

17



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

2001/04

"ALCOHOL AMILICO, UNA ALTERNATIVA EN LA
TECNICA HISTOLOGICA."

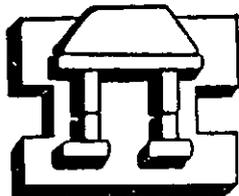
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

CARLA MA. CEBALLOS RUIZ



IZTACALA

2001.



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.



UNAM IZTACALA

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA



Los Reyes Iztacala, 13 de diciembre de 2000

SOLICITUD DE REVISION DE ESTUDIOS

LIC. AMERICA LANDA ROMERO
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACION
ESCOLAR.
P R E S E N T E

Por este medio comunico a Ud. Que el pasante de Biología:

CARLA MARIA CEBALLOS RUIZ

Ha concluido su trabajo de tesis titulado:

“Alcohol amílico, una alternativa en la técnica histológica”

Habiendo entregado a esta Jefatura los votos aprobatorios. Se extiende la presente a fin de que procedan los trámites pertinentes para la realización de su examen profesional.

Atentamente
“Por mi raza hablará el espíritu”


Dr. Sergio Vaca Pacheco
Jefe de la Carrera

AGRADECIMIENTOS

- Al Biólogo Jorge Gersenowies por su valiosa asesoría estadística para la realización durante este trabajo y a lo largo de la carrera.
- A la Doctora Leticia Moreno Fierros por sus valiosas observaciones y por el préstamo del equipo del laboratorio fotográfico del laboratorio a su cargo.
- Al Doctor Jorge Sarquís por su amistad, apoyo y constante estímulo.
- A mis revisores de tesis un especial agradecimiento por el tiempo dedicado a este trabajo.

M. en C. Ma. Del Rosario González Valle.

Biol. José del Carmen Benítez Flores.

Biol. Carmen Álvarez Rodríguez.

Biol. Teresa Ramírez Pérez.

Dedicatoria

- Mami gracias a ti he logrado lo que soy ahora, por tu apoyo, tus ganas, tu esfuerzo y tu gran amor, todo esto te lo debo a ti. Gracias te quiero mucho.
- Papá por tu apoyo.
- Hermanas y guapis que son los mejores compañeros y amigos que tengo.
- Abuelitas siempre están conmigo.
- Lety por ser no solo una buena maestra, si no también una excelente e incondicional amiga que siempre tuvo una palabra de aliento, un oportuno regaño y una sonrisa, te quiero mucho, gracias.
- Maty por todo lo bueno y malo que vivimos y pasamos juntas, porque siempre has estado aquí. Por ser mi mejor amiga.
- David gracias por ser parte de este sueño conmigo, por tus ganas y tu tolerancia, por tú dedicación, tú comprensión, tú amor y por todas las cosas bellas que compartí a tu lado.
- Arturo, Polo mis verdaderos amigos.
- Israel que siempre me has brindado tu apoyo incondicional como compañero y como amigo y me has impulsado a seguir adelante.
- A mi adorado hermanito Josué y mi lindísimo amigo Oscar(Fido).
- Prof. De Carrera que me dieron las bases para empezar este largo camino.
- A todos aquellos que no menciono pero que tienen algo ya sea mucho o poco que ver en la realización de este sueño.

ÍNDICE DE CUADROS, TABLAS GRÁFICAS Y FIGURAS

INDICE	Página
Introducción	1
Evolución histórica	2
Antecedentes	3
Alcohol amílico	10
Justificación	11
Objetivos	12
Material y métodos	14
Resultados	16
Discusión	26
Conclusiones	29
Apéndice	30
Solución salina	30
Formol	30
Ruyter	30
Alcohol ácido	30
Agua amoniacal	30
Técnica histológica	31
Modificaciones a la técnica	31
Técnica de tinción empleada	32
Bibliografía	33

FIGURAS

Página.

1. Intestino delgado. H-E. 52.8x.120 minutos. 1)OH amílico 2) Xilol.	18
2. Ovario. H-E. 132x.30 minutos. 1)OH amílico 2) Xilol.	20
3. Ovario. H-E. 132x.2880 minutos. 1)OH amílico 2) Xilol.	21
4. Hígado. 132x.60 minutos. 1)OH amílico 2) Xilol.	23
5. Intestino delgado. H-E. 52.8x. 1) OH amílico 2) Xilol.	27
6. Útero. H-E. 660x. 30 minutos. 1)OH amílico 2) Xilol.	29

TABLAS

1. Mediciones obtenidas después de la deshidratación en la serie de alcohol etílico.	16
2. Cambios en la longitud de los órganos procesados con Xilol.	19
3. Cambios en la longitud de los órganos procesados con OH amílico.	19

GRÁFICAS

1. Cambios en la long. de los órganos después del tratamiento inicial.	17
2. Cambios en la long. de los órganos huecos en los diferentes tiempos con ambos tratamientos.	22
3. Cambios en la long. de los órganos parenquimatosos en los diferentes tratamientos.	24
4. Cambios en la long. de los órganos a los 30 minutos.	25
5. Cambios en la long. de los órganos a los 60 minutos.	26
6. Cambios en la long. de los órganos a los 120 minutos.	28
7. Cambios en la long. de los órganos a los 2880 minutos.	30

Alcohol Amílico una alternativa en la técnica histológica

INTRODUCCIÓN

El advenimiento del microscopio abrió el campo para el nacimiento de una multitud de ciencias, entre ellas la Histología. El vocablo histología, proviene del griego *histos*, tejido y *logos* tratado. En 1819 el anatomista Meyer de Bonn ideó el término "histología" para designar a la ciencia que estudia los "tejidos" (Estrada, 1928). Este término fue utilizado por primera vez con sentido biológico por Bichat, anatomista y fisiólogo francés, quien sintió gran curiosidad por las texturas de las diversas capas y estructuras que analizó al diseccionar el cuerpo.

La histología es la rama de la biología que estudia la estructura y forma de los diferentes tejidos vivos, los cuales son las agrupaciones celulares dotadas de una organización específica que realizan una función propia y determinada en los organismos. Es un campo de la biología y de la medicina que explora la estructura tisular de órganos, vegetales, animales y humanos a nivel microscópico. Los métodos de estudio son la preparación de cultivos tisulares y la coloración vital en los tejidos vivos, la microtomía, los procedimientos de fijación y la coloración en los tejidos muertos (Estrada, 1928).

La histología guarda relación íntima con otras ciencias biológicas y médicas. Al principio, se había hecho alguna diferencia entre la histología y la anatomía microscópica, pero pronto la primera terminó por incluir a la segunda. De 1800 a 1829 se hicieron investigaciones aisladas sobre la estructura morfológica, como opuesta a la estructura química de los tejidos, en una tendencia de separar la Histología de la Histoquímica (Estrada, 1982).

La creación del microscopio electrónico abrió las puertas a una nueva época de exploración del detalle subcelular y la relación con sus funciones. En tanto se descubrían métodos innovadores que hacían posible separar entre sí los tipos de estructuras que existían en el interior de las células y de este modo se pudieron conocer sus funciones respectivas a nivel bioquímico. Los conocimientos obtenidos se incorporaron pronto a la histología, con lo que se amplió la contribución notable que la biología celular había hecho a la histología médica (Comarck, 1988). Roberto Hooke (1635-1703) hace los primeros cortes histológicos en el corcho, significativamente importantes por el descubrimiento de la célula, usando también lentes de aumento simples y publicó un libro denominado "*Micrographia*" título que destaca la observación de estructuras diminutas (Estrada, 1982).

Evolución Histórica: Durante siglos, el estudio de la anatomía del hombre y de los animales se basó en la disección de órganos y en el examen de la forma y configuración de los mismos. Al no disponerse de instrumentos y técnicas adecuados para profundizar en la organización de los tejidos, el conocimiento que de su estructura se tenía era forzosamente limitado. Tras la invención del microscopio, algunos anatomistas y naturalistas abordaron esta tarea, entre ellos el italiano Marcello Malpighi, el holandés Jan Swammerdam y el francés Marie-Francois-Xavier Bichat. Este último señaló hasta 21 tipos distintos de tejidos en el hombre, la mayor parte de ellos correspondientes a simples órganos o incluso sustancias orgánicas. El término "histología" fue introducido a principios del siglo XIX y a partir de entonces, la joven ciencia experimentó un desarrollo acelerado en el que se abarcó, además del estudio de los tejidos humanos, el de los diversos grupos de vertebrados e invertebrados y también el de los vegetales. Algunos nombres destacados en el avance del saber histológico por sus múltiples estudios acerca de las células tanto animales como vegetales fueron, los alemanes Hugo Von Mohl y Friedrich Gustav Jacob Henle, el del francés Louis-Antoine Ranvier y el del español Santiago Ramón y Cajal (Lesson, 1985).

Aunque en los inicios del siglo XIX ya se disponía de microscopios adecuados, las técnicas para preparar los tejidos distaban de ser ideales. Como los especímenes gruesos no podían observarse con provecho en los potentes microscopios, se necesitaban métodos exactos capaces de proporcionar cortes delgados, sobre todo de tejidos animales no consistentes; éstos sólo fueron posibles después de aplicar la técnica de fijación mediante desecación, alcohol, sublimado y ácido crómico, introducida en 1832 por Jacobson y en 1840 por Hannover. En este campo fue el histólogo suizo Valentine quien en 1839, empleó una doble cuchilla, cuyas hojas podían separarse a discreción, para hacer cortes sucesivos y más exactos de tejidos animales. Por otro lado el primer microscopio verdaderamente útil fue una perfección al microscopio de Adams, construido por el mecánico Oschatz en 1843 tanto para trabajos histológicos animales y vegetales (Estrada, 1982).

En 1852, Kölliger instituyó a la Histología como un campo especial de estudio. En 1864, Chrzonszczewsky ejecuta por primera vez un tefido vital utilizando el carmín. El nacimiento de las anilinas ocasionó una revolución en la práctica de la Histología, por lo que la técnica histológica progresó a pasos agigantados; simultáneamente se fueron desarrollando los procedimientos en el uso de los micrótomos para la obtención de cortes, endureciendo adecuadamente los especímenes mediante congelación, inclusión en parafina, celoidina, gelatina y otras sustancias semejantes, para evitar el desplazamiento de los componentes de los tejidos. En 1864 Edwin Klebs usó en forma conveniente la parafina como medio de inclusión, técnica que años después fue perfeccionada por Paul Meyer (1864-1923).

ANTECEDENTES

La histología además de explorar las funciones corporales sobre bases celulares, intenta satisfacer el deseo obsesivo de describir todas las estructuras orgánicas con el máximo detalle posible. La histología constituye una preparación útil para temas especializados como patología, inmunología y hematología, por el enfoque integrado de estructura y función tisular. Por medio de técnicas *in vitro* se puede conservar la relación estructural entre las células de los tejidos siendo así necesario hacer rebanadas finísimas de ellos comúnmente llamados "cortes", adecuados para el análisis en microscopio común o electrónico. Existen métodos con radionúclidos, en los que las células de un animal vivo pueden ser "etiquetadas" para así vigilar su evolución en cortes obtenidos, en diversos lapsos (Kiernan, 1990).

Los cortes necesarios para un estudio con microscopio común deben ser lo suficientemente finos para permitir el paso de luz y evitar la superposición visual de sus componentes. Para el microscopio común, los cortes suelen ser preparados por la técnica a la parafina, como sigue:

1. Muestra de tejido: Se obtiene la muestra del cadáver, es esencial extraerla lo más rápidamente posible después de la muerte, para evitar la descomposición que ocurre en tal caso. Hay que diseccionar con cuidado el tejido por medio de instrumentos cortantes, para no deformar su imagen microscópica. Para la fijación adecuada, el fragmento no debe exceder de 1 cm³ y tan pronto se le ha extraído, debe ser colocado dentro de una solución fijadora que debe guardar una relación entre el tejido y el fijador de 1:10 a 1:20 veces (Martoja, 1970).
2. Fijación: Los fijadores evitan la degeneración *post mortem* y los cambios que deforman la estructura de células y tejidos; también endurecen los tejidos blandos. Gran parte de esta acción se atribuye al hecho de que polimerizan proteínas que abundan en células y tejidos. La primera cualidad de un buen fijador es la potencia de penetración en los tejidos, conservando sus elementos, especialmente el núcleo, de tal manera que el líquido pueda fijar tanto las capas superficiales como las zonas profundas. La acidez de un fijador es una cualidad importante, ya que el poder de coagulación o precipitación de la mayoría de los fijadores sólo se lleva a cabo en un medio ácido o neutro, un medio alcalino paralizaría la acción inmediatamente. Un buen fijador no debe arrugar ni encoger los tejidos, no los debe ennegrecer, ni dejarlos quebradizos o frágiles (Estrada, 1982). Los fijadores químicos tienen algunas propiedades que deben considerarse en cuanto a los propósitos que se tengan para la muestra. Algunos agentes son fijadores coagulantes, que inducen cambios en las células parecidos a los que ocurren cuando se aplica calor a un huevo. El alcohol etílico y metílico alteran de manera notable la conformación de las macromoléculas. Otros se describen como fijadores aditivos, que actúan al reaccionar con los componentes bioquímicos de la célula (Banks, 1986). Nettleton y McAuliffe en 1986 reportaron que el formaldehído (CH₂O [HCHO]) causa hinchamiento en algunos tejidos y encogimiento en otros (World Health Organization, 1995).

Su uso como fijador no es del todo efectivo, por lo que generalmente es recomendable utilizar el *formaldehído* al 4% en solución amortiguada, hasta obtener un pH neutro. Los fijadores químicos establecen entrecruzamientos de proteínas y las precipitan al sustituir el agua que llevan consigo, como resultado los tejidos se endurecen. El fijador evita que las enzimas hidrolíticas que quedan en libertad al morir las células, degraden componentes hísticos ya que las inactiva y por lo tanto no deforman la estructura de los tejidos al estudiarlos en microscopio. Muchos fijadores son antisépticos potentes, que destruyen microorganismos patógenos como las bacterias de aquellos tejidos que se encuentren infectados. Y en el caso de ser algún virus representan un peligro clínico para quienes los manejan (Kiernan, 1990). Hattel y colaboradores, (citados por Nettleton y McAuliffe en 1986) demostraron en 1983 que los tejidos pueden ser fijados con poco o ningún cambio en el volumen, usando una modificación de la técnica de fijación por fase de partición introducida por Zalokar y Erk en 1977. La fase de partición esta basada en el hecho de que cuando los solventes inmiscibles son puestos en contacto con otro soluto este puede ser dividido en dos fases, de acuerdo a la solubilidad de cada uno de ellos. Posteriormente Nettleton y McAuliffe, usaron formalina, glutaraldehído y diversos solventes orgánicos comparándolos con la fijación en formalina amortiguada neutra al 10% para cinco tejidos, demostrando que la fijación en fase de partición da excelente fijación para microscopia de luz si se utilizan las combinaciones apropiadas de fijadores y solventes. Los reactivos fijadores más comúnmente usados son los ácidos minerales como el ácido crómico y ácido ósmico, sales metálicas como Bicromato de mercurio, Biclouro de mercurio y cloruro de platino, ácidos orgánicos como el pícrico, acético y tricloracético, reductores orgánicos como el alcohol etílico, alcohol metílico, acetona y formol por mencionar los más utilizados en la técnica histológica. En 1987 Kenneth y colaboradores realizaron un estudio acerca de los fijadores, aditivos de fijación, reactivos intermedios a la parafina, y reactivos inmunohistoquímicos, para efectos de preservación de los marcadores de superficie CD3, CD4, y CD8 de linfocitos-T de amígdalas de humano. Se evaluaron los efectos de cada reactivo en secciones congeladas con anticuerpos monoclonales y esta información fue utilizada para perfeccionar la inmunotinción de células-T en secciones de parafina. Encontrando que aquellos factores que causaban algún tipo de daño en el tejido eran: el retraso de la fijación, fijación a un pH ácido, fijación a temperaturas por arriba de los 4°C, el procesamiento con parafina muy caliente, enzimas proteolíticas, el peróxido de hidrógeno metanólico, el Tritón X-100, y la prolongación de tratamiento con yodo. La demostración óptima de células-T en secciones de parafina fue seguida por una fijación del tejido en bicromato peryodato-lisina-paraformaldehído a 4°C, con un pH de 7.5; terminando el procesamiento con isopropanol, después xilol o cloroformo, a 4°C; para su posterior inclusión en parafina con un punto de fusión baja de 45° a 50°C. El tejido fue fijado con formol comercial, glutaraldehído, Bouin y el procesamiento fue perfeccionado para pH y temperatura (Kenneth, 1987).

3. Deshidratación: El principio de la técnica a la parafina es sustituir el agua que inicialmente estaba en el tejido, para así cortar fácilmente el bloque histológico, se realiza en dos fases: la primera es un proceso de deshidratación gradual que se logra al pasar el bloque de tejido fijado por alcohol etílico de diferentes concentraciones hasta llegar al absoluto, sin embargo, el alcohol etílico no es un solvente de la parafina, de tal manera que es necesario sustituirlo por Xilol u otro agente similar, la segunda etapa comúnmente conocida como aclaración es pasar el bloque deshidratado con alcohol etílico a través de Xilol en cambios sucesivos, hasta sustituir el alcohol por Xilol en la preparación para inclusión. Algunos de los deshidratantes más utilizados son: (Lee, 1968)

- Alcohol etílico: Es el deshidratante más comúnmente usado; a una concentración del 70%, con algunas excepciones cuando es utilizado para procesar tejidos, quistes y embriones, los cuales podrían sufrir ligeras distorsiones, se comienzan a deshidratar desde el alcohol etílico al 60%. Los tejidos fibrosos como el músculo, cerebro, nódulos linfáticos y glándulas se infiltran rápidamente y completamente al utilizar el alcohol etílico al 60% especialmente cuando son utilizadas al vacío. Una de las ventajas del alcohol etílico es que es tolerable en cuanto a tiempo de uso debido a que no es agresivo en comparación con otros deshidratantes, para completar la infiltración del tejido. El proceso de deshidratación continua de manera ascendente en la concentración de alcohol etílico hasta llegar al alcohol absoluto. El alcohol isopropílico puede ser usado como sustituto del alcohol absoluto si es necesario, pero es preferible utilizar el alcohol etílico absoluto.
 - Acetona: Es un método rápido, utilizado algunas veces en laboratorios de hospitales y cuando es requerido como un método estático o patrón en algunas técnicas. Una de sus principales ventajas consiste en que no disuelve el ácido úrico ni el glicógeno, también conserva algunas grasas, a condición de que su acción no sea prolongada también su bajo costo, en comparación con los demás; pero sus desventajas son que provoca resequeidad y dureza al tejido lo que ocasiona problemas a la hora de cortar.
 - Dioxano: Es un rápido deshidratante, pero su vapor resulta altamente tóxico y su uso requiere de cuidados extremos y trabajarse en una área ventilada. Durante el procedimiento con el dioxano no es necesario lavar el tejido, proporciona al tejido suavidad por lo que es más utilizado que la acetona. Para una correcta deshidratación con este líquido se recomiendan alrededor de 48 horas.
4. Aclaramiento y conservación: Tras la fijación puede ser necesario demorar la inclusión, en este caso las piezas se conservan en medios líquidos diversos, que son seleccionados según el tipo de tejido, la fijación y el medio de inclusión que será utilizado.

Las sustancias aclarantes, tienen un alto índice de refracción y permiten que los tejidos se observen transparentes, se utilizan entre el alcohol y el medio resinoso (Arriaga, 1987).

Existen numerosos líquidos que actúan como conservadores con propiedades muy similares como por ejemplo: Formol diluido: Los materiales fijados en mezclas de formol, como en líquido de Baker, pueden conservarse en una solución de formol al 10% antes de ser cortados por congelación. Butanol o alcohol butílico normal: Es uno de los líquidos para conservar más utilizados, las piezas pueden mantenerse en él y algunas incluso ganan una consistencia más favorable para cuando se corten. Se emplea también para completar la deshidratación, siendo utilizado por algunos como intermediario entre el alcohol etílico y la parafina con lo que se reducen pasos en el proceso de inclusión. Las piezas que han sido tratadas con formol no pueden soportar este tipo de deshidratación alcohólica. Xilol: Es el agente aclarante más utilizado, actúa rápidamente y no afecta los colorantes de acridina. No disuelve la celoidina y se utiliza en tinciones progresivas. No es miscible en agua, pues en ella puede hacerse "lechoso"; es menos volátil que el benceno y más económico. Aunque endurece más que el tolueno y el salicilato de metilo. Un experimento realizado por Peláez en 1985 arroja excelentes resultados utilizando salicilato de metilo como aclarante de fetos en mamíferos, debido a que es soluble en alcohol, xilol y resina sintética (Arriaga, 1987). Sin embargo no se puede utilizar como agente conservador. Una de sus desventajas es que endurece el tejido más que el cloroformo, pero el control en cuanto al tiempo es menor. El xilol, tolueno y benceno son difíciles de remover durante la impregnación de parafina. Todos son buenos agentes aclarantes, pero para el laboratorio del Instituto de Patología de las fuerzas armadas, el cloroformo es el líquido aclarante más utilizado.

Esencia de cedro: La esencia de cedro constituye en excelente medio de conservación y también es un excelente aclarante. Actúa de intermediario entre el alcohol y la parafina reblandece determinados tejidos que tras la fijación pueden endurecerse y volverse quebradizos. Aunque la esencia de cedro sea miscible con el alcohol de 95° es preferible deshidratar completamente las piezas antes de conservarlas en esencia de cedro. Es un producto muy poco volátil, los baños de parafina que se hacen en el transcurso de la inclusión pronto se impregnan de esta esencia, por lo que hay que renovarlos frecuentemente. Mezcla con colodión: Este tratamiento frecuentemente se denomina inclusión mixta, esta solución contiene un 1% de celoidina, que actúa como conservador. No se trata de un simple medio intermediario, las piezas deben ser cuidadosamente deshidratadas antes de sumergirse en la solución de colodión que actúa como aclarante. La impregnación en celoidina puede efectuarse sin importar el método de fijación. Benceno: Aclara rápidamente haciendo al tejido transparente; provoca menos contracción que el xilol o xileno y el tolueno; Algunas de sus desventajas es el endurecer considerablemente el útero, el músculo y el tendón y de aclarar sólo en alcohol absoluto, puede ser tóxico después de exposiciones prolongadas y debe ser utilizado en cuartos con suficiente ventilación (Sheenan, 1980). El éter de petróleo: Es uno de los mejores aclarantes, no vuelve quebradizo al tejido después de una exposición

prolongada en él, es excelente para los tejidos duros como el útero, el tendón y el músculo, tiene la desventaja de ser inflamable (Sheenan, 1980).

El éter etílico: Aunque es muy común no se emplea como reactivo en síntesis orgánicas, sino más bien como disolvente y anestésico general, se disuelve en agua y en compuestos de polaridad intermedia (Rakoff, 1974).

5. **Inclusión:** El principio de la técnica de inclusión consiste en someter las piezas a la acción de diversos disolventes para conseguir que una sustancia frecuentemente hidrófoba penetre en un tejido que en principio está hidratado, para mantener en su posición original los elementos que lo integran al efectuar los cortes. Por lo que la pieza, debe someterse a una serie de tratamientos sucesivos cada uno de los cuales está destinado a preparar la penetración del siguiente y eliminar el anterior. Este proceso es el que permite finalmente cortes lo bastante delgados para poder examinarlos al microscopio (Banks, 1986). Existen varios métodos de inclusión, los principales son: Inclusión en gelatina, doble inclusión gelatina-parafina, inclusión en parafina, Inclusión mixta celoidina-parafina, doble inclusión celoidina-parafina, inclusión en celoidina. El método de la inclusión en parafina es el más usual, debido a que ofrece mayor número de ventajas prácticas. La parafina histológicamente 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, la de ser químicamente neutras, solubles en numerosos disolventes y fáciles de cortar con la cuchilla. El bloque tisular penetrado por el xilol, se pasa por parafina caliente varias veces. La duración óptima de los baños de parafina se elegirá dependiendo del tipo de tejido; oscila desde algunas horas, en el caso del páncreas de vertebrado, a tres días, en el caso de algún invertebrado, por citar un ejemplo. La duración de la inclusión en parafina depende también del líquido intermediario utilizado que se habrá de eliminar. Cuando más volátil sea, más corta será la inclusión. La parafina derretida llena los espacios antes ocupados por el agua y esta al endurecerse, hace que el bloque esté listo para el corte o puede conservarse de manera indefinida. En el caso de muestras con una gran cantidad de vitelo, Manes y Nieto en 1983, proponen un método de impregnación de celoidina-parafina conveniente para los huevos y la yema de los embriones de anfibios. El método produce bloques de consistencia uniforme que facilita enormemente la calidad del corte y de secciones en serie; debido a su simplicidad y fiabilidad puede adoptarse como un método rutinario en la técnica histológica, las modificaciones básicas hechas para este experimento fueron: El uso del butanol como agente deshidratante reemplazando el alcohol etílico al 90%, la infiltración de las muestras con celoidina, el uso de salicilato de metilo como líquido de aclaramiento, el uso de cloroformo como un líquido intermedio previo a la inclusión en vez del benceno, ya que el n-butanol y cloroformo previenen el endurecimiento del material. La infiltración con celoidina otorgó una consistencia uniforme en las muestras y ayudó a mantener la coherencia de la yema en las áreas más densas.

En 1993 William y Gross estandarizaron una técnica para incluir los tejidos calcificados, como el hueso y esmalte del diente en parafina, para conservar los sitios delicados del factor de crecimiento. La misma técnica, sólo que omitiendo el paso de descalcificación, permite a los tejidos delicados, como los embriones del axolote, (*Mexicanum ambystoma*) que contienen la masa de yema mas grande, puedan ser manejados fácilmente durante el procesamiento del tejido y ser cortados en serie. Todos los especímenes fueron fijados con periodato-lisina-paraformaldehído a 5° C. Hueso y diente fueron descalcificados en solución de EDTA-G (14.50 g. de EDTA, 15 ml. de glicerol) y después de mantenerse a una temperatura de 5° C las muestras fueron lavadas (con PBS, con un pH de 7.2, al vacío) para remover el glicerol. Se deshidrataron los tejidos descalcificados y la yema de los embriones a través de una serie ascendente de isopropanol, posteriormente cuatro cambios de parafina de 1 hora cada uno para ser finalmente incluidos en parafina (Paraplast X-Tra) de bajo punto de fusión y al vacío. Las modificaciones a la técnica como lo fueron el agente fijador, la temperatura y el pH, permitieron conservar así los sitios delicados del antígeno en el factor de crecimiento (William y Gross, 1993).

6. Corte: Una vez que se ha eliminado el exceso de parafina, es posible realizar cortes de el, por medio de un instrumento cortante llamado *micrótopo*. Este instrumento cuenta con una hoja extraordinariamente cortante, que puede ajustarse de tal manera que se logran cortes de diferente grosor. En el filo de la cuchilla se acumulan los "cortes parafinados" en forma de una cinta continua de la cual se pueden separar fácilmente fragmentos individuales con una pinza de disección una vez que la "cinta" se deja flotar en el agua. Para adherir el corte a la laminilla se utiliza un adhesivo o líquido de extensión y una plancha eléctrica a un temperatura entre los 60-65°C aproximadamente. El principio de extensión de los cortes se basa en la dilatación de los cortes al calor, si el líquido de extensión contiene a su vez una sustancia adhesiva los cortes se pegan a la vez que se extienden. Los adhesivos no siempre son totalmente neutros con relación a los colorantes y si se emplean demasiado concentrados o se extiende mal pueden formar después de la tinción molestas capas que a la hora de observar al microscopio nos causen problemas. Entre los líquidos de extensión adhesivos se encuentran la albúmina acuosa, gelatina acuosa o el Ruyter (albúmina, acetona, benzoato de metilo y agua)(Estrada, 1982).
7. Tinción y montaje: El propósito de los métodos de tinción es hacer conspicuos los componentes tisulares para su observación (Craigmyle, 1975). Hoy en día se cuenta con miles de tinciones y combinaciones para su uso en la histología. Casi todos los colorantes usados en histología son sales que se disocian en agua, para que esto suceda la parafina que ha penetrado en el corte debe ser sustituida por agua, cosa que se logra al adherir la "rebanada" finísima en una laminilla y pasarla a través de xilol, para eliminar la parafina, después por alcohol absoluto para eliminar el xilol, por varios "baños" de alcohol en concentración decreciente y al final por agua, así el son muy útiles, ya que se esclarece la información que proporcionan cuando se entienden los fundamentos de sus propiedades colorantes. Las tinciones se describen como *ácidos* y *básicos*.

Si el componente de coloración es un radical ácido por poseer un grupo funcional nitro o quinona, la tinción se designa como ácida, por el contrario, si posee un grupo azo, azin o indo amino es básico y se considera como básica (Gaviño, 1975). La eficacia de una coloración ácida o básica radica en la distribución de las cargas aniónicas y catiónicas relacionadas con las proteínas y complejos proteínicos (lipoproteínas, glucoproteínas) en las células y los tejidos (Banks, 1981). Por lo que se han clasificado en tinciones monocromáticas, tinciones policromáticas con empleo de mordientes o diferenciación y tinciones policromáticas sin mordiente ni diferenciación, donde encontramos la tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) , que es de gran importancia por su interés histórico ya que fue de las primeras técnicas de tinción utilizadas. La hematoxilina es un colorante básico, que se extrae de la madera del árbol *Haematoxylon campechianum*, originario de México que también es cultivado en Jamaica. Es de los colorantes más utilizados en Histología, y para tener buenos resultados, se tiene que oxidar para transformarse en hemateína, ya sea por contacto con el aire, con un mordiente o con una sustancia oxidante como el iodato de sodio o el óxido de mercurio (Drury, 1980). La costumbre ha impuesto el término hematoxilina, cuando lo correcto sería hablar de hemateína (Arriaga, 1987). La hematoxilina es muy importante en las tinciones biológicas. Es un colorante versátil y tiñe muy intensamente el núcleo, las estructuras mitóticas, la mielina, las fibras elásticas, la fibrina, las estriaciones musculares, ciertos leucocitos granulados, las mitocondrias, la mucina, la hemoglobina, el colágeno, los axones, los fosfolípidos, los protozoarios, los ácidos grasos, las células alfa y beta de la pituitaria y los islotes pancreáticos. Sin embargo no diferencia al ácido nucleico del ácido desoxirribonucleico. Tiene una excelente propiedad policrómica que permite observar diferentes matices de azul y rojo en una sola preparación (Conn, 1961). La hematoxilina frecuentemente se combina con la Eosina para dar un mayor contraste. La eosina es un colorante artificial rojo, ácido y se aplica en material fijado, tiñe el tejido conectivo y el citoplasma de rojo. Varía mucho en intensidad y matiz. La eosina deriva de la fluoresceína y se encuentra en forma pura, el color que da es amarillo o azulado (o un rojo intenso). La eosina y (amarillenta), se disuelve comúnmente en agua o en alcohol, siendo la eosina amarilla, la más recomendada. Una vez teñido el corte, se hace pasar por una serie de recipientes con alcohol de diversas concentraciones hasta llegar a alcohol absoluto y después por xilol (Martoja, 1970). Ya teñidas las laminillas se limpian una por una quitando el exceso de Xilol y se pone una gota de resina sintética, se coloca un cubre-objetos para que la resina se extienda y quede protegido el corte (Martínez, 1981).

ALCOHOL AMILICO

Su formula química es (-) - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$, es un líquido volátil, de olor característico, de sabor picante, punto de ebullición 128°C , el punto de flama es de 67°C , la densidad relativa a 20°C es de 0.809, pH 5, soluble en agua, miscible con alcohol etílico, benceno, éter, cloroformo, glicerol y aceites. Se debe guardar perfectamente bien cerrado y protegido de la luz. Toxicidad humana: Irrita moderadamente las membranas mucosas, es narcótico en altas concentraciones. Es utilizado como hipnótico en terapia para gatos (Windholz, 1976).

El alcohol amílico se obtiene mediante el proceso de fermentación de azúcares de levadura, el proceso de síntesis más antiguo del mundo empleado por el hombre. Los alcoholes utilizados para este tipo de síntesis provienen de varias fuentes, principalmente de la mezcla de caña de azúcar o del almidón que se obtuvo de diversos granos. El alcohol amílico utilizado para el comercio se obtiene por destilación del aceite de fusel (del alemán: Fusel= "Licor de mala calidad") que es una mezcla de alcoholes primarios como el isopentílico, n-propílico, isobutílico y el 2-metil-1 butanol o alcohol amílico (Morrison & Boyd, 1987).

Se emplea para preparar el acetato de amilo, el nitrito de amilo y el amileno. Los alcoholes amílicos más importantes son los siguientes :

1. Alcohol isoamílico o isobutil-carbinol: Es un líquido incoloro de olor desagradable, y la inhalación de sus vapores causa tos. Es soluble en agua al 3.4% y a su vez, el agua es soluble en este alcohol al 2%. Se obtiene del aceite de fusel o también tratando el monoclora-iso-pentano con hidróxido sódico. Por su oxidación con ácido crómico pasa a ácido asovalérico. $D = 0.823$; P. e. = 131.4° .
2. Alcohol amílico activo, butil-carbinol secundario: P. e. = 128° .
3. Alcohol amílico normal: Se obtiene tratando el cloro pentano normal con hidróxido sódico. P. e. = 137° .
4. Hidrato de amileno, alcohol amílico terciario: Es un líquido incoloro con penetrante olor canforáceo. Se prepara a partir del ácido beta-iso-amileno haciéndole pasar a través de ácido sulfúrico y diluyendo después con agua. En Norteamérica se fabrican mezclas complejas de diversos alcoholes amílicos a partir del cloro pentanos derivados del petróleo (Windholz, 1976).

USOS:

Son disolventes de resinas de urea y formaldehído, reforzadas con alquidos, de cetona y aldehído, copales blandos etc. Como son muy disolventes se emplean como diluyentes de líquidos hidráulicos de tipo del aceite de ricino, de líquidos carburantes, limpiadores de cañones de fusiles, inhibidores de la formación de gomas en la gasolina, tintas de imprenta y lacas. En minería como espumantes para la flotación de menas no ferrosas y como colectores en forma de xantanos como de potasio. Como agentes antiespumosos y en fotografía como agentes químicos (Kirk, 1998).

JUSTIFICACIÓN

Aunque en general, las modificaciones en la técnica histológica son para hacerla más eficiente, estos cambios siguen los mismos principios fisicoquímicos y en algunos casos las mejoras también repercuten en sus efectos secundarios como son costos y toxicidad (Martoja, 1976). En algunos pasos existen reactivos que no han presentado alguna variación por lo difícil que resulta encontrar líquidos similares que tengan más beneficios que perjuicios, tal es el caso del uso del alcohol etílico, en el paso de deshidratación que es poco tóxico y económico, no así el caso de los líquidos intermedios como el xilol o el aceite de cedro. El primero es altamente tóxico y debe controlarse muy bien el tiempo de uso y el segundo es muy caro y aunque es un líquido intermedio excelente también es difícil de conseguir.

Los pasos de la técnica histológica hasta la actualidad han sufrido modificaciones menores o no ha habido aportaciones relevantes y en algunos de los pasos no han sufrido modificación alguna, por lo que, la bibliografía disponible es escasa.

Ahora bien, los principios básicos de la técnica histológica son la sustitución y resustitución del agua tisular, normalmente los líquidos empleados son alcohol etílico y xilol o sustitutos que tengan características de solubilidad o miscibilidad entre el alcohol y la parafina o Paraplast (parafina sintética que provee mejores características de dureza al corte con micrótopo). Los líquidos intermedios más utilizados son principalmente el xilol (1, 4-C₆ H₄(CH₃)₂), cloroformo (CHCl₃) aceite de cedro. Kiernan en 1990 (Cuadro 1) presenta una tabla de más de 20 líquidos intermedios utilizados, con sus ventajas y desventajas. En su mayoría sus desventajas son: toxicidad, costos y resultados. Si bien el xilol es el medio que más se utiliza, este reactivo es altamente tóxico, endurece y contrae mucho los tejidos y su tiempo de exposición debe ser mínimo por lo que no sirve como agente conservador.

PROPIEDADES DE LOS SOLVENTES UTILIZADOS EN HISTOLOGIA

Nombre	Índice de refracción a 20°	Punto de ebullición (°C)	Observaciones
Grupo I Agentes deshidratantes miscible con agua y agentes aclarantes (Grupo II), pero no son miscibles con parafina o con medio de montaje (resina)			Los líquidos absolutos usualmente contienen alrededor de 1% de volumen de agua, pero comúnmente esto es ignorado. El etanol y el isopropanol son los solventes más volátiles
Acetona	1.36	56	
Etanol (alcohol etílico)	1.36	78	
Isopropanol (OH isopropílico)	1.38	82	
Metanol (alcohol metílico)	1.33	65	
Grupo II Agentes aclarantes Miscibles con agentes deshidratantes (grupo I), medio de montaje (resina); pero no miscibles con agua			Los tejidos se transparentan solo cuando el índice de refracción del agente aclarante es mayor de 1.47.
Acetato de amilo (acetato isoamílico)	1.40	142	Olor penetrante
Benceno	1.50	80	Evitar la inhalación de vapor.
n-Butanol (n-butil, alcohol)	1.40	118	Particularmente miscible con agua. Puede ser usado como deshidratante. Su vapor es irritante
Cloroformo	1.45	61	Aclarante de tejidos pero no es un buen amortiguador
Aceite de cedro	1.51	260 (aprox.)	Solamente miscible con etanol
Benzoato de metilo (aceite de niobe)	1.51	200	Olor no desagradable
Salicilato de metilo (aceite de pirola)	1.54	223	Olor penetrante no desagradable
Tolueno	1.50	111	Evitar la inhalación de vapor
Xileno (mezcla de isómeros)	1.50	140 (aprox.)	Aclarante más utilizado. Causa ardor como ningún otro aclarante
Grupo III Solventes combinados para deshidratación y aclaramiento Miscibles con agua y con parafina no necesariamente miscible con resina (medio de montaje)			
Dioxano (óxido de dietileno)	1.42	101	Vapores tóxicos. Pueden formarse peróxidos explosivos después de mucho tiempo de almacenamiento
Grupo IV Diversos líquidos			
Agua	1.33	100	
Glicerol	1.47	290	Miscible con agua, agentes aclarantes, pero no con agentes deshidratantes
Éter	1.35	35	Mezclado con líquido es peligrosamente flamable
Ácido acético	1.37	118	Miscible con agua y todo tipo de solventes del grupo I-III. Usado como fijador, en solución amortiguadora y soluciones de tinción

Tabla 1. (Extraído de Kiernan, 1992, pp. : 433)

Agentes como el cloroformo dan buenos resultados pero sus desventajas son su alta volatilidad, poca miscibilidad con la parafina lo que aumenta el tiempo de impregnación en parafina y su costo. El aceite de cedro es costoso, tiene poca disponibilidad en el mercado y en algunos tejidos, como el músculo, los endurece, también su miscibilidad con la parafina o paraplast es poca lo que aumenta el tiempo de impregnación, además al usarse con mucha frecuencia, su rendimiento baja y contamina rápidamente las parafinas o paraplast de impregnación, lo que aumenta los costos de la técnica.

Las ventajas del alcohol amílico en comparación con el xilol, el cloroformo, entre otros, son su costo y que además de ser un líquido intermedio también es considerado como un líquido aclarante lo que permite mejor visibilidad a la tinción. En la búsqueda de un sustituto que ofrezca características de alta miscibilidad con el alcohol absoluto y la parafina, tiempos cortos de sustitución entre ambos líquidos, poca toxicidad y poco endurecimiento y contracción de los tejidos y costos reducidos, se pretende comprobar en el presente trabajo, si el alcohol amílico, un solvente orgánico, poco tóxico, de rendimiento alto en función de poca contaminación para el líquido de impregnación parafínica, pues tiene un rango alto de volatilidad a 60 °C, sería un buen sustituto del xilol, un solvente tóxico, difícil de remover durante la impregnación con parafina, volátil y de alto costo, por lo que se plantea lo siguiente:

OBJETIVOS

1. Determinar si el alcohol amílico dadas sus características, puede utilizarse como líquido intermedio en la inclusión dentro de la técnica histológica.
2. Estandarizar los tiempos de empleo del alcohol amílico en el proceso de inclusión.
3. Comparar los efectos del alcohol amílico en la inclusión de diferentes órganos (huesos y parenquimatosos) con respecto al xilol.
4. Verificar si no se alteran las capacidades tintóreas del tejido utilizando la Tinción más común de Hematoxilina y Eosina (H-E) en tejido tratado con OH amílico durante la inclusión.

Agentes como el cloroformo dan buenos resultados pero sus desventajas son su alta volatilidad, poca miscibilidad con la parafina lo que aumenta el tiempo de impregnación en parafina y su costo. El aceite de cedro es costoso, tiene poca disponibilidad en el mercado y en algunos tejidos, como el músculo, los endurece, también su miscibilidad con la parafina o paraplast es poca lo que aumenta el tiempo de impregnación, además al usarse con mucha frecuencia, su rendimiento baja y contamina rápidamente las parafinas o paraplast de impregnación, lo que aumenta los costos de la técnica.

Las ventajas del alcohol amílico en comparación con el xilol, el cloroformo, entre otros, son su costo y que además de ser un líquido intermedio también es considerado como un líquido aclarante lo que permite mejor visibilidad a la tinción. En la búsqueda de un sustituto que ofrezca características de alta miscibilidad con el alcohol absoluto y la parafina, tiempos cortos de sustitución entre ambos líquidos, poca toxicidad y poco endurecimiento y contracción de los tejidos y costos reducidos, se pretende comprobar en el presente trabajo, si el alcohol amílico, un solvente orgánico, poco tóxico, de rendimiento alto en función de poca contaminación para el líquido de impregnación parafínica, pues tiene un rango alto de volatilidad a 60 °C, sería un buen sustituto del xilol, un solvente tóxico, difícil de remover durante la impregnación con parafina, volátil y de alto costo, por lo que se plantea lo siguiente:

OBJETIVOS

1. Determinar si el alcohol amílico dadas sus características, puede utilizarse como líquido intermedio en la inclusión dentro de la técnica histológica.
2. Estandarizar los tiempos de empleo del alcohol amílico en el proceso de inclusión.
3. Comparar los efectos del alcohol amílico en la inclusión de diferentes órganos (huesos y parenquimatosos) con respecto al xilol.
4. Verificar si no se alteran las capacidades tintóreas del tejido utilizando la Tinción más común de Hematoxilina y Eosina (H-E) en tejido tratado con OH amílico durante la inclusión.

MATERIAL Y METODOS

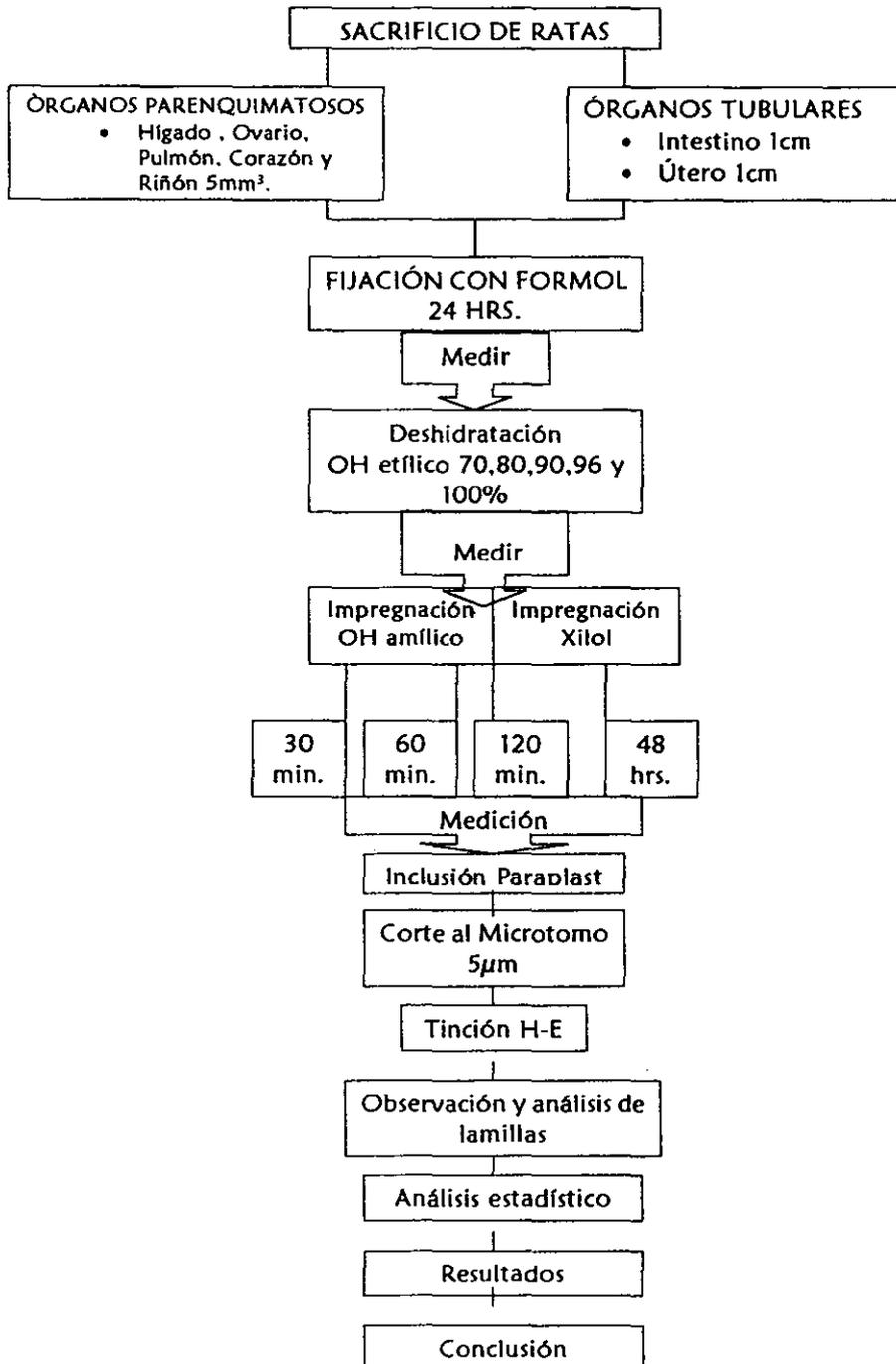
Para la elaboración de este trabajo se utilizaron 10 ratas hembras de la cepa Wistar, de la misma edad con un peso aproximado de 200-250g. Las muestras fueron obtenidas sacrificando la rata por dislocación cervical e inmediatamente fueron perfundidas con 750ml. de solución salina isotónica con el fin de obtener los órganos limpios es decir libres de sangre (Apéndice 1).

Se extrajeron los siguientes órganos: Intestino delgado, útero, ovario, hígado, pulmón corazón y riñones, se cortaron fragmentos de 1cm³ para intestino delgado y útero; y para ovario, hígado, pulmón corazón y riñones se cortaron fragmentos de 5mm³ aproximadamente. Fueron enjuagados en solución salina y posteriormente se fijaron con formol al 4% (Apéndice 3) durante 24 horas y se tomaron medidas de altura y grosor, con la ayuda de un vernier para mayor exactitud. Para continuar el procesamiento de los órganos, se deshidrataron con alcohol etílico en graduaciones crecientes, iniciando con 70°, 80°, 90°, 96° y 100° una hora par cada alcohol, para después volver a medir altura y grosor y registrar si existe o no algún cambio después de la deshidratación. Posteriormente se impregnaron las muestras con xilol y alcohol amílico respectivamente, a los diferentes tiempos 30, 60, 120 y 2880 minutos (48 hrs.). Fueron medidos cada uno de los órganos por tiempo y por tratamiento. Se incluyeron en Paraplast, orientando los órganos y etiquetándolos. Para ambos tratamientos se hicieron cortes al Microtomo (American Optical) a 5µm. adhiriéndolos con Ruyter (Apéndice 2) y tiñéndolos con la técnica (H-E), se montaron con resina sintética y se utilizaron cubreobjetos Corning #1 (Kiernan, 1990). (Apéndice 4).

Una vez elaboradas las preparaciones, se hizo el análisis histológico de los órganos, observando las diferencias tisulares y celulares con la ayuda de un fotomicroscopio Olympus BX40, para comparar en los diferentes órganos con ambos tratamientos y a diferentes tiempos. Se trataron de manejar los mismos campos y se tomaron fotomicrografías de éstos mismos a los diferentes aumentos (4, 10, 16, 50 y 100).

Para el análisis estadístico los datos obtenidos de las mediciones de los órganos después de la impregnación con OH amílico y xilol, respectivamente, fueron procesados utilizando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) trifactorial, (tratamientos, tiempo, órganos) y prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05 para sacar las diferencias entre órganos, tiempos y tratamientos mediante la ayuda del programa estadístico (Statistica 3.1 para Windows 95).

METODOLOGÍA



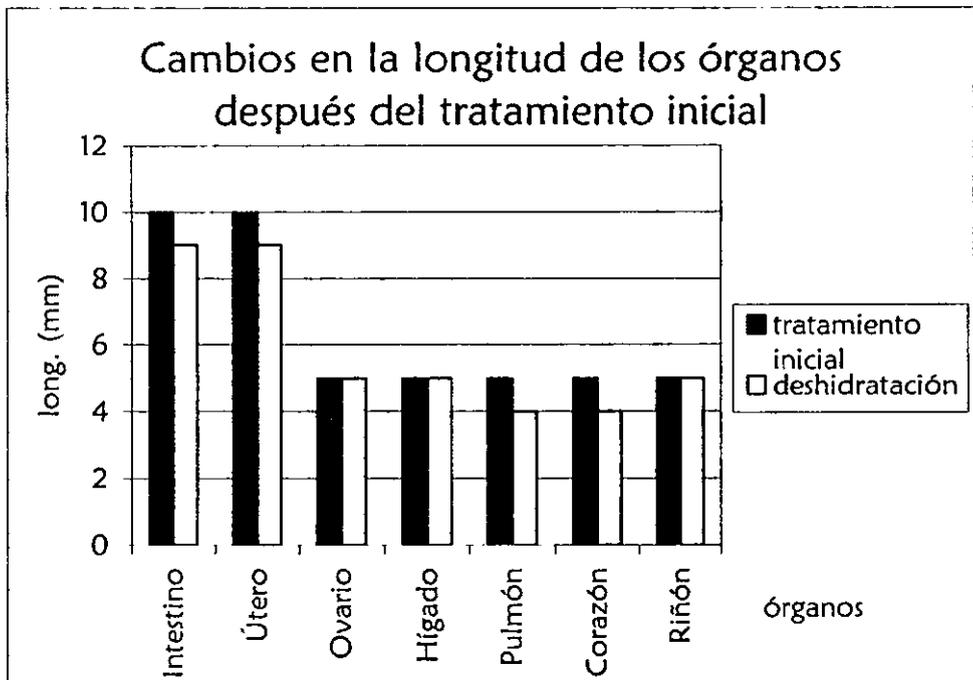
RESULTADOS

La preservación de la morfología fue el principal criterio para juzgar la calidad y el tiempo en el que los órganos podían permanecer en el líquido intermedio sin presentar ninguna alteración como cambios en la longitud o cambios en el tamaño original y dureza del órgano durante la inclusión. Los órganos huecos (Intestino y Útero) fueron extraídos y cortados con 1 cm de longitud, mientras que los órganos parenquimatosos (Ovario, Hígado, Riñón, Pulmón y Corazón) fueron extraídos y todos fueron cortados con 0.5mm³ aprox. (Tabla 1). Se pudo observar que después de la deshidratación (8hrs. después) con las diferentes concentraciones de alcohol, los órganos huecos (Intestino y Útero) y algunos parenquimatosos sufrieron cambios en la longitud (Pulmón y corazón), siendo el intestino el que más cambio de longitud presenta hasta de un 30% (Tabla 1 y Gráfico 1).

Después del tratamiento con alcohol amílico y xilol se observaron otros cambios además del encogimiento, con el xilol se observó que el tejido se endureció y cambio de aspecto, tornándose rojizo, translúcido y muy duro al tacto. El cambio de longitud con este tratamiento inicia con la deshidratación alcohólica. Mientras que para aquellos órganos tratados con alcohol amílico el tejido no presento cambios en su aspecto, ni textura. Los cambios de longitud se inician con la deshidratación alcohólica en los órganos huecos (Intestino y Útero). Y en (pulmón y corazón) que son órganos parenquimatosos (Tabla 1).

TIPO DE ÓRGANO	ÓRGANO	OBTENCIÓN DE LA MUESTRA (mm)	DESPUÉS DE LA DESHIDRATACIÓN (mm)	ENCOGIMIENTO (%)
H	Intestino	10	9	30
H	Útero	10	9	10
P	Ovario	5	5	0
P	Hígado	5	5	0
P	Pulmón	5	4	20
P	Corazón	5	4	20
P	Riñón	5	5	0

TABLA 1. Mediciones obtenidas después de la deshidratación en la serie de alcohol etílico en concentraciones progresivas (70, 80, 90, 96 y 100% dos horas c/u). No hubo variaciones por lo que no se reportan desviaciones. H = (Hueco) P = (Parenquimatoso).



Gráfica 1. Contracción que presentan los órganos después de la deshidratación con referencia a la obtención de la muestra.

La prueba de análisis de varianza (ANOVA) multifactorial y la Prueba de Tukey se utiliza para determinar las diferencias entre grupos, poblaciones y tratamientos (Campbell, 1996), la combinación de ambas pruebas facilita la identificación y cuantificación de varias muestras, además de que permite reducir el tiempo de análisis de muestras y tratamientos. Los resultados del análisis de varianza nos indican que existen modificaciones en los parámetros considerados; esto es, se presenta alteración en cuanto a cambios de longitud desde la deshidratación en la mayoría de los órganos a todos los tiempos y con ambos tratamientos, a excepción del Hígado y el Riñón tratados con OH amilico que se mantienen constantes.

El análisis de varianza (ANOVA) trifactorial con respecto a los tratamientos aplicados en los diferentes órganos, permitió observar diferencias significativas ($P < 0.05$) respecto al cambio de longitud de los órganos. Ambos órganos huecos presentan cambios de longitud desde la deshidratación pero el intestino delgado, al tratamiento con xilol a los 30, 60 y 2880 minutos desde la deshidratación, presentó cambios, siendo el tiempo más drástico los 120 minutos donde presenta un cambio de longitud del 40% (Fig. 1): el útero presenta cambios al tratamiento con xilol desde la deshidratación los 120 y 2880 minutos donde se observa un cambio de longitud de un 30% y 50% respectivamente en relación al tamaño inicial al obtener la muestra (Gráfica 2) (Tablas 1, 2 y 3).

1)



2)

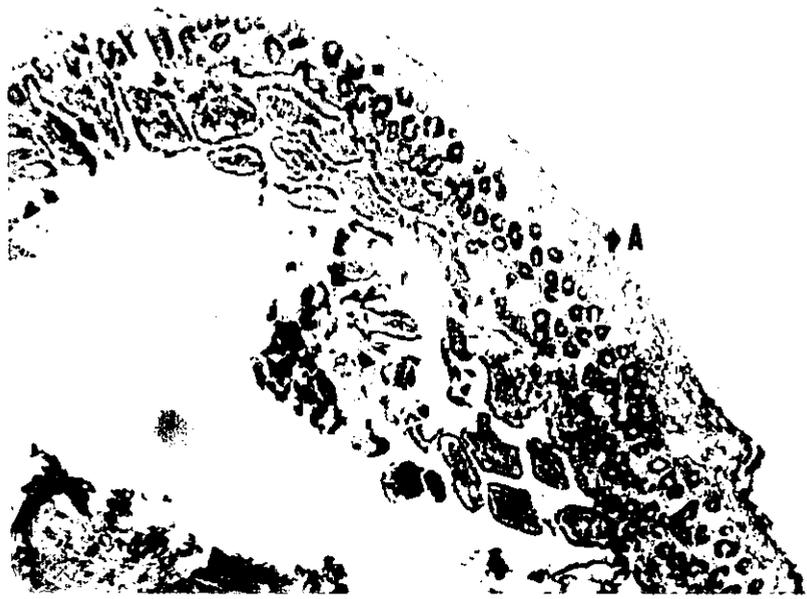


Fig. 1 Intestino delgado. H-E. 52.8x. 120 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol. Se observan diferencias en el grosor de la capa muscular (A) y las vellosidades (B) de observan más teñidas debido a que hubo un mayor encogimiento y dureza de tejido lo que provoco que estas no salieran completas al corte.

Para los órganos parenquimatosos tanto el pulmón como el corazón en ambos tratamientos se mantienen constantes desde la deshidratación, no así para el ovario tratado con xilol, ya que a los 120 minutos presenta un cambio de longitud del 40%, mientras que los 30, 60 y 2880 minutos le son más favorables debido a que presenta menores cambios en la longitud del órgano a comparación de los 120 minutos. En comparación con los ovarios tratados en OH amílico, los 60, 120 y 2880 minutos le son favorables (Fig. 2 y 3) ya que el tejido permanece sin cambios de longitud, no así para los 30 minutos donde se observa un cambio de longitud de 20% (Gráfica 3).

TRATAMIENTO CON XILOL

Órgano	Obtención de la muestra (mm)	Deshidratación 30 min.	30 min.	60 min.	120 min.	2880min
Intestino delgado	10	9	7	7	6	7
Útero	10	9	8	8	7	5
Ovario	5	5	4	4	3	4
Hígado	5	5	4	5	5	3
Pulmón	5	4	4	4	4	4
Corazón	5	4	4	4	4	4
Riñón	5	5	5	5	4	4

Tabla 2. Cambios en la longitud de los órganos a través del tiempo cuando se procesaron con Xilol.

TRATAMIENTO CON OH AMÍLICO

Órgano	Obtención de la muestra (mm)	Deshidratación 30 min.	30 min.	60 min.	120 min.	2880min
Intestino delgado	10	9	8	8	9	9
Útero	10	9	9	9	9	7
Ovario	5	5	4	5	5	5
Hígado	5	5	5	5	5	5
Pulmón	5	4	4	4	4	4
Corazón	5	4	4	4	4	4
Riñón	5	5	5	5	5	5

Tabla 3. Cambios en la longitud de los órganos a través del tiempo cuando se procesaron con OH Amílico.

1)



2)



Fig. 2. Ovario. H-E. 132x. 30 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol. Se puede observar arrugas al corte (A) y desprendimiento del tejido(B), así como folículos terciarios (C) dañados al corte a diferencia del folículo que se puede observar del tratamiento con OH amílico.

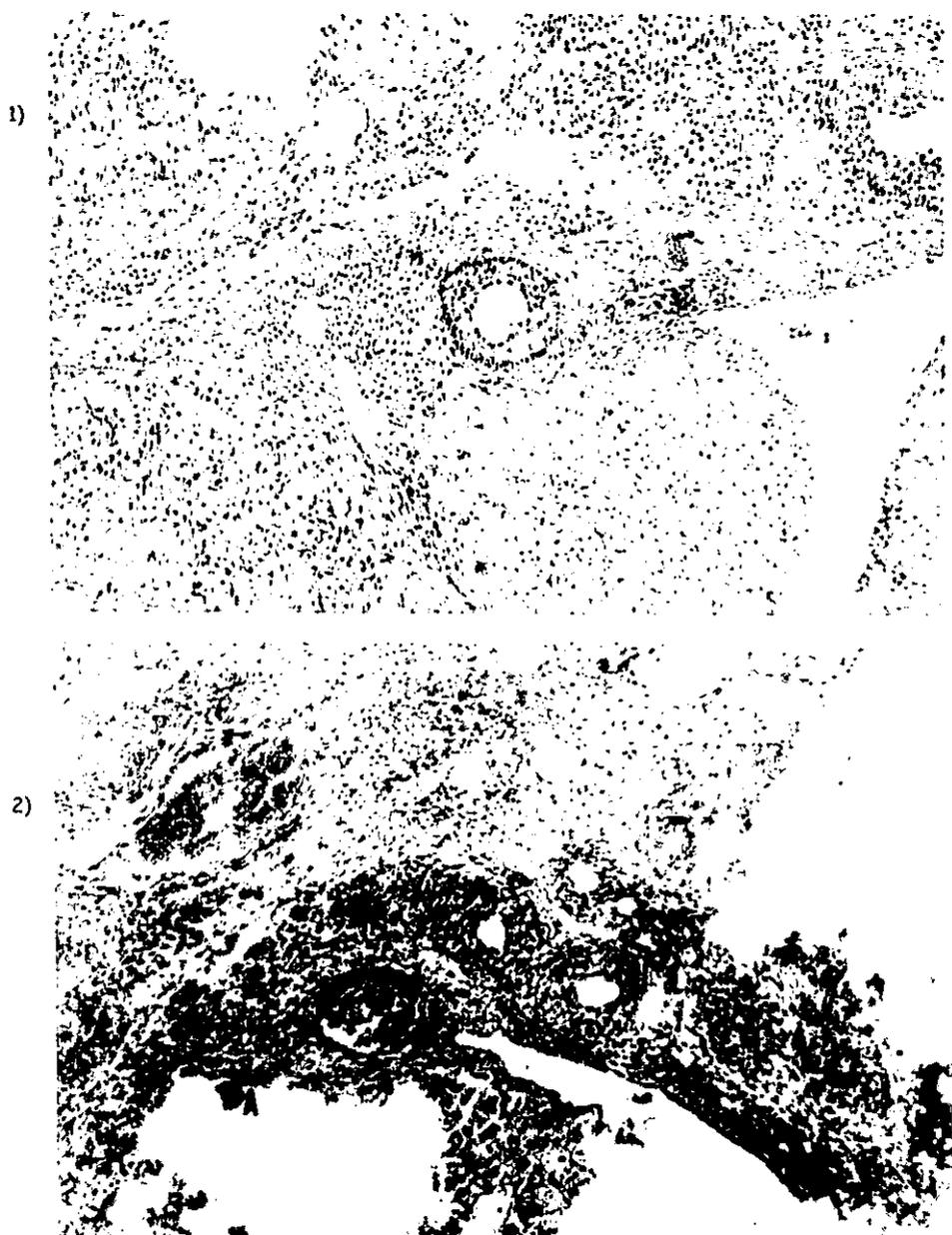
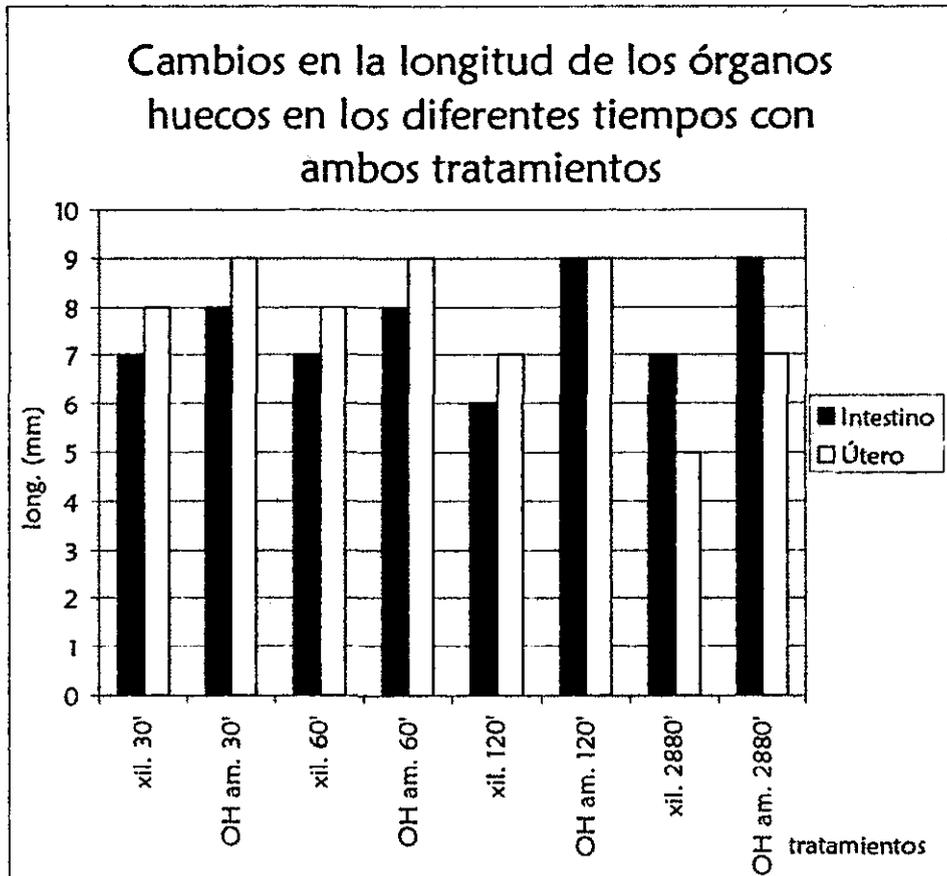


Fig. 3. Ovario. H-E. 132x. 2880 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol. A pesar de que el ovario tratado con xilol presenta cambios patológicos, se puede observar mucho desprendimiento de tejido (A) además de encogimiento.



Gráfica 2. Cambios en la longitud que presentan los órganos huecos con ambos tratamientos a diferentes tiempos.

Para el hígado tratado con OH amílico se puede observar que todos los tiempos le son favorables, mientras que para aquellos que fueron tratados con xilol solo los 60 y 120 minutos le son favorables (Fig. 4), ya que a los 30 minutos el hígado presenta una disminución en su longitud del 20% y el tratamiento a los 2880 minutos redujo más el órgano en un 40%. Para el riñón el tratamiento con xilol solo le fue favorable para los 30 y 60 minutos permitiéndole al órgano permanecer con la misma longitud desde la deshidratación, no así para los 120 y 2880 minutos donde se presentó un cambio de longitud del 20% para ambos casos. Para el riñón tratado con OH amílico cualquier tiempo le es favorable.

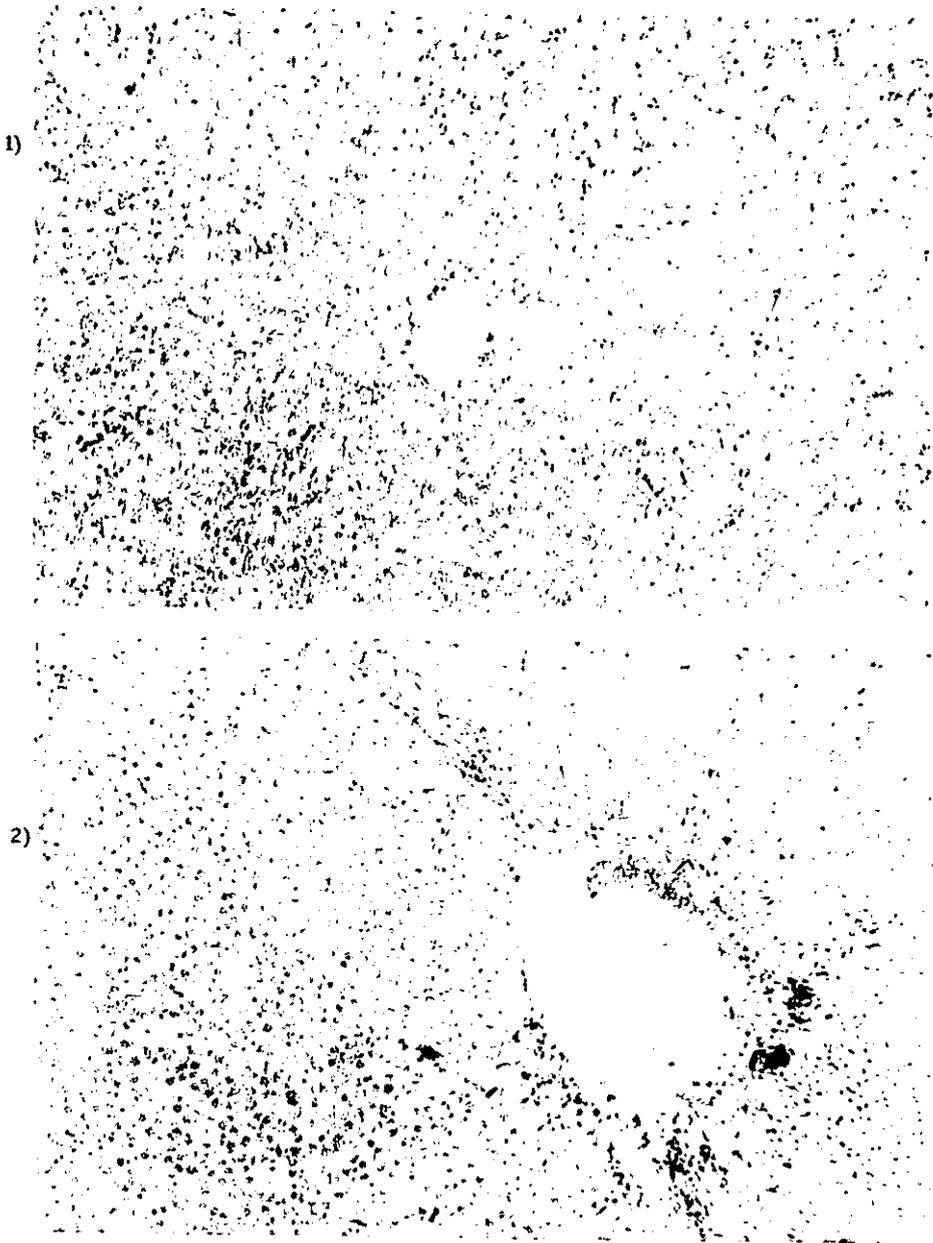
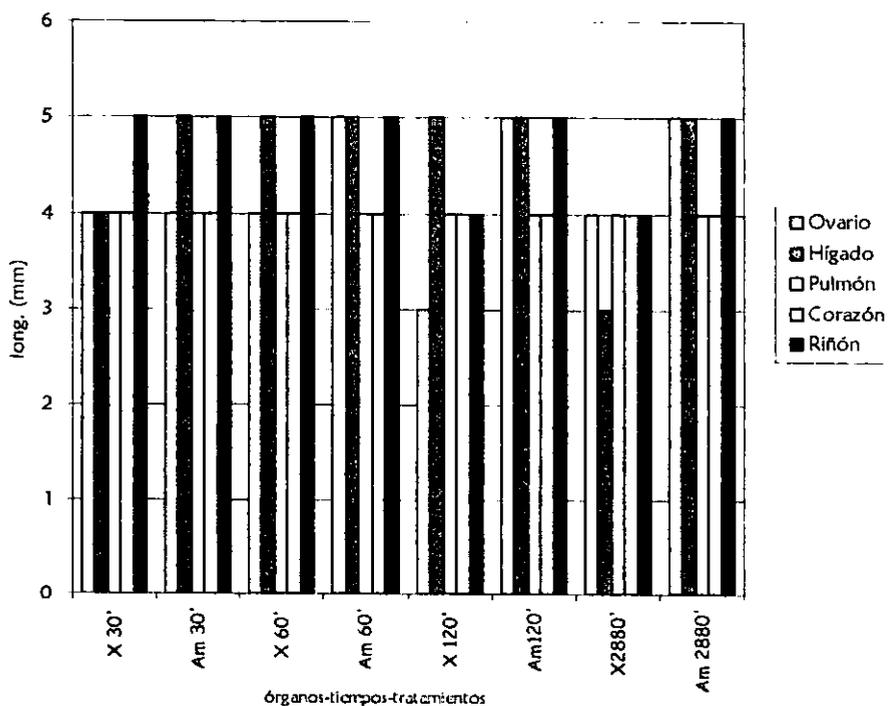
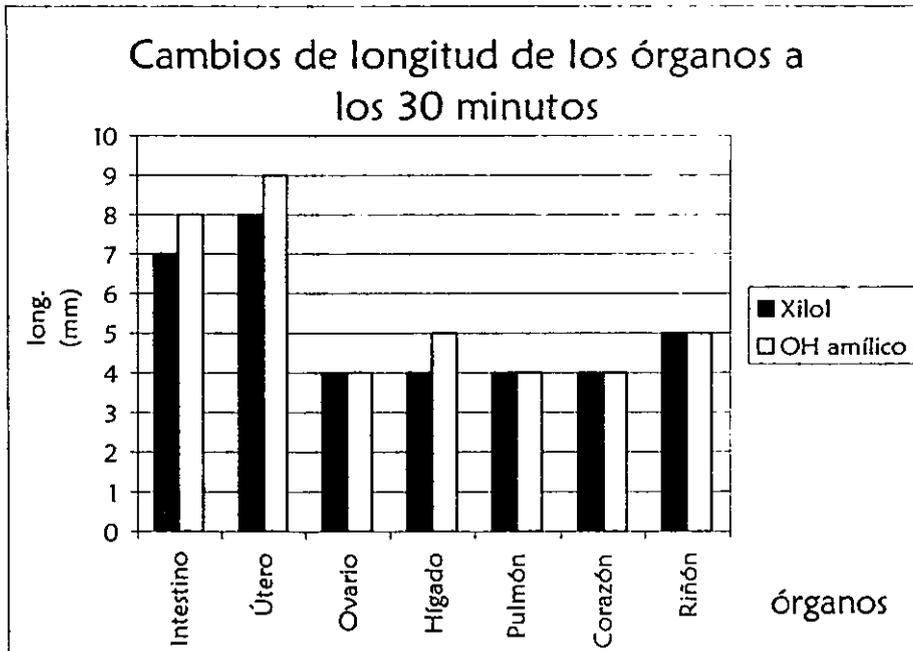


Fig. 4. Hígado. H-E. 132x. 60 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol.
No hay grandes diferencias en el corte, ambos tratamientos le son favorables al hígado en cuanto a corte y tinción.

Cambios en la longitud de los órganos parenquimatosos en los diferentes tratamientos



Gráfica 3. Contracción que presentan los órganos parenquimatosos con ambos tratamientos a diferentes tiempos.



Gráfica 4. Cambios de longitud de los órganos en diferentes tratamientos a los 30 minutos.

Otro de los factores considerados fue el tiempo y se encontró que existen diferencias desde los 30 minutos a los 2880 (48 hrs.) se observan cambios más drásticos en aquellos órganos que fueron tratados con xilol (Gráficos 4 al 7 y tablas 3 y 4). Respecto a la interacción entre tratamientos y tiempo encontramos que el tratamiento con xilol a los 120 minutos no le es favorable a los órganos huecos, el intestino, sufre cambio de longitud de un 40% (Gráfica 6), mientras que para el útero el peor tiempo son los 2880 minutos, ya que el órgano presenta un cambio de longitud del 50% (Gráfica 7). Con el tratamiento de OH amílico la longitud de los órganos huecos también sufrió alteraciones, siendo el tratamiento con xilol a los 120 minutos el más notorio y perjudicial para el intestino y los 2880 minutos para el útero (Gráfica 2).

Por otro lado para los órganos parenquimatosos tratados con xilol el mejor tiempo en que los órganos pueden permanecer sin sufrir cambios drásticos respecto a su longitud es a los 60 minutos, conservando la misma longitud desde su deshidratación, a excepción del ovario el peor tiempo es a los 120 minutos tratado con xilol ya que disminuye su longitud un 40% y el hígado a los 2880 minutos de tratamiento con xilol disminuye también en un 40% (Gráfica 3).

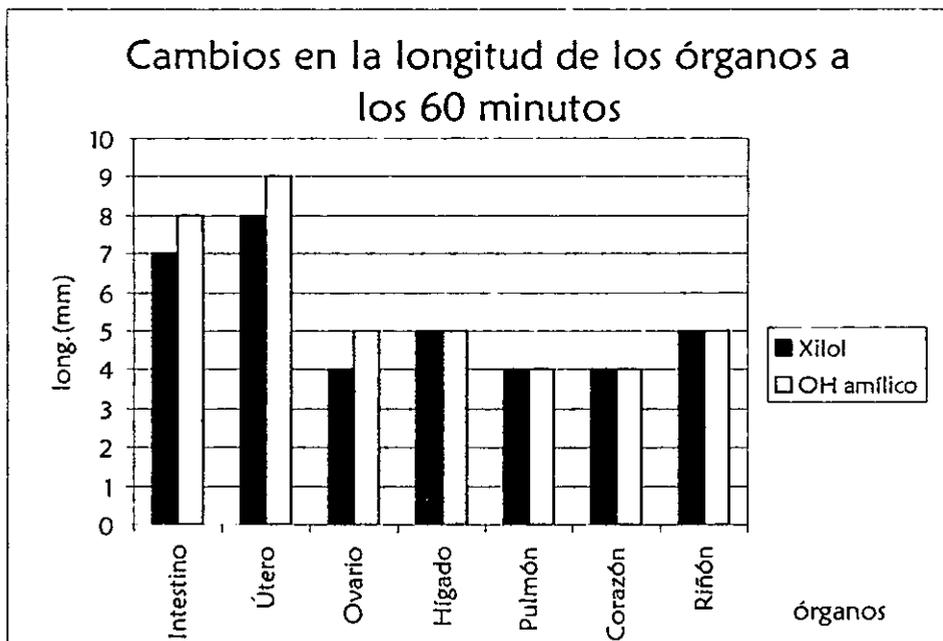


Gráfico 5. Cambios en la longitud de los órganos a los 60 minutos con ambos tratamientos

Respecto a la interacción de órgano y tiempo, los que presentaron mayores diferencias significativas ($P < 0.05$), fueron los órganos huecos (intestino y útero), siendo el peor tiempo para intestino los 120 minutos con xilol. Disminuyendo su longitud en un 40%. El útero tratado con OH amílico tanto los 30, 60 y 120 minutos le son favorables, no así los 2880 minutos donde para ambos tratamientos se presentan los mayores cambios de longitud con OH amílico de 30% y para el útero tratado con xilol el cambio es de 50% (Gráfica 7). En los órganos parenquimatosos los que presentaron más diferencias significativas fueron el hígado a los 2880 minutos de tratamiento con xilol (40%) y el ovario a los 120 minutos de tratamiento con xilol (40%), en comparación a los tiempos restantes de tratamiento con xilol, indicando así ser el peor tiempo respectivamente, para permanecer en el líquido intermedio. Con OH amílico los mejores tiempos están entre los 60, 120 y 2880 minutos para el ovario, hígado y riñón (Gráfico 5, 6 y 7) (Fig. 5).

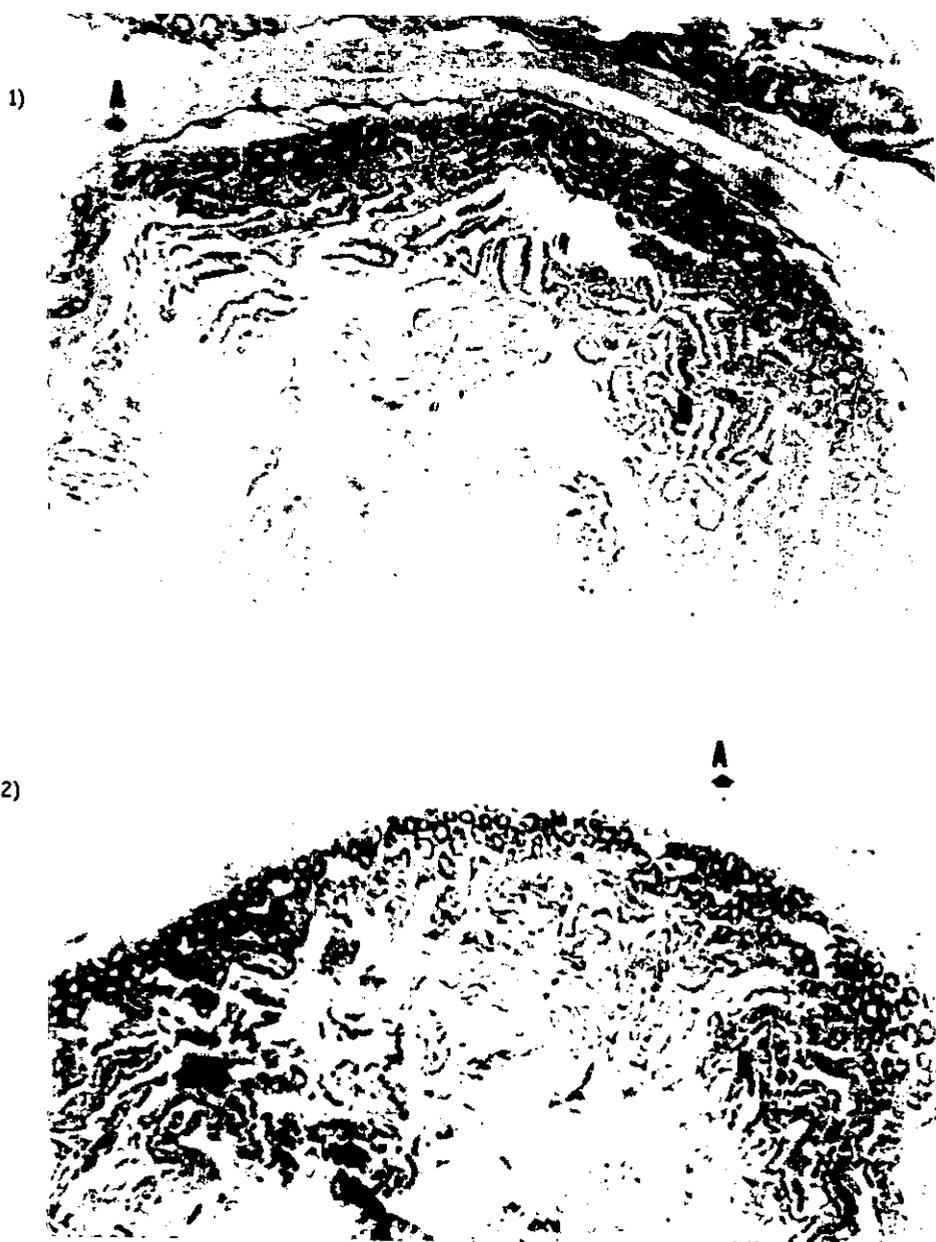


Fig. 5. Intestino delgado. H-E. 52.8x. 2880 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol. El grosor del epitelio (A) es ligeramente menor para el intestino tratado con xilol también debido a que el tejido presenta mayor encogimiento y dureza, las vellosidades (B) se observan más teñidas.

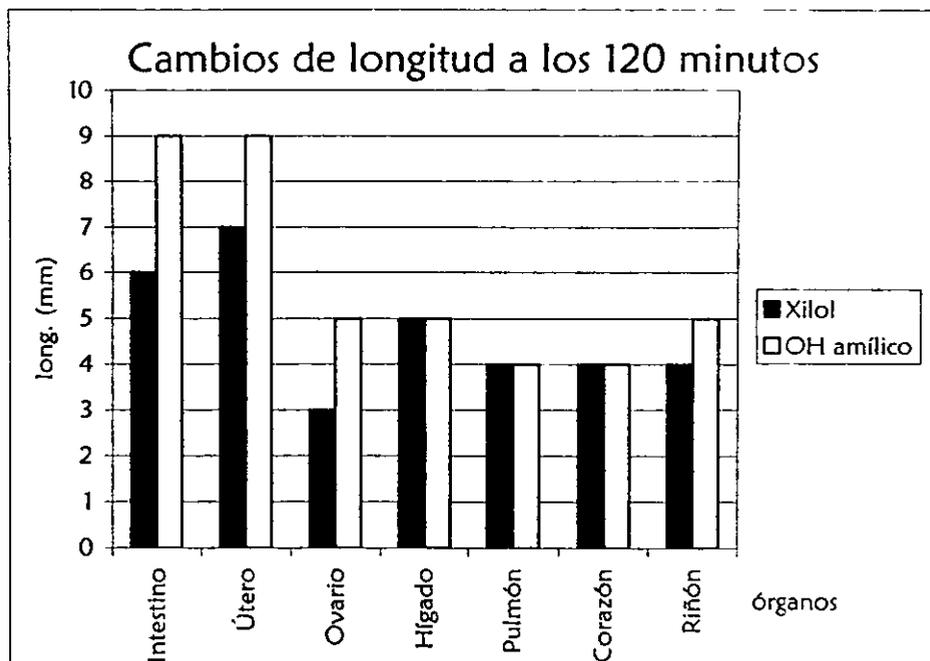


Gráfico 6. Cambios de longitud durante 120 minutos para los diferentes órganos con ambos tratamientos

En el análisis trifactorial (órganos, tratamiento y tiempos) encontramos que el útero a 120 y 2880 minutos en OH amílico presenta una diferencia de 20% con respecto al tratamiento con xilol ($P < 0.05$), lo que nos indica, que para el útero es mejor tratamiento el OH amílico (Gráfica 6). El útero tratado con xilol, presenta mayor cambio de longitud durante 2880 minutos (50%), siendo los mejores tratamientos con xilol los 30 y 60 minutos (20%) (Fig. 6). Mientras que para el intestino tratado con xilol el peor tiempo para permanecer en él, es a los 120 minutos, donde se observa un cambio de longitud del 40% y de los intestinos tratados con OH amílico los 120 y 2880 minutos le son favorables.

Respecto a los órganos parenquimatosos, tratados con OH amílico, el hígado y el riñón presentaron el mismo comportamiento, a través de los tiempos por lo tanto de los 30 minutos a los 2880 le son favorables. Sin embargo, se puede observar claramente que en los órganos parenquimatosos tratados con xilol el comportamiento no es constante; sin importar el tiempo que permanezcan en el líquido intermedio, los órganos sufren cambios en su longitud. Los órganos que no presentan diferencias muy notables al paso del tiempo son el corazón y pulmón tratados con xilol conservando la misma longitud desde la deshidratación (Gráfico 3).

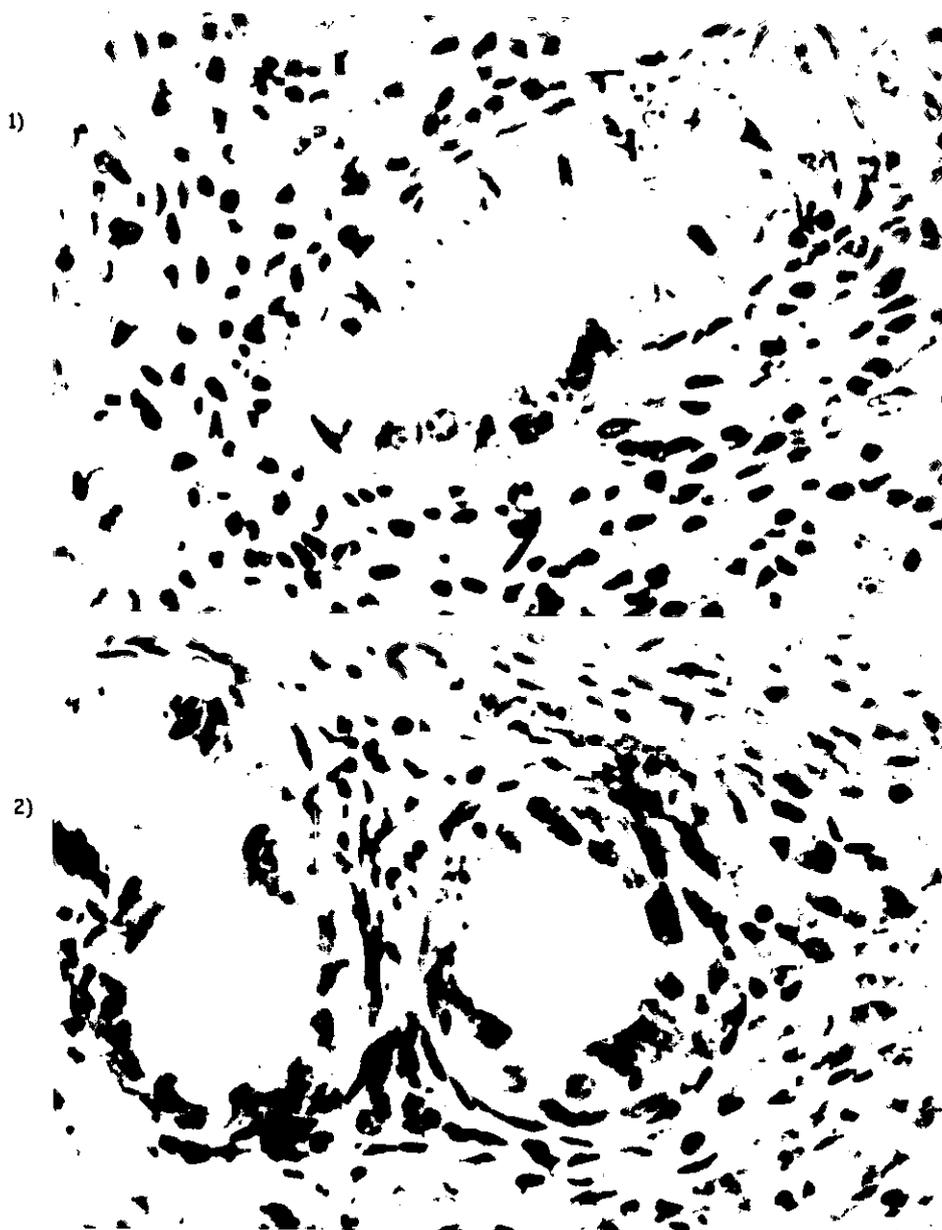


Fig. 6. Útero. H-E. 660x. 30 minutos. 1) OH amílico, 2) xilol.

Se puede observar que el útero tratado con xilol presenta un poco de encogimiento en el tejido (A) a comparación del que fue tratado con OH amílico.

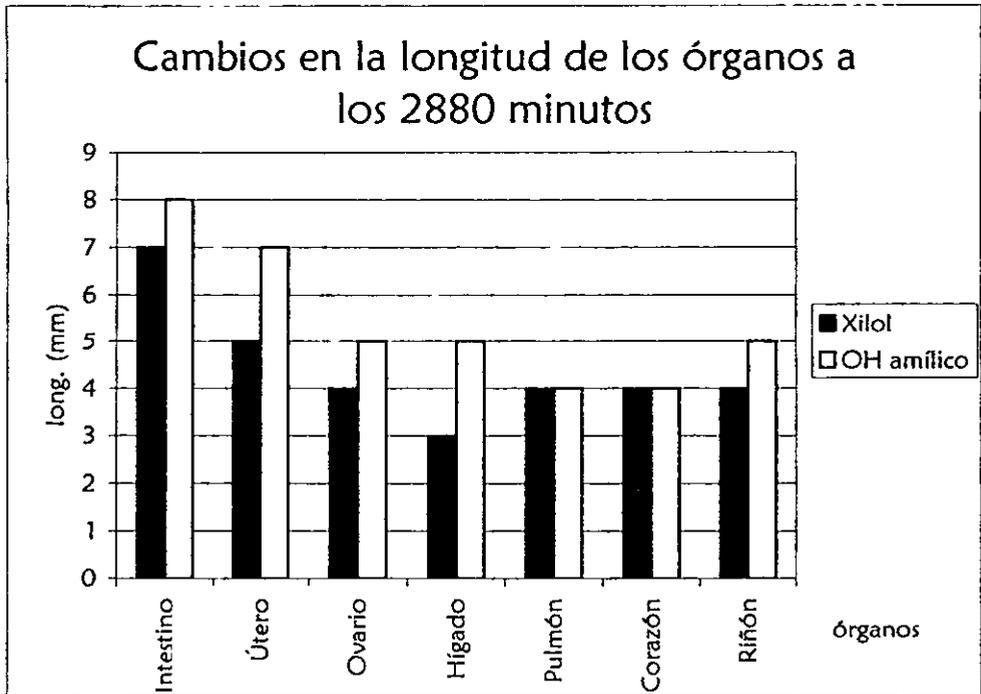


Gráfico7. Cambios de longitud durante 2880 minutos para los diferentes órganos con ambos tratamientos

Las diferencias más notables en órganos huecos tratados con xilol son para el útero con un cambio de longitud del 50% a los 2880 minutos y para los órganos parenquimatosos tratados con xilol el hígado a los 2880 minutos sufre un cambio del 40%. Los órganos tanto huecos como parenquimatosos tratados con OH amílico a los 2880 minutos, presentan cambios en cuanto a su longitud, no tan drásticos (Gráfica 7).

El análisis cualitativo de los cortes histológicos permite observar que, la mayoría de las veces, hay una mejor preservación de los tejidos a nivel microscópico con el OH amílico. Sucede lo contrario con el xilol pues conforme se va aumentando el tiempo de exposición, se observa mayor deterioro en el corte. A los 30 minutos ya existen cambios en la longitud de los tejidos con ambos tratamientos y por lo tanto no se observan diferencias significativas en la estructura del tejido (Fig. 2 y 6): Sin embargo para este tiempo, el cambio de longitud obtenido con alcohol amílico es el que se presenta desde la deshidratación, en todos los casos a excepción del ovario.

Los tipos de órganos tanto parenquimatosos como es el caso del hígado e intestino para órganos huecos no presentan pérdida de afinidad tintórea (Fig. 1 y 4); Sin embargo se observó que los órganos huecos tratados con xilol presentaron más cambios tanto de dureza como cambios en su longitud, que aquellos que fueron tratados con OH amílico (Gráfico 3) mientras que los órganos parenquimatosos tratados con OH amílico no presentaron alteraciones en los resultados finales a excepción del ovario a los 30 minutos (Gráfico 2). Sin embargo a partir de los 30 minutos en xilol se puede observar cambio de longitud tanto en los órganos huecos como parenquimatosos. Los cambios más notorios se presentan en los órganos tratados con xilol en los cuales se pudo observar macroscópicamente diferencias en la estructura del tejido, ya que los órganos en al entrar en contacto con el xilol inmediatamente se tornaban rojizos y se endurecían. Microscópicamente se pudo observar que aquellos órganos tratados con xilol tenían una apariencia seca que hacia ver a las células rasgadas e incompletas, mientras que con el OH amílico las células se ven completas y en general el tejido no presenta ninguna diferencia significativa (Fig. 4). No hubo pérdida en la afinidad tintórea.

En los tratamientos de xilol y durante 120 minutos se presentaron diferencias significativas en cuanto al cambio de longitud de los órganos, siendo más notorio para aquellos órganos que fueron tratados con xilol (Fig. 1). A los 60 minutos, los órganos al entrar en contacto con el xilol, se tornaron rojizos y duros. No así con el OH amílico, que conservó las propiedades del órgano, sin alterar su color ni su consistencia, permaneciendo así hasta su corte.

A los 2880 minutos (48 hrs.) de tratamiento con xilol se presentaron los mismos cambios tanto macroscópicamente, como lo fue el cambio de apariencia y consistencia. Microscópicamente se pudo observar que el tejido tenía una apariencia seca, rasgada e incompleta; Esto se debe a que el tiempo en el líquido intermedio (xilol) fue excesivo y dañino, en especial para aquellos órganos considerados parenquimatosos, como hígado y ovario, (Fig. 3) y en el intestino considerado como órgano hueco, al realizar el corte era casi imposible obtenerlo, debido a que el órgano se desbarataba, convirtiéndose en polvo con facilidad (Fig. 5). En cuanto a la afinidad tintórea, se pudo observar que los órganos parenquimatosos presentaban pérdida de afinidad tintórea a los 120' y 2880' con OH amílico.

DISCUSIÓN

Las pruebas realizadas para órganos huecos como parenquimatosos demuestran que el OH amílico no les produce, drásticamente endurecimiento ni contracción, en comparación a aquellos órganos que son tratados con xilol, sino por el contrario le dan suavidad al órgano y no es tan celoso como el xilol en cuanto a tiempos permitiéndoles hasta 48 horas en OH amílico sin sufrir alteraciones drásticas en cuanto a su longitud o en el caso de perder afinidad tintórea, esto puede solucionarse aumentando tiempo en el colorante ácido (eosina). Aunque ya es conocido por todos aquellos que practican la técnica histológica de rutina, que el xilol endurece y reseca demasiado las muestras, las transparenta adecuadamente y en corte y tinción frecuentemente se obtienen buenos resultados; el alcohol amílico no tiene la virtud de transparentar adecuadamente al órgano, pero se compensa ampliamente porque tiene la virtud de no endurecer ni contraer demasiado el tejido, facilitando así el corte. Además la transparentación del tejido se obtiene en el proceso de tinción, al entrar en contacto con el xilol.

El OH amílico puede ser utilizado como líquido de preservación diferente del fijador, pues en este trabajo se utilizaron hasta 48 horas, el equivalente a un fin de semana, lo que prevé grandes ventajas en el trabajo de laboratorio y el riesgo mínimo de sufrir cambios en su longitud. En prácticas previas con el uso del alcohol amílico se ha tenido la experiencia de mantener las muestras hasta 15 días sin que se altere el tejido (comunicación personal Leticia Verdín, 1999). Solo existe un trabajo previo de Gómez Clavel y Verdín donde se reporta que el alcohol amílico se puede usar como agente intermedio, aunque existen diversos trabajos donde se ha utilizado el alcohol amílico como líquido intermedio, ninguno de estos trabajos, manejo sistemáticamente el alcohol amílico comparándolo con el xilol (el agente intermedio más usado) ni tampoco se había hecho un análisis del efecto del líquido intermedio sobre el tejido a diversos tiempos, sin embargo en los trabajos donde se ha utilizado el alcohol amílico como líquido intermedio, se han obtenido óptimos resultados en cuanto a corte y tinción de los diferentes órganos tratados. Algunos de estos trabajos son los realizados por: María de Lourdes Trejo Sánchez que realizó una descripción histológica de las gónadas de *Citharichthys spilopterus* del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz en 1996, Alfredo Gallardo Torres hizo el estudio de algunos aspectos de la Biología de *Opsanus beta* Goodey Bean (Osteichthyes Batrachoididae) en el sistema estuarino de Tecolutla Veracruz donde realiza cortes histológicos de gónadas femeninas y masculinas para determinar tipos celulares, maduración gonádica e Índice gonadosomático utilizando el OH amílico como líquido intermedio en la técnica histológica, también en 1996. Martha Edith Miranda Marure realizó el estudio de algunos aspectos reproductivos de *Oostethus lineatus* en 1997, Maribel Badillo Alemán trabajó algunos aspectos de la Biología de *Gobionellus hastatus* (familia Gobiidae) para determinar tipos celulares de gónada femeninas y masculinas, realizando cortes histológicos y utilizando el alcohol amílico como parte de la rutina de la técnica histológica y Raquel Hernández Saavedra realizó una descripción macro y microscópica de las gónadas de *Gobiomorus dormitor*, todos en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz en 1997.

En 1998 Teresa Antonia Bautista López realizó una descripción macroscópica e histológica de las gónadas de *Anchoa mitchilli* (Siscea: Engraulidea). Otro trabajo en el que fue utilizado el alcohol amílico como un líquido intermedio es el de Cesar Carlos Barragán Gutiérrez en 1998, en donde se realizó un análisis celular ovárico del pez vivíparo *Poecilia sphenops* en estado de madurez gonádica. Elizabeth Muñoz Rodríguez realizó una descripción histológica de las gónadas de *Mugil curema* (Valenciennes), Emma Méndez Chávez realizó un estudio haciendo cortes histológicos de gónada ayudando a la contribución en el conocimiento de la biología del pez sol *Achirus lineatus* (Suicidae), ambos trabajos realizados en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz en 1998.

Otro trabajo, a nivel inmunológico, es el realizado por Mónica Chávez Maldonado que realizó un estudio de linfocitos B y células plasmáticas de intestino delgado y grueso en ratones inmunizados con *Entamoeba histolytica* y toxina de cólera en 1998. Además en este trabajo al utilizarse inmunohistoquímica, nos indica que el OH amílico no modifica proteínas en su estructura terciaria y por lo tanto provee una ventaja más para su utilidad. Mientras que Sergio Cortés Mata realizó el estudio de algunos aspectos reproductivos incluyendo histología gonádica de la biología de *Gobiodes broussoneti* (Pisces, Gobiidae) en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz también en el año de 1998. Carlos Pérez en 1999 realizó un estudio histológico, dando a conocer algunos aspectos comparativos entre las dos especies de peces planos *Citharicthys spilopterus* y *Achirus lineatus*, típicas del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz, Daniel Núñez Gutiérrez realizó un análisis histológico comparativo de dos especies de la familia Ariidae: *Bagre marinus* y *Arius melanopus* también en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz en 1999. Es importante recalcar que la mayoría de estos estudios se realizaron en ovarios de peces cuyo contenido de vitelo en los ovocitos maduros es muy altos y con la técnica histológica convencional (con xilol) interfiere al corte pues el vitelo se endurece mucho. Esto no ocurre con el alcohol amílico, se puede decir que también este líquido intermedio se puede utilizar con resultados satisfactorios para aquellas estructuras que contengan mucho vitelo.

De los resultados obtenidos para este trabajo, podemos decir, que si bien el OH amílico es un buen agente intermedio, tiene la desventaja de perder afinidad por la eosina, principalmente en músculos de tejido parenquimatoso. Esto se debe a que el tejido al entrar en contacto con el OH amílico adquiere acidez por lo que la eosina pierde afinidad para teñir el tejido. Si bien en este trabajo no se utilizaron otras técnicas de tinción ni otros fijadores, existen datos previos no publicados de que el alcohol amílico se ha utilizado en el procesamiento de muestras que han sido fijadas con paraformaldehído-ácido pícrico para pruebas inmunohistoquímicas con buenos resultados, también se han hecho pruebas con técnicas de tinción como la tricrómica de un paso, eritrosina específica para eosinófilos, hematoxilina férrica para morfología testicular y reacción de PAS-Schiff. Sin embargo, por lo extenso del trabajo metodológico, no fue posible realizarlo. También faltaría determinar metodológicamente, el endurecimiento que provoca el alcohol amílico comparándolo con el xilol.

Es importante recalcar que con los resultados obtenidos en el presente trabajo, puede utilizarse el alcohol amílico como un líquido intermedio entre el alcohol absoluto y la parafina, ya que no produce encogimiento excesivo, ni endurecimiento y la pérdida de afinidad tintórea se puede compensar con aumentar el tiempo de inmersión en el colorante ácido como en este caso la eosina y así lograr que su efecto tintóreo sea eficaz.

Otro aspecto importante de la evaluación del alcohol amílico como líquido intermedio en la técnica histológica, es que, a lo largo de los muchos años en que se ha practicado la técnica histológica no había sufrido modificaciones importantes; si bien el uso del xilol no siempre es regla, si es el líquido intermedio más ampliamente utilizado en la mayoría de los laboratorios de histología y patología, aunque ya se conocen los riesgos de ser un líquido intermedio cancerígeno y contaminante para el medio ambiente. El alcohol amílico tiene la ventaja que su toxicidad es muy baja y hasta la fecha, no se le ha reportado como cancerígeno, sino como irritante (Index Merck, 1976) y al manejo también se siente la diferencia en toxicidad, pues su olor es menos irritante que el del xilol.

Las técnicas histológicas deben seguirse siempre de manera crítica, buscando así las condiciones más adecuadas para cada caso particular, hasta lograr un resultado exitoso, considerando que son una herramienta científica que nunca ha sido estática y que siempre ofrece las posibilidades de evolucionar. Sin embargo hay que evitar hacer variaciones superfluas, tomando en cuenta que el autor de cada técnica ha comprobado a fondo las operaciones esenciales de su método. En este caso consideramos que la modificación a la técnica histológica que hemos hecho realmente no es superflua, si se considera además que las modificaciones y/o mejoras a la técnica generalmente han involucrado cambios en los fijadores empleados, tiempos de fijación, o el uso de sales, pero no el de un líquido intermedio.

Se corrobora que el xilol es una buena opción, pero podemos considerar que el alcohol amílico también lo es, pues se observan menos daños cualitativos y cuantitativos, pues para el xilol el tiempo óptimo en el líquido intermedio para los órganos huecos utilizados se encuentra en un rango de 30 y 60 minutos en xilol, ya que a los 120 y 2880 minutos (48 hrs.) le dan al órgano una contracción en promedio hasta del 35% y un 40% respectivamente. Para el OH amílico el mejor tiempo fue 120 minutos para útero, mientras que para intestino, el tiempo óptimo con OH amílico se encuentra en un rango entre los 120 y 2880 minutos (Tabla 2, Gráfica 2) y el cual no presenta ningún encogimiento al paso del tiempo. Cabe mencionar que a los 30 y 60 minutos el encogimiento es mínimo (20%) por lo que también este tiempo puede ser considerado como óptimo. Esto implica que el OH amílico presenta mayor rango en cuanto a tiempo para los órganos huecos.

El tiempo óptimo en el caso del xilol, para los órganos parenquimatosos utilizados, se encuentra entre los 30 y 60 minutos, ya que en los tiempos como 120 y 2880 minutos el grado de encogimiento es hasta de un 40%. El alcohol amílico para este tipo de tejido no altera la estructura tisular, de hecho el cambio de longitud que se presenta es desde la deshidratación; que además para el caso del xilol se acumula por el efecto producido por esta.

El órgano que mayor afinidad ofrece a la técnica histológica modificada por el alcohol amílico y a la tinción empleada, es el Riñón, por lo que su diferenciación resulta de utilidad práctica para fines diagnósticos.

Por lo tanto la importancia en la utilización del OH amílico como una alternativa en la técnica histológica, radica en las pocas o nulas alteraciones que provoca en los órganos, tanto en aquellos considerados huecos (intestino y útero) como en los parenquimatosos (hígado y ovario).

CONCLUSIONES

1. La deshidratación por alcoholes produce por sí misma cambios en la longitud de los órganos.
2. El tiempo óptimo para permanecer en el líquido intermedio en el caso de xilol para órganos huecos utilizados está en un rango entre los 30 y 60 minutos. Mientras que para permanecer en el OH amílico fue de 120 para el útero y para intestino desde los 120 y los 2880 minutos (48 hrs.).
3. Para los órganos parenquimatosos el tiempo óptimo para permanecer en xilol es de 60 minutos, ya que a mayor tiempo se produce un encogimiento hasta de un 40%.
4. El alcohol amílico en órganos parenquimatosos no produce cambios drásticos en la longitud del órgano; el cambio máximo de longitud es de 20%.
5. El xilol no interfiere con la afinidad tintórea de los tejidos, por el contrario el alcohol amílico sí, principalmente en músculo, debido a que el alcohol amílico al igual que la eosina tiene un pH ácido.
6. La pérdida de la afinidad tintórea de aquellos órganos tratados con alcohol amílico a los 120 y 2880 minutos es reversible al aumentar mayor tiempo en el colorante ácido (eosina).
7. El hígado y el riñón son los órganos que mejor reaccionan al tratamiento con alcohol amílico donde pueden permanecer en el hasta 48 horas sin sufrir ninguna alteración, e inclusive para este caso no se afecta la afinidad tintórea.

APÉNDICE

1.- SOLUCIÓN SALINA

Cloruro de sodio ----- 9 gr.
Agua corriente ----- 1000 ml

2.- FORMOL AL 10%

Formaldehído ----- 100 ml
Agua corriente ----- 900 ml

3.- RUYTER

Albúmina ----- 20 gotas.
Acetona ----- 20 ml
Benzoato de metilo ----- 10 gotas.
H₂O ----- 80 ml

Solución A: Mezclar H₂O y albúmina.

Solución B: Mezclar acetona y benzoato de metilo.

Mezclar soluciones A y B, filtrar y guardar en refrigeración.

Albúmina glicerinada : Clara de huevo-glicerina Vol/Vol.

4.- ALCOHOL ÁCIDO

Alcohol 70% ----- 1 lt.
HCL concentrado ----- 10 ml.

5.- AGUA AMONIACAL

Hidróxido de amonio ----- 2-3 ml.
Agua corriente ----- 1 lt.

6.- TÉCNICA HISTOLÓGICA

PROCEDIMIENTO	TIEMPO
Obtención de la muestra	
Fijación con formol al 10%	24 horas
Deshidratación con OH etílico al:	
• 70%	1 hora
• 80%	1 hora
• 90%	1 hora
• 96%	1 hora
• 100%	1 hora
Aclaramiento y conservación	
• Xilol	1 hora
Inclusión:	
• Parafina I	2 horas
• Parafina II	2 horas
• Paraplast	
Corte	
Tinción H-E	
Montaje	

7.- MODIFICACIONES A LA TÉCNICA HISTOLÓGICA

PROCEDIMIENTO	TIEMPO
Obtención de la muestra	
Fijación con formol al 10%	24 horas
Deshidratación con OH etílico al:	
• 70%	1 hora
• 80%	1 hora
• 90%	1 hora
• 96%	1 hora
• 100%	1 hora
Aclaramiento y conservación	
• OH amílico	30, 60, 120 y 2880 minutos
Inclusión:	
• Parafina I	2 horas
• Parafina II	2 horas
• Paraplast	
Corte	
Tinción H-E	
Montaje	

8.- TÉCNICA DE TINCIÓN EMPLEADA:

Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Alcohol 100%	3 minutos
Alcohol 96%	1 minuto
Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Alcohol 70%	1 minuto
Agua	P. R.
Hematoxilina	7 minutos
Agua	P. R.
Alcohol ácido	P. R.
Agua	P. R.
Agua amoniacal	P. R.
Agua	P. R.
Eosina	5 minutos
Alcohol 70%	1 minuto
Alcohol 80%	1 minuto
Alcohol 90%	1 minuto
Alcohol 96%	1 minuto
Alcohol 100%	3 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos

(Verdín, 1999).

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- Arriaga, F. S. (1987). Evaluación de algunas técnicas de Tinción y montaje permanente de nemátodos fitoparásitos y de vida libre. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Badillo A. M. (1997). Algunos aspectos de la Biología de *Gobionellus hastatus* (familia Gobiidae) en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U. N. A. M Campus Iztacala. México.
- Banks C. W. (1986). Histología veterinaria aplicada. 4ta edición. Ed. El manual moderno, S. A. de C. V. México.
- Barragán G. C. (1998). Análisis celular ovárico del pez vivíparo *Poecilia sphenops* en estado de madurez gonádica. Tesis de Licenciatura. U. N. A. M Campus Iztacala. México.
- Bautista L. T. (1998). Descripción macroscópica e histológica de las gónadas de *Anchoa mitchilli* (Siscea: Engraulidea). Tesis de Licenciatura. U. N. A. M Campus Iztacala. México.
- Campbell R. C. (1996). Statics for biologists. Third edition. Ed. Cambridge University Press. Great Britain.
- Comarck H. David. (1988). Histología de Ham. Novena edición. Ed. Harla, S. A. de C. V. México.
- Conn, H. J. (1961). Biological Stains. Seventh Edition. The Williams Wilkins Company. USA.
- Cortés M. S. (1998). Algunos aspectos reproductivos de la biología de *Gobiodes broussoneti* (Pisces, Gobiidae) en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Chávez M. M. (1998). Estudio de linfocitos B y células plasmáticas de intestino delgado y grueso en ratones inmunizados con *Entamoeba histolytica* y toxina de cólera. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Craigmyle M. B. L. (1975). Atlas a color de histología. 1era edición. Ed. G. Barry Carruthers Md. England.
- Drury, R. A. B. *et al.* (1980). Carleton's Histological Technique. Fifth Edition. Oxford University Press. Great Britain.

- Estrada F. E., Peralta Z. L. (1982). Manual de técnicas histológicas. 1era edición. Ed. AGT editor S.A. México.
- Gallardo T. A. (1996). Algunos aspectos de la Biología de *Opsanus beta Goodey Bean* (Osteichthyes Batrachoididae) en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Gaviño, Gonzalo *et al.* (1975). Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo. Ed. Limusa. México.
- Gómez Clavel F. Leticia Verdín T. Alcohol amílico como aclarante en la Técnica Histológica. XV Coloquio Interno de Investigación ENEPI-UNAM. Noviembre de 1995. México.
- Ham, W. A. (1967). Histología. 5ta. Edición. Ed. Interamericana, S.A. México.
- Ham, W. A. (1984). Tratado de histología. 8ª Edición. Ed. Interamericana, S.A. México.
- Hernández S. R. (1997). Descripción macro y microscópica de las gónadas de *Gobiomorus dormitor* del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Kenneth P., Declan L. *et. al.* (1987). Fixation, Processing, and Immunohistochemical Reagent Effects on Preservation of T-Lymphocyte Surface Membrane Antigens in Paraffin-embedded Tissue. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 35 (11),1329-1338.
- Kiernan J. A. (1990). Histological & Histochemical methods. Theory and practice. 2da. Ed. Pergamon Press. USA.
- Kirk R. E. and Otemer D. (1998). Enciclopedia de tecnología química. Tomo I. Ed. Ulrich Tipográfica Editorial Hispano Americana UTEHA. México.
- Lee G. L. (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed forces Institute of Pathology. 3era edición. Ed. McGraw-Hill book company. USA.
- Lesson S. T. (1985). Histología. 4ta edición. Ed. Interamericana. México.

- Manes M. E. and Nieto O. L. (1983). A Fast and Reliable Celloidin-Paraffin Embedding Technique for Yolked Amphibian Embryos. *Mikroskopie (Wien)* 40, 341-343.
- Martínez E. A., Mosqueda T. A. (1981). Manual de procedimientos del laboratorio de histopatología. 1era. Edición. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. México.
- Martoja R. (1970). Técnicas de histología animal. 1era edición. Ed. Toray-Masson, S. A. España.
- Méndez Chávez E. (1998). Contribución al conocimiento de la biología del pez sol *Achirus lineatus* (Suicidae) de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Milton J. S. (1994). Estadística para biología y de la salud. 2nda edición. Ed. Mc Graw-Hill Internacional. España.
- Miranda M. M. (1997). Estudio de algunos aspectos reproductivos de *Oostethus lineatus* en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Morrison T., Boyd N. (1987). Morrison & Boyd Química orgánica. 5ta edición. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana. Londres.
- Muñoz Rodríguez Elizabeth. (1998). Descripción histológica de las gónadas de *Mugil curema* (Valenciennes) del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Nettleton G. S. and McAuliffe W. G. (1986). A Histological Comparison of Phase-Partition Fixation with Fixation in Aqueous Solution. *The journal of Histochemistry and Cytochemistry*.
- Núñez G. D. (1999). Análisis comparativo de dos especies de la familia Ariidae: *Bagre marinus* y *Arius melanopus* en el sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Pérez Carlos. (1999). Aspectos comparativos entre las dos especies de peces planos *Citharicthys spilopterus* y *Achirus lineatus*, típicas del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Rakoff, Henry *et al.* (1974). Química Orgánica Fundamental. Ed. Limusa. México.

- Sheenan, Dezna C. *et al.* (1980). Theory and practice of histotechnology. 2da edición. Ed. Mosby Company. USA.
- Trejo S. M. (1996). Descripción histológica de las gónadas de *Citharichthys spilopterus* del sistema estuarino de Tecolutla, Veracruz. Tesis de Licenciatura. U.N.A.M Campus Iztacala. México.
- Verdín Terán L. (1999). Comunicación personal. Laboratorio de Histología. Unidad de Morfofisiología y Función. U.N.A.M. Campus Iztacala. México.
- Verdín Terán L. (1999). Distribución histológica de la peroxidasa y población de eosinófilos en la rata durante el periodo de preimplantación. Tesis de Maestría. UNAM, Campus Iztacala. México.
- William T. B. And Gross M. (1993). A Histological Processing Technique that Preserves the Integrity of Calcified Tissues (bone, Enamel), Yolk Amphibian Embryos, and Growth Factor Antigens in Skeletal Tissue. The journal of Histochemistry and Cytochemistry. 41 (9), 1429-1434.
- Windholz M., Budovary S. (1976). The merck index, an encyclopedia of chemicals and drugs. Ninth edition. Ed. Merck & CO., INC. Rahway, USA.