. Teñir con fucsina básica, 30 seg (ver reactivos colorantes)

Resultados

Microorganismos Gram positivos: azul
Microorganismos Gram negativos: rojo

TINCIÓN DE ZIEHL - NEELSEN
(para bacterias ácido - alcohol resistentes) (35)**Principio**

Aprovechar las características superficiales de la membrana (alto contenido en lípidos) y del interior de las bacterias ácido - alcohol resistentes), para hacer una fijación diferencial.

Fijación

Cualquier buen fijador.

Procedimiento

1. Cubrir la laminilla con solución fucsina fenicada, de 10 a 15 min
2. Lavar perfectamente la laminilla con agua corriente
3. Decolorar con alcohol ácido hasta que todas las trazas de color rojo desaparezcan del frotis.
4. Lavar perfectamente con agua de la llave cuando la decoloración se haya completado
5. Contrastar con azul de metileno o verde de malaquita al 0.5 % durante 1 min
6. Lavar y dejar escurrir sosteniendo por un extremo la laminilla
7. Deshidratar
8. Cubrir.

Resultados

Microorganismos ácido- alcohol resistentes: rojo
Otros microorganismos: azul o verde (según el colorante utilizado)

TÉCNICA DE FITE - FARACO (28)
(para bacterias ácido - alcohol resistentes)**Principio**

Aprovechar las características superficiales de la membrana (alto contenido en lípidos) y del interior de las bacterias ácido - alcohol resistentes), para hacer una fijación diferencial.

Fijación

Cualquier buen fijador.

Procedimiento

1. Desparafinar 2 pasos con xileno (2 partes de xileno con una parte de aceite de cacahuate, el aceite protege el corte) 12 min c/u.
2. Escurrir el exceso de aceite
3. Teñir con carbol fucsina de Ziehl de 20 a 30 min
4. Lavar con agua destilada
5. Diferenciar en alcohol ácido al 1 % una por una, hasta dar color rosado 1 min aprox.
6. Contraste ligero con sol. de azul de metileno
7. Lavar el exceso azul con agua corriente
8. Limpiar y dejar secar al aire unos minutos
9. Cubrir con resina.

Resultados

Bacilos: rojos

Fondo: rojo

TINCIÓN DE MANEVAL

(tinción para cápsula) (44)

Principio

Tinción negativa por la dificultad que existe en la cápsula, para retener el colorante y porque los procesos de fijación al calor y lavado las disuelven.

Fijación

Física (Calor)

Procedimiento

1. Maneval A: rojo congo. Mezclar cultivo sobre una gota de colorante, dejar que seque a medio ambiente (ver apéndice A)
2. Maneval B: fucsina ácida, 1 min (ver apéndice A)
3. Lavar con agua corriente, secar y observar.

Resultados

Cápsula: no se tiñe

Fondo: oscuro

Células: se tiñen de rojo.

TINCIÓN DE SCHAEFFER Y FULTON

(tinción para esporas) (35)

Principio

Es necesario aplicar calor para forzar la entrada del colorante primario (verde malaquita) y una vez este ha penetrado, al lavar la preparación y agregar un colorante de contraste (safranina), las células vegetativas se tiñen de rojo y la espora permanece teñida de verde.

Fijación

Física (calor)

Procedimiento

1. Cubrir la laminilla con verde de malaquita en solución acuosa al 5 % y calentar hasta la formación de vapores, durante 1 min
2. Lavar con agua corriente
3. Contrastar aplicando safranina en solución acuosa al 5 % durante 15 o 30 segundos
4. Lavar, escurrir y secar cerca del mechero.

Resultados

Esporas: color verde

Células vegetativas: color rojo

**TINCIÓN DE WARTIN - STARRY
(tinción para espiroquetas) (34)****Principio**

Impregnación del microorganismo aprovechando su argirofilia.

Fijación

Formol al 10 %, neutralizado

Procedimiento

1. Desparafinar e hidratar
2. Sumergir en solución de nitrato de plata al 1 %, a baño María durante 30 min a 43°C
3. Sumergir en solución de nitrato de plata al 2 % a 43° C (revelador)
4. Lavar en agua destilada a 43° C
5. Lavar en agua destilada
6. Deshidratar 2 cambios de etanol al 95 % y etanol absoluto
7. Aclarar
8. Cubrir.

Resultados

Espiroquetas: negro

Otros microorganismos: café claro.

MÉTODO DE LEVADITI, (1906) (38)**Principio**

Impregnación de las estructuras bacterianas aprovechando su argirofilia.

Fijación

Formol salino o neutralizado

Procedimiento

1. Desparafinar secciones de 3 a 4 μm
2. Hidratar, lavando en buffer
3. Impregnar con solución de nitrato de plata al 1.5 % 1 hora a 60° C
4. Revelar 3 min a 60° C (ver apéndice A)
5. Enjuagar con agua destilada a 60° C
6. Enjuagar en buffer (ver apéndice A)
7. Deshidratar
8. Aclarar
9. Cubrir.

Resultados

Espiroquetas: negro
Fondo: amarillo o café claro.

**MÉTODO DE LEVADITI (1905), EN BLOQUE
(para espiroquetas) (38,40)****Principio**

Impregnación de las estructuras bacterianas, aprovechando su argirofilia.

Fijación

Formol al 10 % neutro

Procedimiento

1. Piezas de 1 a 2 mm, de 24 a 48 horas de fijación
2. Lavar en agua destilada una hora
3. Sumergir en etanol al 96 %, 24 horas
4. Impregnar con solución de nitrato de plata al 1.5 %, a 37° C en la oscuridad por 3 a 5 días (ver apéndice A)
5. Lavar en agua destilada, 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad
6. Reducir dos días a 37° C (ver apéndice A)
7. Lavar con agua destilada,
8. Deshidratar en etanol al 80 %, 90 % hasta etanol absoluto
9. Incluir
10. Realizar cortes de 3 a 5 μm
11. Desparafinar
12. Aclarar
13. Cubrir.

Resultados

Espiroquetas: negro
Fondo: amarillo o café claro.

UNIDAD XI

A. TÉCNICAS ESPECÍFICAS PARA PARÁSITOS

a) Conservación de helmintos

Conservación de nemátodos

La cutícula de estos vermes es muy gruesa y, por ello, es preferible utilizar para la fijación líquidos calientes. El etanol al 70 % o la solución de formalina al 3-4 % deben calentarse a 71-82° C; tras lavar intensamente los vermes agitándolos en dos o tres cambios de suero fisiológico, deben introducirse en el fijador caliente. Una vez que el líquido se ha enfriado deben conservarse en fijador nuevo de la misma clase (45).

En la mayoría de los casos es adecuado un fijador compuesto de formaldehído al 4 % y ácido acético al 10 %. Se obtiene añadiendo 10 ml de formalina y 10 ml de ácido acético glacial a 80 ml de agua (F:A) (45).

Conservación de céstodos

Antes de proceder a su fijación debe intentarse lavarlos en solución al 1% de sal común, teniendo cuidado de no romperlos ni dejar que se anuden. Se fijarán después en formalina al 5-10%, ya entre dos trozos de vidrio o moviéndolos con una pinza mientras se introducen en el líquido fijador o bien sumergiéndolos repetidas veces en el líquido y dejando que cuelguen entre las inmersiones, suspendidos por la parte posterior de la pinza. Esta ligera tracción los mantiene en posición extendida correcta y facilita el examen posterior (45).

Se pueden relajar los vermes dejándolos en solución salina fisiológica con 1% de uretano durante un breve tiempo y llevándolos después al fijador de formaldehído-ácido acético descrito para los nemátodos (45).

Conservación de tremátodos

Pueden agitarse fuertemente en solución de sal común al 1 %, sustituyendo la solución salina por la de formalina y agitando continuamente. Esta operación, si se hace con fuerza, impide la concentración de los vermes (45).

Otro fijador útil se compone de 85 partes de alcohol etílico de 85 %, 10 partes de formalina al 40 % y 5 partes de ácido acético glacial (45).

b) Método de tinción general para céstodos, tremátodos y nemátodos (45)

Procedimiento

1. Fijación
2. Etanol al 70 %
3. Paracarmín, 24 horas
4. Lavar con etanol al 70 %
5. Diferenciar con alcohol ácido (vigilando en el microscopio)
6. Deshidratación: tres cambios de etanol al 70 %, con una duración de 15 min cada uno ; etanol al 95 % durante una hora y tres cambios de etanol absoluto, permaneciendo en cada uno 15 min

7. Aclarar
8. Cubrir

TÉCNICA DEL LACTOFENOL-AZUL DE ALGODÓN PARA EL MONTAJE DE NEMÁTODOS (45)

Procedimiento

1. Se calientan los vermes ligeramente en agua hasta que se relajan.
2. Se fijan seguidamente en F:A
3. Se pasan los vermes a una gota de lactofenol frío que contenga 0,01 % de azul de algodón, puesta sobre un portaobjetos y se calienta con suavidad hasta que emita vapores. También pueden ponerse los vermes durante 2-3 min en el lactofenol teñido, manteniendo a 60-70 °C.
4. Se montan los vermes en lactofenol que contenga 0,0025 % de azul de algodón, cerrándose el cubreobjetos con negro de asfalto bordeando el mismo.

TINCIÓN TRICRÓMICA DE HOREN (45)

Procedimiento

1. Tinción con Tricrómica de Horen de 2 a 20 minutos, dependiendo del espécimen (ver reactivos colorantes).
2. Diferenciar ácido acético al 45 % hasta 5 min
3. Deshidratación en ácido acético glacial.
4. Aclareamiento salicilato de metilo puro
5. Montaje en bálsamo o resina

TÉCNICAS PARA PROTOZOARIOS

Las fases de esquizogonia y gametogonia de diversos protozoarios pueden observarse examinando extensiones en fresco o teñidas por Giemsa de los tejidos infectados o bien, preparando cortes en parafina teñidos. Los tejidos pueden fijarse en formalina bufferada al 10 %, aunque puede obtenerse una tinción excelente tras la fijación en las soluciones de Zenker o de Bouin, especialmente con tejidos de aves. Las técnicas de tinción más útiles son las de hematoxilina y eosina de Ehrlich, hematoxilina férrica de Regaud (45).

HEMATOXILINA DE EHRLICH (45)

Solución madre	1 vol.
Ácido acético al 45 %	3 vol.
Más recomendable en tremátodos	

HEMATOXILINA Y EOSINA DE EHRlich (45)**Procedimiento**

1. Sumergir los cortes en agua. Es necesario el tratamiento por yoduro para los tejidos fijados de Zenker.
2. Teñir con hematoxilina de Ehrlich durante 30 min
3. Lavar en agua y diferenciar con alcohol ácido al 1 %, durante algunos seg
4. Lavar en agua corriente
5. Teñir con solución acuosa de eosina al 0,5 %, 10 min para los tejidos fijados en formalina y algunos segundos para los fijados por el Zenker
6. Diferenciar en agua corriente
7. Deshidratar
8. Aclarar
9. Cubrir.

HEMATOXILINA FÉRRICA DE REGAUD (45)**Procedimiento**

1. Sumergir los cortes en agua y pasarlos al mordente: solución fresca de alumbre de hierro al 5% durante 24 horas
2. Teñir durante 24 horas en solución de hematoxilina (ver reactivos colorantes)
3. Lavar en agua y diferenciar en ácido pícrico alcohólico (ver apéndice A)
4. lavar intensamente en agua
5. Deshidratar
6. Aclarar
7. Cubrir.

Observaciones

Este método favorece la diferenciación nuclear y es útil para la fotografía

TINCIÓN DE HISTOMONAS EN LOS CORTES (45)

Modificación de la técnica de tinción de Giemsa

Procedimiento

1. Fijar en Carnoy
2. Lavar en etanol 90 %, 2 cambios de una hora cada uno
3. Deshidratar e incluir en parafina
4. Hidratar los cortes mediante tratamiento con xileno y etanol. Lavar en agua
5. Teñir una hora o más en Giemsa (modificación para histomonas)
6. Lavar rápidamente en agua corriente y diferenciar en solución al 15 % de resina de colofonia en acetona
7. Lavar en acetona: xileno (70 : 30). Examinar a bajos aumentos
8. Aclarar en xileno, montar.

RECOMENDACIONES

El presente manual se elaboro a partir de la integración de conocimientos teóricos y técnicos de los profesionales que se dedican a la ejecución y uso de las técnicas histológicas e histopatológicas para la docencia, diagnóstico e investigación en la FES-C.

El diseño de este manual fue principalmente para facilitar al lector, la práctica en el laboratorio de histología e histopatología. Se describe en el mismo, desde la preparación de reactivos hasta el desarrollo de las técnicas, así como algunas observaciones sobre el procedimiento de las mismas.

Para el uso del manual se recomienda haber trabajado en un laboratorio a nivel técnico y tener el apoyo técnico de algún profesional responsable del área de diagnóstico

Se incluyen en este manual, algunas figuras representativas de las técnicas de tinción, como ejemplo de las diferentes apetencias tintoriales para poder distinguir los cuatro tejidos básicos (epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso)

Alcohol ácido protector (37)

Etanol al 100%	100.0 ml
Eter	100.0 ml
Celoidina	0.05 ml

Reactivo utilizado en embriología

Amortiguador de fosfatos (pH 6.4) (30)

Fosfato monopotásico	6.63 g
Fosfato disódico	2.56 g
Agua destilada cbp	1000.0 ml

Buffer para método de Levaditi (38)

Acetato de sodio	1.64 g
Acido acético	2.5 ml
Agua destilada cbp	200.0 ml

Carbonato de plata amoniacal (36)

Nitrato de plata al 10%	5.0 ml
Carbonato de sodio al 5%	15.0 ml

Ambas soluciones se mezclan y se disuelve el precipitado, que se forma añadiendo amoniaco gota a gota y agitando constantemente.

Agregar agua destilada hasta 75 ml preparar en el momento de usar

Reactivo utilizado en la técnica Argéntica Simple.

Complejo de plata amoniacal (28)

Nitrato de plata al 10%	15.0 ml
Carbonato de sodio al 5%	45.0 ml

A 15 ml de una solución acuosa de nitrato de plata al 10%, agregar 45 ml de carbonato de sodio al 5%.

Agregar 15 ml gota a gota de amoniaco concentrado, hasta casi la completa disolución del precipitado. Completar a 100 ml, con agua destilada. Eventualmente filtrar.

Utilizada en la coloración de fibras colágenas, reticulares y elásticas.

Diferenciador (45)

Alcohol absoluto	65 ml
Solución acuosa saturada de ácido picrico	35 ml

Utilizada en la técnica de hematoxilina férrica de Regaud

Iodo en Gram (35)

Yodo	20.0 g
Hidróxido de sodio	100.0 ml

Disolver el yodo en el hidróxido de sodio y agregar agua destilada

Utilizado en la tinción de Gram

Maneval A (44)

Rojo congo en solución acuosa al 1 %.

Maneval B (44)

Fenol en solución acuosa al 5 %	30.0 ml
Acido acético al 20 %	10.0 ml
Cloruro Férrico en sol. acuosa al 30 %	4.0 ml
Fucsina ácida en sol. acuosa al 1 %	2.0 ml

Mezcla crómica (28)

	Fuerte	Débil
Dicromato de potasio	0.0 g	25.0 g
Acido sulfúrico	450.0 ml	50.0 ml
Acido nítrico	450.0 ml	50.0 ml
Agua destilada cbp	550.0 ml	1000.0 ml

El ácido nítrico se utiliza para material delicado o nuevo que está manchado.

Mezcla oxidante de Gomori (28)

Solución acuosa de permanganato de potasio al 2.5%	1 parte
Solución acuosa de ácido sulfúrico al 5%	1 parte
Agua destilada	6 partes

Favorece la coloración en azocarmín oxidado y fucsina paraaldehído.

Se conserva poco tiempo.

Parafina Liberry (28)

Parafina pura	90.0 g
Parafina Liberry	5.0 g
Cera de abeja	5.0 g

Se puede poner cera en lugar de parafina Liberry, la misma cantidad.

PBS (concentrado 10 X) (28)

Cloruro de sodio	80.0 g
Cloruro de potasio	2.0 g
Fosfato ácido de sodio	14.4 g
Fosfato ácido de potasio	2.4 g
Agua destilada cbp	1000.0 ml

Esterilizar a 121 ° C 15 lb durante 15 minutos. Ajustar el pH con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Reacción de Brachart para ácidos nucleicos (28)

Solución de tionina 0.5%:

Tionina	0.5 g
Acido acético	2 gotas
Agua destilada cbp	100 ml

Para células nerviosas.

Reactivo de Pearle (28)

Solución acuosa de ácido clorhídrico	100.0 ml
Solución acuosa de ferrocianuro de potasio	25.0 ml

Mezclar las dos soluciones, en partes iguales en el momento.

Se utiliza en la reacción de azul de Prusia, para mostrar hierro ionico férrico.

Reactivo de Schiff (40)

Fucsina básica	1.0 g
Bisulfito de sodio anhidro ó	
Metabisulfito de sodio	1.0 g
Acido clorhídrico 1N	20.0 ml
Agua destilada cbp	200.0 ml

- Disolver la fucsina básica en agua muy caliente, sin que hierva
- Enfriar hasta 50° C, se filtra y se agrega el ácido clorhídrico
- Enfriar más y agregar bisulfito de sodio anhidro o metabisulfito de sodio
- Guardar en la obscuridad por 48 horas, cuidando que no se coloree; al cabo de ese tiempo, se le pone una pizca de carbón activado, se agita, se filtra y se refrigera. Se prueba poniendo en 10 ml de formaldehído de 30 - 40 %, unas gotas de reactivo, si la reacción es rápida a un azul púrpura obscuro no sirve, si es a púrpura rojizo, si sirve.
- No revolver o regresar al nuevo, el que se usó.

Reactivo de Sols (28)

Glicerina	1.0 ml
Solución acuosa de sulfato de cobre al 5%	40.0 ml
Hidróxido de sodio al 20%	200.0 ml
Agua destilada cbp	500.0 ml

Reactivo muy destructivo, utilizado para la identificación masiva de proteínas por la reacción de Biuret.

Reductor para bloque, para método de Levaditi (38)

Acido proglálico	4.0 g
Formol	5.0 ml
Agua destilada cbp	100.0 ml

Revelador para método de Levaditi (38)**Solución 1**

Hidroquinona	300.0 g
Solución buffer	10.0 ml

Disolver la hidroquinona en buffer y 1 ml se mezcla con 15 ml de goma inglesa al 5%.

Se guarda a 37° C.

Solución 2

Solución de nitrato de plata al 2% a 60° C

Revelador. solución 1 y solución 2, 1:1 mezclar antes de usar

Revelador Wartin - Starry (34)

Solución de nitrato de plata al 1%	7.5 ml
Solución acuosa de gelatina al 5%	10.75 ml
Solución acuosa de hidroquinona al 0.25%	10.0 ml

Solución de colodión (28)

Algodón pólvora	5 partes
Eter sulfurico	15 partes
Etanol	20 partes

Método protector base de líquido siruposo (jarabe), que extendido en la superficie de un recipiente con agua, la laminilla se cubre con él. Posteriormente el éter y alcohol se evaporan formando una película elástica (28)

Para cuando existe la posibilidad de que los cortes se despeguen, debido a tinciones largas, baños a temperaturas elevadas, tratamiento a pH alcalino, durante el desparafinado, se recubren los cortes con un capa de colodión, que los protegerá durante las manipulaciones siguientes (17)

Solución diferenciadora de Best (5)

Etanol absoluto	20.0	ml
Alcohol metílico	10.0	ml
Agua destilada	25.0	ml

Utilizada en la Técnica de Carmin de Best

Solución de Hanks (28)

(concentrado 10 X)

Solución A:

Cloruro de sodio	80.0	g
Cloruro de potasio	4.0	g
Cloruro de calcio	1.4	g

Solución B:

Fosfato de sodio	1.15	g
Fosfato de potasio	0.2	g
Agua destilada	200.0	ml

- Disolver las sales por separado y en orden, en agua desmineralizada
- Esterilizar las soluciones por separado y enfriar las mismas
- Mezclar la solución A con la solución B, agitar y llevar a pH final de 7
- Almacenar a 4° C.

Solución reductora de Cajal (10)

Hidroquinona	2.0	g
Formalina	10.0	ml
Agua destilada cbp	100.0	ml

Agregar 0.5 g de sulfato de sodio anhidro, la cantidad suficiente para dar un tinte amarillo paja, al líquido.

Líquido reductor, que se prepara en el momento del uso.

Utilizado para reducir las sales de plata en impregnaciones argénticas.

Solución I, para la técnica de Reyes Mota (41)

Formol al 1%	50.0	ml
Acido acético	2	gotas
Carbol fucsina	25	gotas

Solución II, para la técnica de Reyes Mota (41)

Formol al 1%	50.0	ml
Acido acético	20 - 30	gotas

Solución de ferrocianuro (28)

Solución acuosa fresca de ferrocianuro

Ferrocianuro de potasio al 0.1%	50.0	ml
Solución acuosa de sulfato férrico al 1%	100.0	ml

Solución de ac. fosfotungstico y ac. fosfomolibdico (9)

Acido fosfotungstico	5.0	g
Acido fosfomolibdico	5.0	g
Agua destilada cbp	200.0	ml

Para tricrómica de Masson

Solución de Gomori (28)

Cromótopo 2R	0.6	g
Verde luz SF	0.3	g
Acido acético	1.0	ml
Acido fosfotungstico	0.8	g

Utilizar azul de anilina, para colorear colágena en azul.

Solución de lugol (35)

Yodo	1.0	g
Yoduro potásico	2.0	g
Agua destilada cbp	300.0	ml

Triturara en un mortero el yodo y el yoduro potásico y añadir algunos mililitros de agua poco a poco hasta conseguir su disolución. Almacenar en un recipiente opaco

Solución orceína (28)

Orceína sintética	0.1	g
Etanol al 70%	100.0	ml
Acido clorhídrico	0.6	ml

Se utiliza en la Coloración distintiva de fibras colagenas, reticulares y elásticas

Solución de plata para el método de Levaditi (38)

Nitrato de plata	0.5	g
Solución buffer:	50.0	ml
Acetato de sodio	1.64	g
Acido acético	2.5	ml
Agua destilada cbp	200.0	ml

Solución tiosulfato de sodio al 5% (6)

Tiosulfato de sodio	5.0	g
Agua destilada	100.0	ml

Se utiliza en la Técnica de Von Kossa

APÉNDICE B

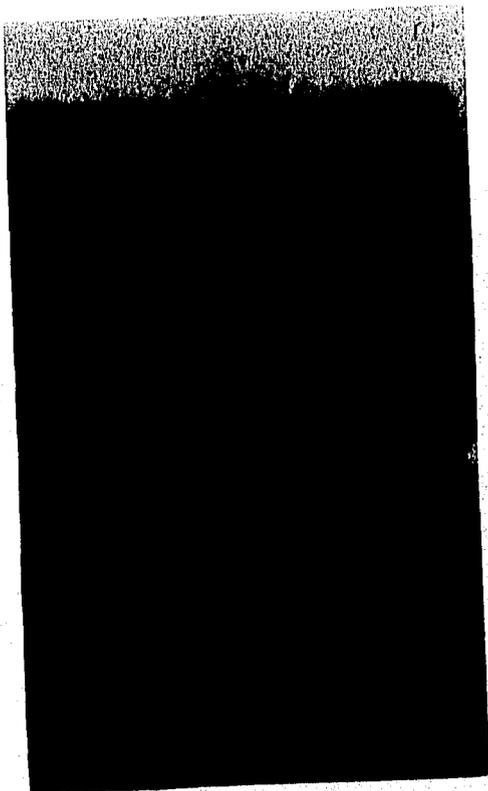


Fig. 1. Tráquea de gallina. *Coloración tricrómica de Cajal.* Fijación: Formol neutro amortiguado. Objetivo 40 X



Fig. 2. Glándula salival de rata. *Coloración tricrómica de Van Gieson (variante con PIC)*. Fijación: Bouin. Objetivo 100 X.

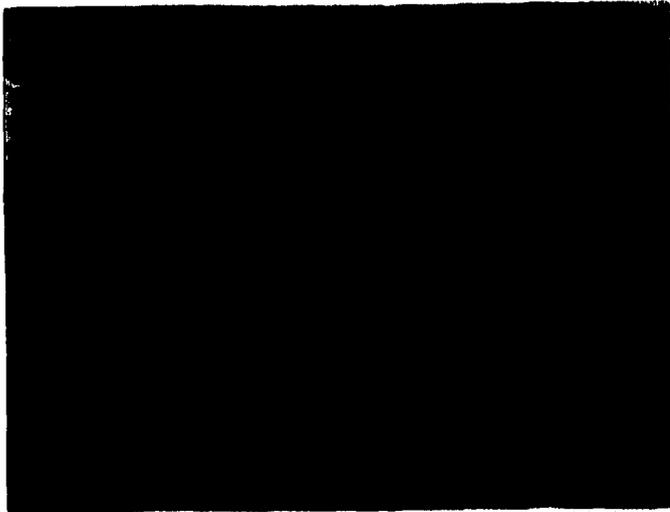


Fig. 3. Falange distal de rata. *Coloración tricrómica de Gomori (variante azul)*. Descalcificante: ácido tricloroacético de Bouin. Objetivo 100 X.



Fig. 4. Lóbulo respiratorio de rata (cerebro). *Técnica argéntica simple de Cajal.* Fijación: formol al 10 %. Objetivo 100 X.

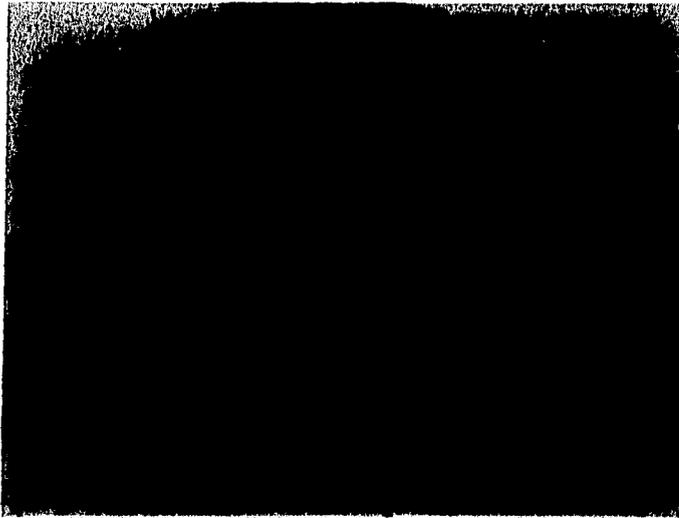


Fig. 5. Células de piel (carcinoma epidermoide). *Técnica de Papanicolaou.* Fijación: alcohol al 96 %. Objetivo 40 X.

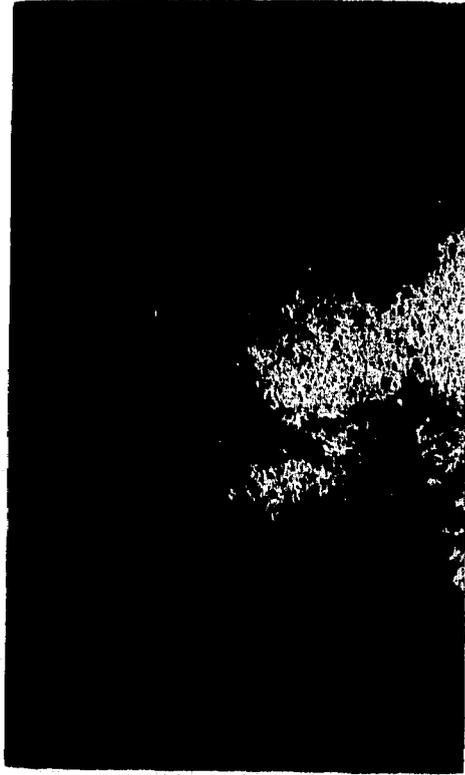


Fig. 6. Lóbulo respiratorio de rata (cerebro).
Técnica de Kluver y Barrera. Fijación: formol
sacarosa amortiguado. Objetivo 10 X.

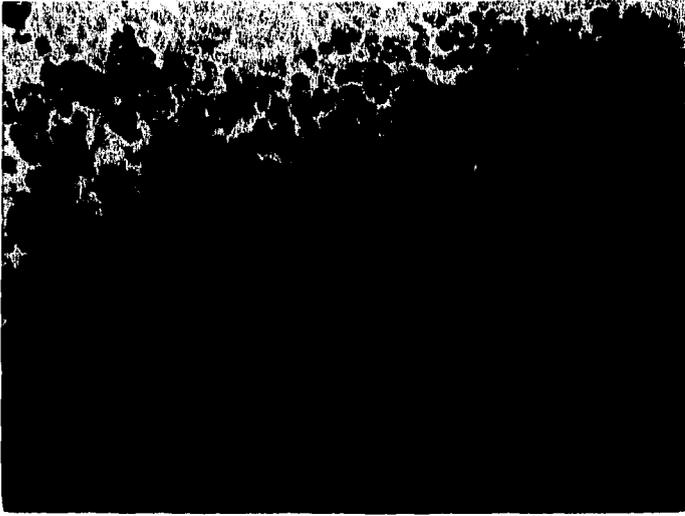


Fig. 7. Bazo de cobayo. *Reacción de Pearls* (con azul de Prusia).
Fijación: formol sacarosa amortiguado. Objetivo 40 X.



Fig. 8. Intestino delgado de rata. *Reacción de azul de Alciano de Mowry*
(contrastado con trioxihemateína férrica de Hansen).
Fijación: formol sacarosa amortiguado. Objetivo 100 X.

BIBLIOGRAFÍA

1. Leeson, T. S.; Leeson, R. C. y Paparo, A.: *Histología*. Interamericana. México, 1987. 618 pp.
2. Gaviño, G. T.; Juárez, L. C. y Figueroa, T. H. H.: *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo*. Limusa. México, 1975. 250 pp
3. Aluja, A. S. de: *Necropsias en Animales Domésticos*. CECSA. México, 1986. 103 pp
4. Vaquero, C. J y cols.: *Fundamentos de Histología*. Interamericana. España, 1982. 431 pp.
5. Estrada, F. E.; Peralta Z. L. y Rivas M. P.: *Manual de Técnicas Histológicas*. A.G.T. México, 1982. 140 pp.
6. Brancroft, J. D.; Stevens A.; Turner D.: *Theory and Practice of Histological Techniques*. Churchill Livingstone. Gran Bretaña, 1990. 726 pp.
7. Fawcett, D. W.: *Tratado de histología*. Interamericana. México, 1988. 1026 pp.
8. Ham, A. *Tratado de Histología*. Interamericana. México, 1975. 935 pp.
9. Lillie, R. D.: *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. Mc Graw-Hill. EUA, 1954. 501 pp.
10. Ramón y Cajal, S.; Tello y Muñoz, J. F.: *Elementos de Histología Normal y de Técnica Micrográfica*. Editora Nacional. México, 1948. 816 pp.
11. Cormack, D. H.: *Fundamentos de Histología*. Harla. México, 1988. 892 pp.
12. Javler, A. A.; Martínez, H. A. y Garrido, F. G.: *Manual de Prácticas de Laboratorio de Virología Veterinaria*. FES-C., UNAM. México, 1994. 71 pp.
13. Curtis, P. J.: *Microtécnica Vegetal*. Trillas. México, 1986. 106 pp.
14. DiFlore, M.S.H.: *Diagnóstico Histológico*. Tomo Y. El Ateneo. Buenos Aires, 1986. 464 pp.
15. Montaño, C.: Apuntes del cursillo "*Técnicas histológicas*". Memorias del XVIII Congreso Nacional de Histología, del 26 al 28 de septiembre: México, 1995.
16. Junqueira, L.C. y Carneiro, J.: *Biología Celular*. Prensa Medica Mexicana, México, 1984. 289 pp.
17. Martoja, R. y Martoja, M. P.: *Técnicas de Histología Animal*. Toray - Masson, España, 1970. 350 pp.
18. Junqueira, L.C. y Carneiro, J.: *Histología básica*. Salvat. México, 1991. 544 pp.
19. Sampedro, J.: *Técnica Micrográfica y Organografía Microscópica*. Editor Francisco M. O. México, 1952. 515 pp.
20. McCurnin, M. D.: *Técnicas Veterinarias*. Manual Moderno. México, 1987. 578 pp.
21. Banks, W. J.: *Histología Veterinaria Aplicada*. Manual Moderno. México, 1986. 730 pp.

22. Panlagua R. y cols.: *Citología e Histología Vegetal y Animal*. Interamericana. España, 1993. 807 pp.
23. Lynch, M.J. y S.S.R.: *Métodos de laboratorio*. Nueva Editorial Interamericana. 1972. 1522 pp.
24. Reimann, A. L.: *Física, Electricidad Magnetismo y Óptica*. Vol II. Compañía Editorial Continental. México, 1975. 654 pp.
25. Jensen, M.M. y Wright, D.N.: *Introducción a la Microbiología Médica*. Prentice - Hall Hispanoamericana, México, 1987. 542 pp.
26. Greep, R.O. y Weiss, L.: *Histología*. El Ateneo. España, 1975. 891 pp.
27. Industrias Carl Zeiss de México.: *El microscopio correctamente enfocado*. (folleto). México s/a.
28. Escuela Superior de Medicina, I.P.N.: *Apuntes del Curso de Técnicas Histológicas*. México, 1991.
29. Benjamín, M. M.: *Manual de Patología Clínica en Veterinaria*. Limusa. México, 1991. 421pp.
30. Medway, W.; Prier, J. E. y Wilkinson, J. S.: *Patología Clínica Veterinaria*. UTEHA. México, 1990. 532 pp.
31. *Citología Diagnóstica en Pequeñas Especies*. Curso teórico práctico, del 26 de Enero al 2 de Febrero. UNAM, FESC México, 1996. 76 pp.
32. Clarence M. Fraser.: *El Manual Merck*. Centrum. Madrid, España, 1988. 1918 pp.
33. Ernesto, F.C.; Nicola, K. B. y cols.: *Manual de Necropsias*. Sección de patología. FES-C, UNAM.: México, 1979. 74 pp.
34. Laboratorio de Histopatología, Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en Salud Animal. SAGAR. México.
35. García, T. R. y Cordova, P. R.: *Manual ilustrado de las técnicas de laboratorio utilizadas en Bacteriología y Microbiología Veterinaria*. Tesis de Licenciatura FESC. UNAM, 1986. 316 pp.
36. Ramón y Cajal; y Castro, F.: *Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso*. Salvat. España, 1972. 283 pp.
37. M en C. Fernandez, G.: Apuntes del laboratorio de Embriología de la Escuela Médico Militar. México, 1991.
38. Mallory, F.B.: *Pathological Techniques*. W.B. Saunders. EUA. 1942. 293 pp.
39. Anzaldúa, A. S. R. y Tolosa, S. J.: *Manual de Prácticas de Histología Veterinaria*. Departamento de Morfología. FMVZ, UNAM México, 1993. 85 pp.
40. Lee, G. L.: *Manual of Histologic Staining methods of the armed forces Institute of pathology*. Mc Graw - Hill. EUA., 1968. 257 pp.
41. Montalvo, C.: Laboratorio de Histología de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM..

42. **Manual de prácticas de laboratorio clínico veterinario.** Sección de análisis clínicos y patología. FES-C, UNAM. México, 1994. 89 pp.
43. Kluver, H. y Barrera, E.: **Méthode mixte cyto - et myélo - architectonique.** J. of Neuropathology and Experimental Neurology 12, p. 400. 1953
44. **Curso de Actualización en Bacteriología y Micología Diagnóstica.** Departamento de Bacteriología y Micología Diagnóstico. FMVZ, UNAM. México, 1986. 138 pp.
45. Her Majesty's Stationery office.: **Manual de técnicas de parasitología veterinaria.** Acribia. España, 1973. 196 pp.
46. **Método de Carbonato Argentico.** Revisión General de Técnicas y Aplicaciones en Histología Normal y Patológica. Archivos de Histología Normal y Patológica. 1:165-205, 329 - 361; 1941 - 1942. 2:231 - 244, 577 - 604. 1943 - 1945.