



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“ELABORACIÓN DE UNA COLECCIÓN DE
PREPARACIONES HISTOLÓGICAS CON CORTES
SEMIFINOS INCLUIDOS EN RESINA SINTÉTICA PARA
EL LABORATORIO DE LA ASIGNATURA DE CITOLOGÍA,
EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA EN LA FACULTAD DE
ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN. UNAM”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

TERESA CORTÉS ORTIZ

ASESOR: M.V.Z. GERMÁN ISAURO GARRIDO FARIÑA

COASESORA: M. EN C. CAROLINA PIÑA VÁZQUEZ.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

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



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

"Elaboración de una colección de preparaciones histológicas con cortes semifinos incluidos en resina sintética para el laboratorio de la asignatura de Citología, Embriología e Histología en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM"

que presenta la pasante: Teresa Cortés Ortiz

con número de cuenta: 09755428-4 para obtener el título de Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido 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, Méx. a 26 de febrero de 2004

PRESIDENTE MVZ. José Alberto Chávez Enriquez

VOCAL M. en C. Miguel Angel Cornejo Cortés

SECRETARIO MVZ. Germán Isaura Garrido Fariña

PRIMER SUPLENTE MVZ. Alejandro Sánchez Pacheco

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Hugo Ramírez Alvarez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Josefina y Rodolfo y a mi hermana María José "Motita" por todo el apoyo brindado, no solo durante la carrera, si no a través de toda mi vida.

A Germán, por tu amistad, apoyo, amor y entrega, ya que eres parte de este trabajo y de mi vida.

A mi hijo Germán esperando que este trabajo sea un ejemplo a seguir.

A mis hijos de cuatro patas por todo su amor y paciencia.

A todos y cada uno de mis amigos, profesores y animales que aportaron conocimientos para mi formación.

ÍNDICE

I	Índice.....	2
II	Resumen.....	3
III	Objetivos.....	4
IV	Introducción.....	5
	Justificación.....	5
	Clasificación de los colorantes.....	6
	Según su origen.....	6
	Según su pH.....	8
	Azul de Toluidina.....	9
	Medios de inclusión.....	11
	Monómero de Metacrilato.....	12
	Metacrilato soluble en agua.....	13
	Resinas Poliéster.....	14
	Resinas Epóxicas.....	14
	Resinas Epóxicas solubles en agua.....	16
	Araldita.....	16
V	Material y metodología.....	17
	Material biológico	17
	Material de laboratorio.....	17
	Reactivos.....	17
	Equipo	18
	Metodología.....	19
VI	Manual de apoyo e imágenes.....	24
	Muestra histológica de cortes semifinos	38
VII	Conclusiones.....	45
VIII	Bibliografía.....	46

RESUMEN

La observación de preparaciones histológicas para el microscopio de campo claro en el laboratorio es un requerimiento esencial para entender algunos de los aspectos más importantes tratados en la asignatura de Citología, Embriología e Histología.

Aún cuando se puede obtener una buena calidad en preparaciones permanentes, procesadas por el método de rutina en parafina, los cortes semifinos en resinas sintéticas ofrecen una percepción diferente al alumno, principalmente de tejidos y células, ya que los artefactos debidos a las técnicas de fijación, inclusión y corte son reducidos al mínimo o son casi inexistentes. El objetivo de este trabajo fue crear una colección de este tipo, para ofrecer tanto al alumno como al docente un elemento más para complementar el proceso enseñanza-aprendizaje de la asignatura. Para ello se utilizaron ratones machos y hembras de 21 días de edad, cepa NMR-I, los cuales fueron llevados a plano quirúrgico con hidrato de cloral y perfundidos de rutina con una solución de paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos, posteriormente se disecaron y postfijaron tanto órganos como tejidos para obtener muestras de 5 mm cúbicos, se redujeron al tamaño de entre 1 y 2 mm para ser procesados mediante inclusión en araldita 502 de rutina y cortados con cuchillas de vidrio a 1 micrómetro de espesor para finalmente ser montados en portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina-bórax; para hacer las laminillas permanentes se cubrieron con barniz poliéster y cubreobjetos, finalmente se tomaron las foto micrografías empleando un microscopio Olympus, provisto de una cámara digital de alta definición, estos a su vez conectados a una computadora para obtener y almacenar las imágenes de los campos seleccionados.

OBJETIVOS

- Conformar una colección de cortes semifinos de 1 micrómetros (μm) de grosor teñidos con azul de toluidina, con tejidos y células representativas del ratón *Mus musculus*, con la finalidad de brindar tanto al alumno como al docente un elemento más para complementar el proceso enseñanza-aprendizaje de las prácticas correspondientes a citología de la asignatura.
- Realizar una revisión bibliográfica actualizada de las técnicas de tinción y protocolos de aplicación para cortes semifinos.
- Presentar la información relacionada con cada laminilla en forma de atlas.
- Colaborar con la implementación de herramientas de aprendizaje para los laboratorios de ciencias biológicas.

INTRODUCCIÓN

JUSTIFICACIÓN

La observación de preparaciones histológicas para el microscopio de campo claro en el laboratorio sigue siendo hoy en día un requerimiento esencial para entender algunos de los aspectos más importantes tratados en la asignatura de Citología, Embriología e Histología (Tolosa, 1984; Cormack, 1988; Wrobel, 1988; Fawcett, 1989; Bacha, 1990; Dellman, 1993; Banks, 1996 y Alberts, 2002).

Aún cuando se puede obtener una buena calidad en preparaciones permanentes procesadas por el método de rutina en parafina, los cortes semifinos en resinas sintéticas ofrecen una percepción diferente para el alumno, principalmente en lo que respecta a los tejidos y células, ya que los artefactos debidos a las técnicas de fijación, inclusión y corte son reducidos al mínimo o son casi inexistentes (Drury, 1967 y Glauert, 1991-A).

De este modo se puede ofrecer una herramienta, solo superada por la microscopía electrónica, para observar las características morfológicas de las células en forma individualizada y la relación que guardan dentro del tejido.

CLASIFICACIÓN DE COLORANTES

Los colorantes empleados en ciencias biológicas, se han clasificado arbitrariamente de muchas formas.

Según su origen:

La primera de ellas, por su origen, es la más común; compuestos colorantes naturales y sintéticos; de los colorantes naturales el más empleado, incluso más que algún colorante sintético, es la hematoxilina, la cual puede colorear o hacer aparente casi cualquier estructura dentro de tejidos animales o vegetales (Ramón y Cajal, 1948; Conn, 1971-A; Lillie, 1976; Estrada, 1982; Garrido, 1998 y Garrido y Col. 2002).

Los colorantes naturales pueden tener dos orígenes: 1) animal, como el carmín de la cochinilla del nopal 2) vegetal, como la safranina y hematoxilina (Garrido y Col. 2002).

Por otro lado, los colorantes sintéticos son los de origen mineral, que abarcan una gama muy amplia, conteniendo casi cualquier color del espectro visible, con un sinnúmero de usos (Garrido y Col. 2002).

A excepción de algunos compuestos inorgánicos usados en procesos especiales, todos los colorantes empleados en ciencias biológicas son químicos orgánicos sintéticos. Los colorantes sintéticos se clasifican de acuerdo a sus características químicas estructurales y por el método de aplicación. El primero es el grupo de colorantes directos, los que al aplicarse en solución directamente producen colores visibles en la

muestra. En el segundo se encuentran los colorantes indirectos, los que se aplican después de que la muestra ha sido tratada con algún mordente, de este modo el cromógeno se puede mantener en la muestra. El tercer grupo de esta clasificación son los colorantes que requieren de revelado, son compuestos parecidos a los colorantes directos pero requieren de una reacción química para modificar su estructura, esto es, el grupo radical auxócromo debe ser modificado para poder producir un color visible, en este grupo se encuentran los colorantes metacromáticos, los cuales requieren de la unión del auxócromo o cromógeno con una molécula particular del tejido, modificándose así, el color del espectro cuando la luz incide en la preparación. El cuarto y último grupo es el de los colorantes dispersos o de dispersión, los que se caracterizan por ser suspensiones coloidales con partículas muy pequeñas, en soluciones alcalinas que se unen al tejido por adsorción, esta promovida por un cambio de pH en la solución impregnadora (Garrido y Col. 2002).

En 1956 fue introducido el concepto de colorantes reactivos, esto quiere decir, que mientras mezclas de colorantes formaban puentes que podían perderse por la exposición a la luz o degradación química, los reactivos colorantes con grado reactivo o Q.P., forman puentes estables que provocan una duración y homogeneidad superior en las técnicas de coloración (Garrido y Col. 2002).

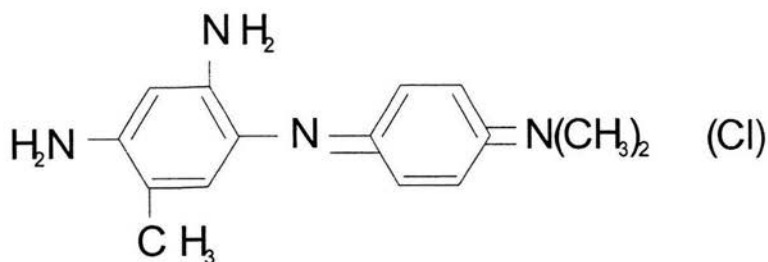
Según su pH:

La siguiente clasificación se basa en el pH de un compuesto, ya sea en estado sólido o en solución.

Existen colorantes ácidos, estos contienen grupos radicales que por sus características químicas confieren un mayor o menor grado de acidez a la molécula del compuesto en total, por ejemplo: Grupos sulfonio y carboxil (Ramón y Cajal, 1955; Luna, 1968; Martoja, 1970; Conn, 1971 y Garrido y Col. 2002).

Los colorantes básicos contienen grupos amino, que con la adición de un ácido orgánico forman una sal, y los colorantes neutro e indiferentes, que por tener la misma cantidad de grupos radicales ácidos y básicos se mantienen en un rango de pH cercano a 7 (Garrido y Col. 2002).

Azul de toluidina O



Azul de toluidina.

Sinonimias: Azul de metileno T 50 o T-extra, cloruro de Tolonium, cloruro de bluteno

Coulor Index: 52040

Fórmula: C-15, H-16, N-3, Cl

Colorante: Básico, directo y metacromático

Peso molecular: 305.832 umas

Solubilidad: Agua 3.82%, alcohol 0.57%, celosolve 3.5%, glicol 55%

Absorbancia: 620 – 638 nm (Garrido y Col. 2002).

Este colorante tiene varias aplicaciones:

Es un colorante nuclear para gránulos cromofílicos o metacromáticos, en la coloración pancromática de Pappenheim, es uno de los reactivos de elección para metacromasia de células cebadas, cartilago y ciertas mucinas ácidas, en la coloración para difteria de Albert puede remplazar al azul de metileno, para sustancia cromidal (gránulos de

Nissl), es un reactivo químico en la estandarización de heparina e histoquímico en determinaciones de ADN, forma parte en la mezcla para la coloración de sangre de Dominici, en plantas para coloración vital de vacuolas, protoplasma y paredes no lignificadas, tiene ortocromasia debajo de pH 3 y metacromasia por arriba de este punto (Conn, 1971; Estrada, 1982; Hyatt, 1989; De Lara, 1993; Dellman, 1993 y Gaete, 1994).

Las técnicas más recomendadas son las siguientes: como contraste en los métodos para retículo endoplásmico de Maresch; en la coloración de Nissl; para embriones completos en adición de alizarina; materiales metacromáticos entre ellos células metacromáticas de islotes pancreáticos, animales y plantas embebidas en resinas sintéticas; contraste en la coloración de Albert para microorganismos de difteria; coloración de Volutina de Kinyoun; para micoplasma de Dienes y coloración vital de protozoarios de Kirby (Conn, 1943-1944).

MEDIOS DE INCLUSIÓN

En los inicios de la histología en que se necesitó cortes muy finos, las ceras de parafina se probaron como medios de inclusión pero se encontró que eran muy suaves para permitir secciones más finas de un micrómetro. Subsecuentemente se probó con ceras mas duras y técnicas de doble inbibición sin una mejoría substancial (Wischnitzer, 1970).

El estadio final de la preparación de una muestra biológica para corte semifino requiere de la infiltración con un medio líquido que pueda polimerizarse para producir un bloque sólido (Wischnitzer, 1970; Bancroft, 1990 y Glauert, 1991-B).

En 1949, Newman creó el primer medio de inclusión especialmente diseñado para microscopia electrónica y fue el polibutylmetacrilato, aunque fue aceptado hasta 1960. Este medio de inclusión presentaba más desventajas que ventajas, los inconvenientes que esto representaba fueron aminorando conforme se introdujeron nuevas metodologías, entre otras cuchillas de vidrio, fijación controlada con tetraóxido de osmio y ultramicrotómicos más exactos (Glauert, 1991-B).

Conforme se avanzó en el establecimiento de una técnica de rutina para el procesamiento de muestras para microscopía electrónica, se fueron integrando un número cada vez mayor de reactivos, siendo de los más importantes los fijadores y los medios de inclusión.

Un medio de inclusión ideal debe tener las siguientes propiedades:

De fácil adquisición

Proporcionar uniformidad entre un lote y otro de muestras

Solubilidad en agentes deshidratantes

Baja viscosidad como monómero

Polimerización uniforme

Poco cambio en el volumen durante la polimerización

Facilitar el corte

Estabilidad en el haz de electrones

(Nunn, 1975 y Glauert, 1991-B).

Ningún medio de inclusión cumple con todos los requisitos antes mencionados para microscopía electrónica, pero si cumplen las necesidades mínimas para microscopía óptica. Hay tres tipos principales de medios de inclusión para propósitos generales: monómero de metacrilato y resinas solubles en agua; resinas poliéster y resinas epóxicas solubles en agua (Wischnitzer, 1970).

Monómero de Metacrilato

Actualmente son poco usados en microscopía electrónica con fines generales, esto se debe a los artefactos que provoca durante el procesamiento, encogimiento de aproximadamente 20% durante la polimerización, daño de polimerización el cual provoca artefactos a la pieza y su inestabilidad bajo el haz de electrones, lo que provoca evaporación y sublimación arriba del 50% del metacrilato bajo condiciones

normales de operación. Aunque todos estos problemas pueden disminuirse modificando los procesos la variabilidad en las condiciones finales de la muestra sigue siendo impredecible (Wischnitzer, 1970).

Metacrilatos solubles en agua

Estos se han usado principalmente para medios histoquímicos pensando en preservar mejor las estructuras que contienen lípidos y mantener la reactividad de enzimas, al mismo tiempo que la penetración sea más rápida y efectiva. Los metacrilatos solubles en agua son una combinación de un agente deshidratante y medio de inclusión, el primer medio soluble en agua fue compuesto en glicol metacrilato (GMA) propuesto por Rosenberg en 1960 y en 1965 propuesto como compuesto comercial hidroxipropil metacrilato (HPMA) era una alternativa, ambos compuestos polimerizan por irradiación de luz ultravioleta, estos metacrilatos permanecen líquidos a bajas temperaturas y pueden usarse para deshidratación e infiltración en frío (Glauert, 1991-B).

El GMA es un líquido claro, incoloro y de baja viscosidad, bloques puros de GMA son difíciles de cortar. El HPMA es similar en características y propiedades al GMA, no debe usarse hasta que este perfectamente mezclado con agua a razón de 4:1 a 20°C, su miscibilidad con agua se incrementa conforme la temperatura disminuye de 20°C y se polimeriza con la luz incluso en ausencia de catalizador (Glauert, 1991-B).

Resinas Poliéster

Estas resinas fueron introducidas por Kellenberger et al 1956, las características como medio de inclusión son similares a las resinas epóxicas aunque su uso no es tan común o extensivo porque no son de fácil adquisición y algunos de sus componentes son inestables durando pocos meses. El primer medio de inclusión de tipo poliéster fue Elvinox K3, el cual fue superado rápidamente por el Vestopal W, la mezcla de trabajo contiene peróxido de benzoilo como iniciador de la polimerización y nafteneto de cobalto como acelerador. Las resinas poliéster a diferencia de las epóxicas pueden polimerizar en presencia de luz ultravioleta, calor y oxígeno. Otras resinas poliéster son Rigolac 2004, Rigolas 70-F, Selectron, Rhodester y Bitlee y mezcla de Rigolac y Estireno (Glauert, 1991-B).

Resinas Epóxicas

Las resinas epóxicas son usadas como medios de inclusión de rutina en la mayoría de los laboratorios por la polimerización uniforme que ofrece, principalmente en la preparación de cortes ultrafinos para microscopía electrónica (Bancroft, 1990).

El tejido no está sujeto a daño por la polimerización, solo retrayéndose alrededor de 2% de su volumen. Adicionalmente los cortes obtenidos son estables en el haz de electrones, por lo que la tasa de sublimación es muy baja. Estas resinas son tan resistentes como para ser montadas en gradillas sin recubrimiento (Nunn, 1975; Karp, 1981; Bancroft, 1990 y Glauert, 1991-A).

Estas características mecánicas la hacen un candidato ideal para trabajar cortes semifinos de entre 800 y 1000 nm (Nunn, 1975 y Bancroft, 1990).

Estas resinas fueron probadas como medio de inclusión por Maaløe y Birch-Andersen 1956, Glauert et al 1956, en la búsqueda de una alternativa para los metacrilatos, su principal desventaja es su alta viscosidad, lo cual provoca infiltraciones más largas que los metacrilatos y resinas poliéster (Glauert, 1991-A).

Químicamente las resinas epóxicas son: Poliaril ester de glicerol con grupos epóxi terminales, su rango de líquido viscoso a sólido es polimerizado por una variedad de agentes bifuncionales que adicionan a través de los grupos epóxi de las moléculas de resina la estructura tridimensional, estos agentes son comúnmente poliaminas alifáticas o anhídridos aromáticos (Glauert, 1991-A).

Las resinas epóxicas para inclusión son una mezcla de: resina epóxica, endurecedor, acelerador y plastificante, esto provoca que las mezclas de los componentes en diferentes cantidades proporcionen diferente viscosidad final, y por consiguiente una velocidad de penetración diferente de acuerdo al tipo de tejido. Una vez que las resinas epóxicas han polimerizado son insolubles e inertes, lo que facilita la coloración del tejido posterior al corte (Bancroft, 1990).

Resinas epóxicas solubles en agua

La primera resina de este tipo es una fracción miscible con agua del Epon 812, denominada Acuon por Gibbons en 1959 y el Durcupan propuesta por Estäubli en 1960, estas resinas sin modificaciones son difíciles de cortar. Las resinas epóxicas solubles en agua se manejan del mismo modo y con las mismas precauciones que las resinas epóxicas (Wischnitzer, 1970 y Glauert, 1991-A).

Araldita

Esta resina fue desarrollada como un medio de imbibición por Glauert y Royers en 1956, la resina Araldita (CY 212) es usada en combinación con endurecedor anhídrido de ácido dodecnil succinico (DDSA) y un acelerador fenol tridimetilaminometil (DMP-30). La formulación propuesta por Glauert et al 1956 ha sido modificada muchas veces a través del tiempo, pero esas modificaciones son variantes de la mezcla original (Wischnitzer, 1970).

MATERIAL Y METODOLOGÍA

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron cuatro ratones clínicamente sanos, de la cepa NMR-I, dos machos y dos hembras de 45 días de edad

MATERIAL DE LABORATORIO

Vidriería general	Equipo de venoclisis
Fascos de suero	Equipo de disección
Porta objetos	Cuchillas de vidrio
Cubre objetos	Barras de vidrio estabilizadas con calor
Asa de cobre	Cápsulas de recubrimiento entérico
Agujas y jeringas	Fascos para liofilización (1, 5 y 10 ml)

REACTIVOS

Reactivo fijador de Sörensen	Oxido de propileno
Hidróxido de sodio	Araldita 512
Hidrato de cloral	Azul de Toluidina al 1%
Oxalato de sodio	Bórax al 1%
Solución salina	Fucshina ácida
Nitrito de sodio	Barniz poliéster
Alcohol etílico	Grenetina
Agua destilada	

EQUIPO

Ultramicrotomo Porter Bloom

Platina térmica

Microscopios: Tetraocular American Optical, Binocular American Optical, Múltiple

Olimpus

Cámara digital Sony de alta definición

Computadora con procesador de imágenes

Pinzas para hacer cuchillas de vidrio

Cortador de vidrio

Refrigerador

Estufa bacteriológica

Estufa para 60°C

METODOLOGÍA

Toma y procesamiento de muestras

Los pasos a seguir para el procesamiento de muestras en araldita 502 de rutina fueron:

- 1) Fijación del material biológico por el método de perfusión
- 2) Toma de las muestras
- 3) Postfijación de las muestras
- 4) Deshidratación
- 5) Infiltración
- 6) Inclusión
- 7) Corte y montaje
- 8) Coloración
- 9) Elaboración de preparados permanentes
- 10) Descripción y fotomicrografías de los cortes y zonas más representativas

1. FIJACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO POR EL MÉTODO DE PERFUSIÓN

Reactivo fijador de Sörensen (1962)

Se prepararon 520 ml de reactivo fijador:

500 ml de agua destilada

20 ml de solución acuosa al 4% de paraformaldehído

3.8 g de fosfato disódico

1.13 g de fosfato monosódico (Glauert, 1991).

Se mezclaron los componentes anteriores y se ajustó el pH a 7.3 con hidróxido de sodio 1N y se envasó en un frasco de suero, este se conservó a 4°C hasta su uso.

Para el presente trabajo se utilizaron 5 ml de oxalato de sodio al 2.5% como anticoagulante y 5 ml de nitrito de sodio al 3% como vasodilatador, los cuales fueron agregados a la solución fijadora ya preparada y envasada, este frasco se conectó al equipo de venoclisis doble para así del otro lado conectar al frasco de solución salina, y se calentaron en baño maría hasta alcanzar una temperatura de 35°C.

Fijación por el método de perfusión

La perfusión consiste en la fijación *in toto* de un animal o la fijación regional de un órgano o sistema, mediante la introducción de una mezcla fijadora al sistema vascular para de este modo irrigar y fijar todos los tejidos.

Este método se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. Anestesia de los ratón mediante el uso de cloroformo.
2. Se llevaron al plano quirúrgico inyectándoles una mezcla de 0.5 ml de hidrato de cloral al 5% intra peritoneal (I.P) como anestésico disociativo, 0.3 ml de oxalato de sodio al 2.5% como anticoagulante y 0.3 ml de nitrito de sodio al 3% como vasodilatador.

3. Posteriormente se hizo una incisión en la línea media, para así exponer el corazón y los demás órganos de las cavidades torácica y abdominal.
4. Se localizó el ventrículo izquierdo y se canalizó para introducir solución salina, mediante el equipo de venoclisis.
5. Después de medio minuto aproximadamente se hizo una incisión en el atrio derecho del corazón para permitir la salida de sangre y solución salina.
6. Se cerró el paso de la solución salina y se le abrió a la mezcla fijadora.
7. Una vez fijado el ratón se cerró el paso a la mezcla fijadora y se retiró el equipo de venoclisis para luego proceder a la toma de muestras.

2. TOMA DE MUESTRAS

Una vez terminada la perfusión se comenzó la toma de muestras con una medida de 3 mm cúbicos aproximadamente, mediante la disección de tejidos, órganos y sistemas incluyendo los siguientes: bazo, cerebelo, cerebro, ciego, corazón, estómago, glándula adrenal, hígado, hipófisis, hueso, intestino delgado, intestino grueso, lengua, médula espinal, músculo esquelético, nodo linfático, pabellón auricular, páncreas, piel, próstata, pulmón, riñón, tendón, uréter y útero.

3. POSFIJACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras obtenidas se postfijaron en la misma solución fijadora empleada para la perfusión, con una temperatura de 4°C y fueron reducidas a un tamaño de entre 1 y 2 mm.

4. DESHIDRATACIÓN

La deshidratación se llevó a cabo como sigue:

Deshidratación con alcohol etílico de grados ascendentes, desde 60%, 70%, 80%, 90%, 96% y alcohol absoluto dos 2 cambios cada uno de 15 minutos a 4° C

5. INFILTRACIÓN EN ARALDITA

La infiltración en araldita se realizó como sigue:

Oxido de propileno dos veces 15 min. cada uno a 4° C

Oxido de propileno-Araldita 2:1, 60 min a 4° C

Oxido de propileno-Araldita 1:2, 60 min. a 4° C

Resina de trabajo 12 horas a temperatura ambiente

6. INCLUSIÓN EN ARALDITA

Orientación de las muestras en cápsulas transparentes

Polimerización:

- 2 horas a 37° C
- 24 horas a 40° C
- 48 horas a 60° C

Araldita 512 mezcla de trabajo (Glauert et al, 1958)

Araldita 512	10 cc
DDSA	10 cc
DMP-30	0.5 cc

7. CORTE Y MONTAJE

Para el corte se empleó un ultramicrotomo marca Porter Bloom, empleando cuchillas de vidrio y realizando cortes de entre 800 y 1000 nm de grosor (1 micrómetro en promedio), estos cortes se recuperaron con asa de cobre, para finalmente ser fijados en portaobjetos de vidrio con grenetina sobre una platina térmica a 50°C.

8. COLORACIÓN

Técnica de azul de toluidina para cortes semifinos en resina.

Las muestras fijadas en el portaobjetos fueron teñidas sobre platina térmica a 50°C durante 5 min con solución acuosa de Azul de toluidina al 1% con 1% de bórax; se lavaron con agua destilada y se secaron en la platina térmica (Bancroft, 1990).

9. ELABORACIÓN DE PREPARADOS PERMANENTES

Las preparaciones se hicieron permanentes por medio de barniz poliéster y cubreobjetos de vidrio.

10. DESCRIPCIÓN Y FOTOMICROGRAFIAS DE LOS CORTES Y ZONAS MAS REPRESENTATIVAS

Se hizo la revisión de las laminillas en un microscopio tetraocular de la marca American Optical, para seleccionar las laminillas y posteriormente tomar las fotomicrografías empleando un microscopio Olympus, provisto de una cámara digital Sony de alta definición, estos a su vez conectados a una computadora para obtener y almacenar las imágenes de los campos seleccionados.

MANUAL DE APOYO E IMÁGENES

CITOLOGÍA

Objetivo: Capacitar al alumno para reconocer las diferentes formas celulares y las características del núcleo, tales como: forma, posición, número y concentración de cromatina.

MORFOLOGÍA CELULAR

Se consideran los siguientes elementos:

1) Forma de la célula

2) Características nucleares

- **Forma**
- **Número**
- **Posición**
- **Concentración de cromatina**

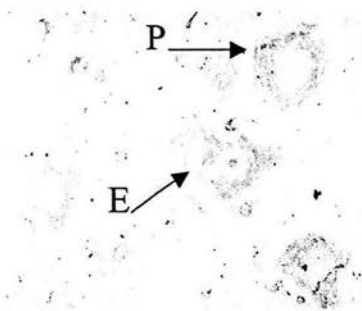
Práctica núm. 1
MORFOLOGÍA CELULAR I

Objetivo: Identificar células con morfología **piramidal, estrellada y escamosa**.

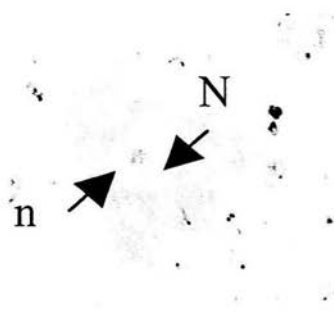
Laminilla No. 25-T MÉDULA ESPINAL. Coloración Azul de Toluidina.

Con el objetivo 10x enfoca el tejido, el cual corresponde a la sustancia gris de este órgano, en donde podrás observar las células con morfología **estrellada y/o piramidal**, llamadas **neuronas**, que son las de mayor tamaño; ahora obsérvalas a detalle con 40x y posteriormente a 100x para apreciar sus características nucleares:

- forma **esférica**
- número **mononucleada**
- posición **central**
- generalmente contiene **eucromatina**, por lo que es de **cara abierta**



F.1 Médula espinal vista en 40x, en la cual vemos células piramidales (P) y estrelladas (E).

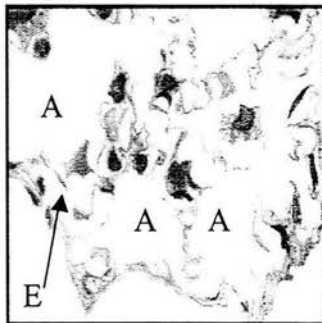


F.2 Célula estrellada, donde se observan sus características nucleares (N), así como su nucleolo (n) (100x).

Laminilla No.32-T PULMÓN. Coloración Azul de Toluidina.

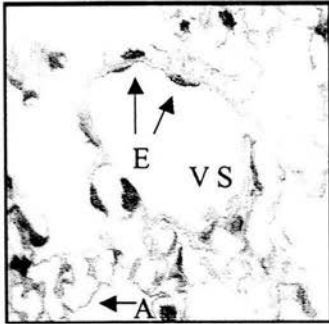
Con el objetivo 10x observarás el parénquima pulmonar formado por **alvéolos pulmonares**, vistos con el objetivo de 100x apreciarás que están constituidos por células de forma **escamosa**, cuyas características nucleares son las siguientes:

- forma **plana**
- número **mononucleada**
- posición **central**
- generalmente contiene **euromatina**, por lo que es de **cara abierta**.

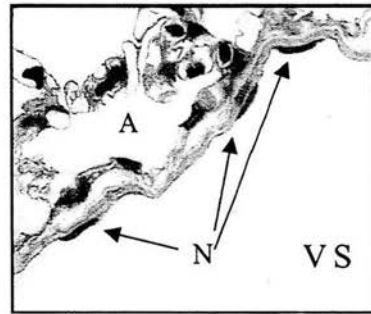


F.3 En esta imagen apreciamos los alvéolos pulmonares (A), que están formados por células escamosas (E) (40x).

Con el objetivo 10x, localiza las estructuras tubulares con músculo es su pared, las cuales pertenecen a **vasos sanguíneos** vistos en un corte transversal, con el objetivo de 100x notarás que en su interior éstos están revestidos por células de forma **escamosa** (endotelio), cuyas características nucleares son las mismas de la anterior.



F.4 Corte de pulmón donde observamos un vaso sanguíneo (V S), el cual esta revestido por células escamosa (E); (A) alveolo pulmonar (40x).

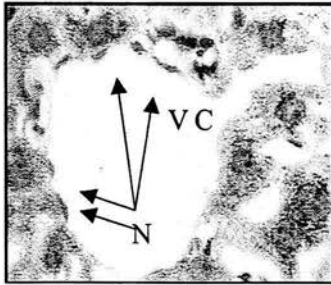


F.5 Vaso sanguíneo (V S) donde observamos los núcleos (N) aplanados de las células de morfología escamosa que forman el endotelio; (A) alveolo pulmonar (100x).

Laminilla No.17-T HÍGADO. Coloración Azul de Toluidina.

Al observar la laminilla a simple vista, se aprecian estructuras similares a hexágonos que corresponden a los **lobulillos hepáticos**, en el centro de estos encontrarás la vena central, si observas las células que revisten a esta estructura con el objetivo de 100x verás que son células **escamosas** cuyas características nucleares son las siguientes:

- forma **plana**
- número **mononucleada**
- posición **central**
- generalmente contiene **eucromatina**, por lo que es de **cara abierta**



F.6 Corte de hígado, en el cual observamos la vena central (V C), en cuyo endotelio apreciamos los núcleos (N) planos de sus células escamosas (40x).

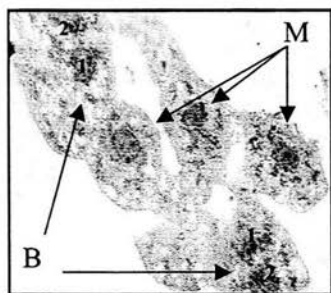
Práctica núm. 2
MORFOLOGÍA CELULAR II

Objetivo: Observar células **poliédricas, cuboides** y de **morfología variable**.

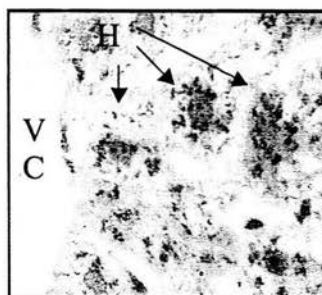
Laminilla No.17-T HÍGADO. Coloración Azul de Toluidina.

Al observar la laminilla a simple vista se aprecian estructuras similares a hexágonos, que corresponden a los **lobulillos hepáticos**, en el centro de estos encontrarás la vena central, hacia la cual convergen cordones o hileras de células con forma **poliédrica** (hepatocitos), si observas estas células con el objetivo de 100x verás que sus características nucleares son las siguientes:

- forma **esférica**
- número **mononucleada** o **binucleada**
- posición **central** si hay un núcleo, **paracentral** si hay dos
- generalmente contienen **euromatina**, por lo que son de **cara abierta**



F.7 Células poliédricas mononucleadas (M) y binucleadas (B) (100x).

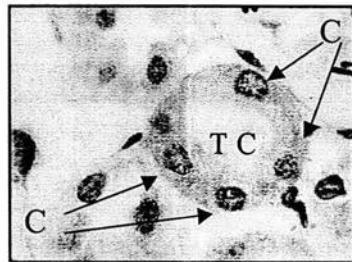


F.8 Vena central (V C), hacia la cual convergen radialmente los hepatocitos (H) (células poliédricas) (100x).

Laminilla No.77-T RIÑÓN. Coloración Azul de Toluidina.

En la corteza de este órgano distinguirás miles de estructuras circulares de las cuales muchas corresponden a los **túbulos contorneados proximales y distales** cortados de forma transversal, estos están formados por células de forma **cuboide**, las cuales tienen las siguientes características nucleares:

- forma **esférica**
- número **mononucleada**
- posición **central**
- generalmente contienen **euromatina**, por lo que son de **cara abierta**



F.9 Corteza de riñón donde apreciamos un túbulo contorneado (T C) formado por células cuboides (C)

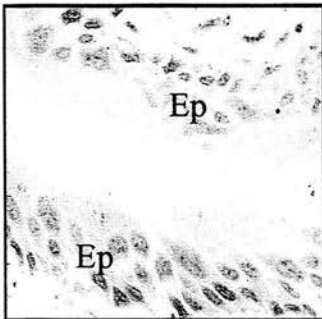
(100x).

Laminilla No.45-T VEJIGA. Coloración Azul de Toluidina.

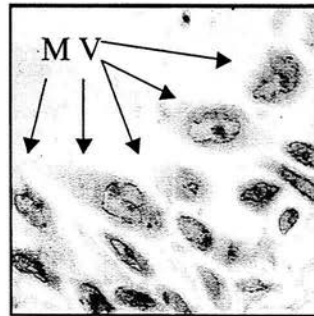
La vejiga es un órgano tubular, visto a 100x observamos que en su parte interna posee una capa (**epitelio**) formada por varios estratos celulares, estas células presentan una **morfología variable**, se dice que la morfología de estas células es variable debido a

que adoptan diferentes formas (desde escamosas hasta columnares), dependiendo del estado fisiológico en que se encuentre. Las características nucleares son:

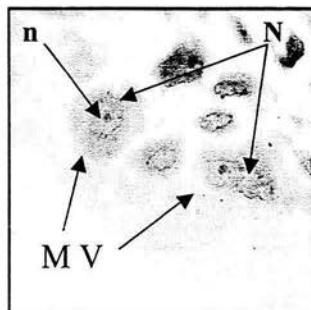
- forma **esférica**
- número **mononucleadas**, pero también pueden ser **binucleadas**
- posición **central** si hay un núcleo, **excéntricos** si hay dos
- generalmente contienen **eucromatina**, por lo que son de **cara abierta**



F.10 Corte de vejiga donde observamos su epitelio (Ep) formado por células de morfología variable (40x).



F.11 Mismas células de morfología variable (M V) apreciadas a 100x.



F.12 Células de morfología variable (MV), donde apreciamos sus núcleos (N) y nucleolos (n) (100x).

Práctica núm. 3
MORFOLOGIA CELULAR III

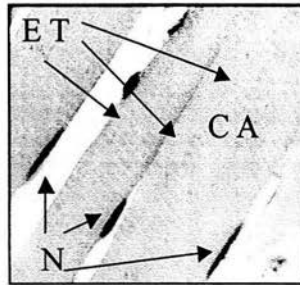
Objetivo: Identificar células **columnares alargadas** y **columnares alargadas ramificadas**.

Laminilla No.23-T LENGUA. Coloración Azul de Toluidina.

Al observar la laminilla a 10x notarás unas estructuras alargadas (corte longitudinal) las cuales corresponden a células **columnares alargadas**, al observarlas con más detalle notarás que tienen **estrías transversales** en su citoplasma y que sus características nucleares son las siguientes:

- forma **ovoide**
- número **multinucleadas**
- posición **periférica**
- generalmente contienen **eucromatina**, por lo que son de **cara abierta**

Debido a que en la lengua estas células se disponen en grupos orientados en diversas direcciones también podrás distinguir cortes transversales y oblicuos. El nombre específico de estas células es **miocito estriado esquelético**.



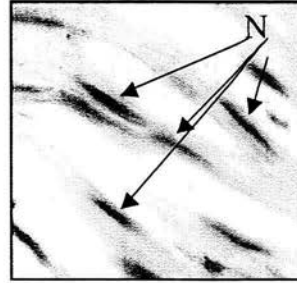
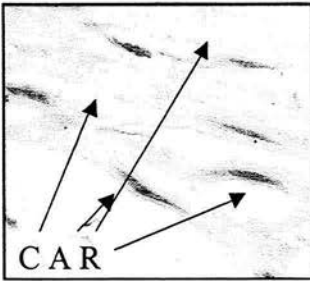
F.13 Células columnares alargadas (C A), donde apreciamos perfectamente sus estrías transversales (E T) del citoplasma y sus núcleos (N) en posición periférica (100x).

Laminilla No.9-T CORAZÓN. Coloración Azul de Toluidina.

El tejido que observas esta formado por células de morfología **columnar alargada ramificada**; al pasar al objetivo de 100x podrás apreciar que tienen **estrías transversales** en su citoplasma, las características nucleares son:

- forma **ovoide**
- número **mononucleadas o binucleadas**, ocasionalmente **trinucleadas**
- posición **central** si hay un núcleo, **excéntricos** si hay dos o más
- generalmente contienen **euromatina**, por lo que son de **cara abierta**

El nombre específico de estas células es **miocito estriado cardíaco**.



F.14 - 15 Células columnares alargadas ramificadas (C A R), en las cuales apreciamos sus núcleos (N) en posición excéntrica (100x).

Práctica núm. 4
MORFOLOGÍA CELULAR IV

Objetivo: Identificar células **columnares con microvellosidades, caliciformes y flageladas.**

Laminilla No.20-T INTESTINO DELGADO. Coloración Azul de Toluidina.

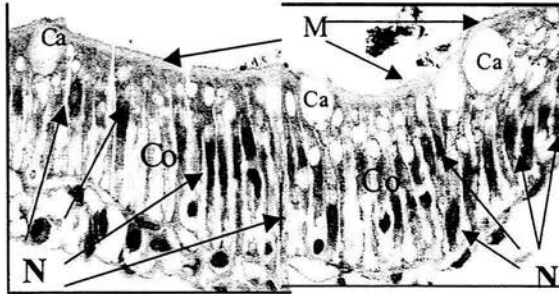
En este órgano tubular observamos la membrana más interna (epitelio de revestimiento) dos tipos de morfología celular, las primeras corresponde a **células columnares con microvellosidades** entre las cuales observamos a las **células caliciformes**, las cuales revisten el **borde luminal**.

Las células **columnares con microvellosidades** son las células teñidas de morado, cuyas características nucleares son:

- forma **ovoide**
- número **mononucleada**
- posición **basal, central y apical**
- generalmente contiene **euromatina**, por lo que es de **cara abierta**

Las características nucleares de las células **caliciformes** son:

- forma **piramidal u ovoide**
- número **mononucleada**
- posición **basal**
- generalmente contiene **euromatina**, por lo que es de **cara abierta**

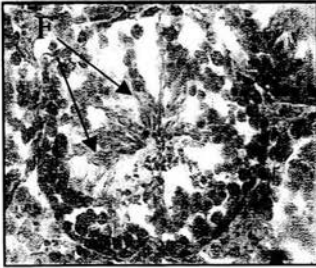


F.16 Corte de intestino delgado donde apreciamos células columnares (Co), sus núcleos (N) en diferentes posiciones y las microvellosidades (M), así como también las células caliciformes (Ca) de las cuales no observamos sus núcleos (100x).

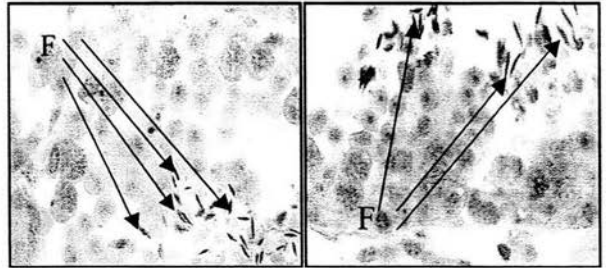
Laminilla No.86-T TESTICULO. Coloración Azul de Toluidina.

Al observar el testículo con el objetivo 10x, notarás la presencia de gran cantidad de estructuras tubulares que corresponden a los **túbulos seminífero contorneados**. En esta práctica te concretarás a observar las células localizadas en la parte interna de uno de los túbulos, así con el objetivo de 100x apreciarás unas células teñidas de color azul, las cuales corresponden a los **espermatozoides**, que son células **flageladas** cuyas características nucleares son:

- forma **ovoide**
- número **mononucleada**
- posición **central**
- generalmente contiene **heterocromatina**, por lo que es de **cara cerrada**



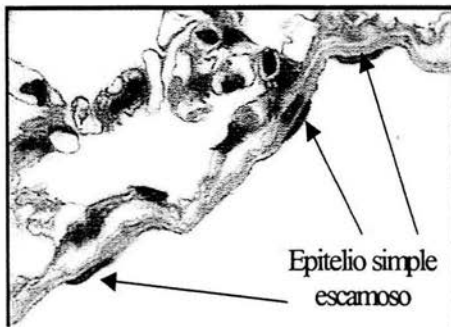
F.17 Túbulo seminífero contorneado, en el cual se aprecian células flageladas teñidas de color azul (40x).



F. 18-19 Células flageladas (F) vistas en 100x, donde apreciamos que el núcleo prácticamente ocupa todo el citoplasma de la células.

MUESTRA HISTOLÓGICA DE CORTES SEMIFINOS

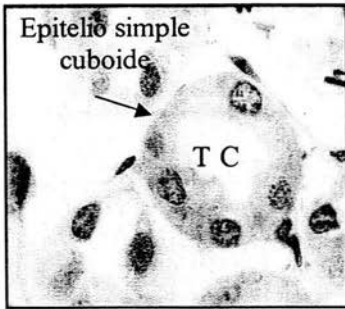
Al observar los cortes semifinos el alumno tendrá un panorama más amplio de las células y los tejidos, vistos por otra técnica, la cual es una excelente herramienta para complementar el estudio de la histología, así como también de diagnóstico ampliamente utilizada en patología humana.



F.1 Endotelio de vaso sanguíneo conformado por un epitelio simple escamoso. Coloración Azul de Toluidina (100x).

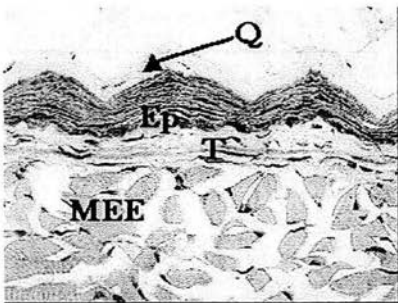
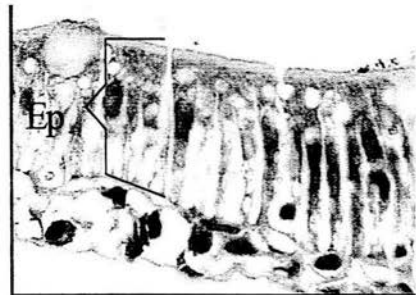
F.2 Alvéolos pulmonares (A) formados por un epitelio simple escamoso. Coloración Azul de Toluidina (100x).



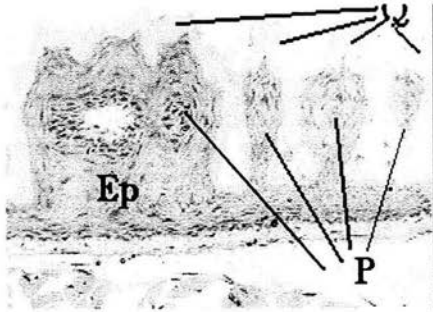


F.3 Túbulo contorneado (TC) formado por un epitelio simple cuboide. Coloración Azul de Toluidina (100x).

F.4 Corte de intestino delgado donde observamos un epitelio simple columnar con microvellosidades y exocinocitos caliciformes intercalados (Ep). Coloración Azul de Toluidina (100x).

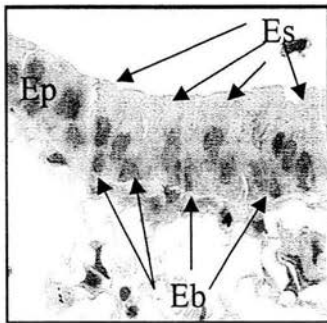
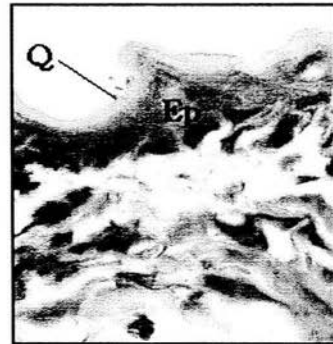


F.5 Corte de lengua, donde apreciamos la parte ventral formada por un epitelio estratificado escamoso cornificado (Ep), observe la queratina (Q) teñida de rosa pálido, la tela submucosa (T), constituida por tejido conectivo colágeno laxo y al tejido muscular estriado esquelético (MEE). Coloración Azul de Toluidina (40x).



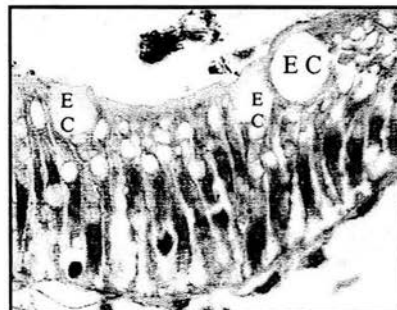
F.6 Cara dorsal de la lengua donde observamos el epitelio estratificado escamoso cornificado (Ep), así como las papilas linguales (P) y en el estrato más superficial se observa claramente la queratina (Q). Coloración Azul de Toluidina (40x).

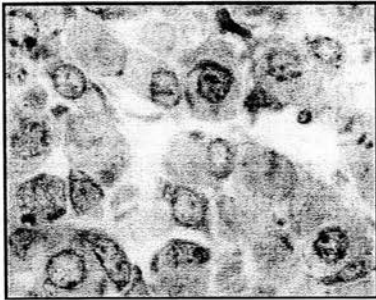
F.7 Corte de piel donde observamos el epitelio estratificado escamoso cornificado (Ep) y la queratina en el estrato más superficial que se observa de color azul claro (Q). Coloración Azul de Toluidina (40x).



F.8 Bronquiolo formado por un epitelio pseudoestratificado columnar (Ep), en el cual observamos células columnares llamadas epitelocitos superficiales (Es), y células de menor tamaño llamadas epitelocitos basales (Eb). Coloración Azul de Toluidina (100x).

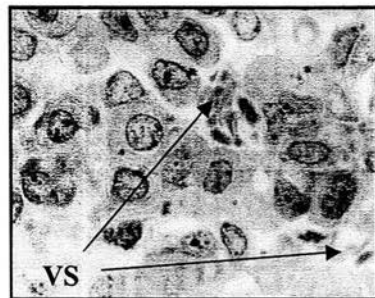
F.9 Exocrinocito caliciforme (E C), que corresponde a una glándula exócrina, unicelular e intraepitelial. Coloración Azul de Toluidina (100x).





F.10 Adenohipófisis porción distal, donde observamos a las células dispuestas en una forma cordonada. Coloración Azul de Toluidina (100x).

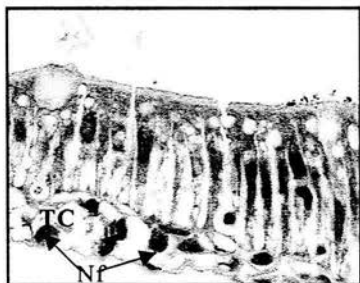
F.11 Adenohipófisis porción distal, donde observamos vasos sanguíneos (VS) y en su interior los eritrocitos tiñidos de color azul). Coloración Azul de Toluidina (100x).



F.12 Glándula adrenal a 10 x en donde se aprecian a cúmulos de células columnares de la zona glomerular (Z G), cordones celulares de las zonas fascicular (Z F) y zona reticular (ZR). Coloración Azul de Toluidina.

F.13 Glándula adrenal a 40x en donde se aprecian a cúmulos de células de la zona glomerular (Z G) y cordones celulares de la zona fascicular (ZF). Coloración Azul de Toluidina.





F.14 Corte de intestino donde observamos el tejido conectivo colágeno laxo (T C), formado por fibrocitos y fibroblastocitos, de los cuales de aprecian sus núcleos (Nf). Coloración Azul de Toluidina (100x).

F.15 Tendón compuesto por tejido conectivo colágeno compacto regular, donde apreciamos sus fibras colágenas (FC) de color rosa orientadas en haces en la misma dirección y tendinocitos (T) entre las fibras. Coloración Azul de Toluidina-Fucshina (10x).

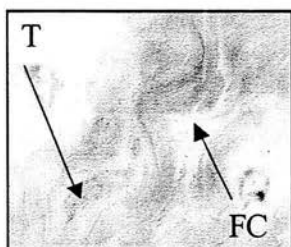
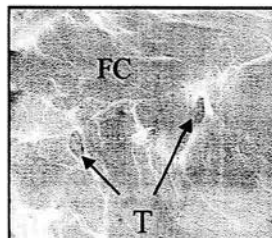
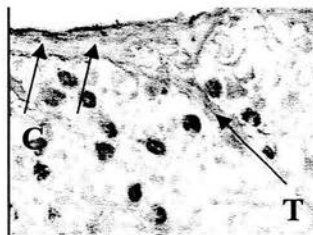
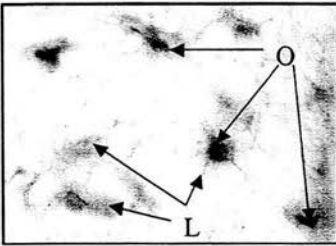


Fig 16 Tendón, fibras colágenas (FC) (color rosa) orientadas en haces en la misma dirección y tendinocitos (T) paralelos a las fibras. Coloración Azul de Toluidina-Fushina (40x).

F.17 Bazo, en el cual observamos su cápsula (C) y una travécula (T), ambas estructuras están constituidas por tejido conectivo colágeno compacto irregular. Coloración Azul de Toluidina (100x).

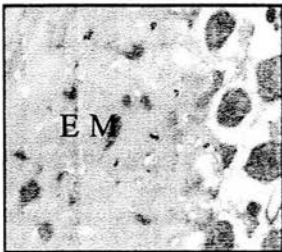
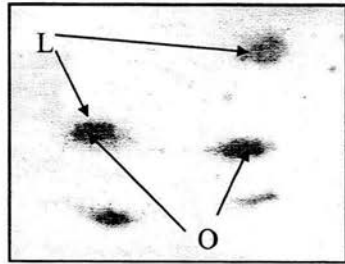


F.18 Corte de oreja, en donde observamos el cartílago elástico, el cual esta formado por la matriz cartilaginosa (M), lagunas cartilagosas (L) y en el borde del cartílago observamos el pericondrio (P). Coloración Azul de Toluidina (100x).



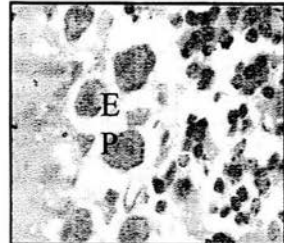
F.19 Hueso compacto, en el cual observamos lagunas óseas (L) y en su interior osteocitos (O). Coloración Azul de Toluidina (100x).

F.20 Hueso compacto, en el cual observamos lagunas óseas (L) y en su interior osteocitos (O). Coloración Azul de Toluidina (100x).

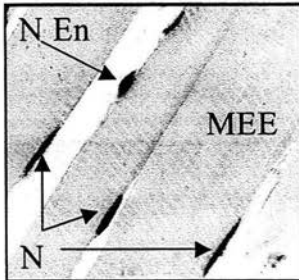


F.21 Corte de cerebelo donde apreciamos su estrato molecular (EM), siendo este el más externo. Coloración Azul de Toluidina (100x).

F.22 Corte de cerebelo donde apreciamos el estrato de células piriformes (EP), o estrato intermedio. Coloración Azul de Toluidina (100x).

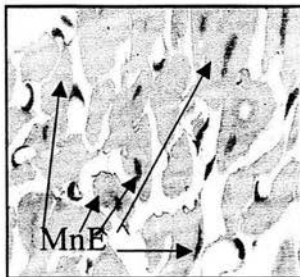
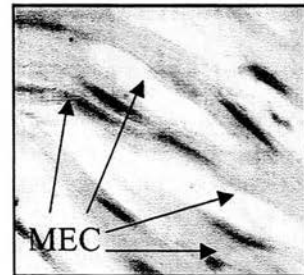


F.23 Corte de cerebelo donde apreciamos el estrato granuloso (EG), el cual es el más interno. Coloración Azul de Toluidina (100x).



F.24 Miocito estriado esquelético (MEE), visto en un corte longitudinal, núcleos de los miocitos (N), los cuales forman el tejido muscular estriado esquelético, además se aprecian los núcleos del tejido conectivo llamado "Endomisio" (N En).
Coloración Azul de Toluidina (100x).

F.25 Miocitos estriados cardiacos (MEC) vistos en un corte longitudinal, los cuales forman el tejido muscular estriado cardiaco.
Coloración Azul de Toluidina (100x).



F.26 Corte transversal de células fusiformes, las cuales reciben el nombre de miocitos no estriados (MnE), y constituyen el tejido muscular liso. Coloración Azul de Toluidina (100x).

CONCLUSIONES

Al elaborar el presente trabajo se encontró que esta técnica es excelente para fines docentes, de investigación y diagnóstico (Murielle et al, 2001; Biljana et al, 2000; Franzen et al, 1993), ya que nos permite observar con más detalle las células, tejidos, inclusiones y relaciones entre estos, dando como resultado un buen material para la descripción de la estructura fina necesaria para las prácticas de morfología celular, esto se debe a que esta técnica de trabajo tiene protocolos de fijación, inclusión y corte que permite obtener preparaciones de excelente calidad, en comparación con los obtenidos en parafina los cuales no permiten tener la claridad de las secciones en resinas con grosores entre 1 y 4 micrómetros. Otra ventaja de esta técnica es que todos los reactivos que se emplean para el procesamiento son de fácil adquisición y su costo no es mucho mayor que los empleados en la técnica de inclusión en parafina de rutina.

Quizá la única desventaja puede ser que las muestras al ser de un tamaño reducido no nos permite observar gran cantidad de tejido, pero si la ubicación y elección de la muestra son adecuadas lo anterior se puede disminuir al mínimo.

Por otro lado nos enfrentamos a la limitante de la tinción, ya que solo podemos utilizar Azul de Toluidina, Fucshina y Hematoxilina, para teñir estos corte, sin embargo estos cortes pueden ser usados para la detección de proteínas por medio de inmunohistoquímica, brindándonos mas precisión que mediante la utilización de cortes incluidos en parafina.

En la revisión bibliográfica que se llevo acabo para la elaboración de este trabajo no se encontraron bibliografias o sitios de red que hagan mención de colecciones para docencia o diagnóstico de cortes semifinos de ninguna especie.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts, B., Bray, D., Jhonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. "Molecular Biology of the Cell". Fourth ed., Garland Publishing, New York, 2002.
2. Bacha, J.W. Color atlas of veterinary histology. Lea y Febiger. London. 1990.
3. Bancroft, J.D., Stevens, A., Turner, D.; Theory and practice of histological Techniques: Churchill- Livingston; U.K.;1990.
4. Banks, W. J. Histología veterinaria aplicada. 2ª ed. El manual moderno. México 1996.
5. Biljana, S., Mirjana, O., Dušan, T., Drago, M., Vidosava, N., Peritoneal lining cell changes in end stage kidney disease UC 616.38 vol.7, no 1, 2000 pp. 97 –101
6. Conn H. J. ; Society of Dyers and Colourists; The color index; 3th edn; Bradford. The Society of Dyers and Colourists; 1971.
7. Conn, H. J. & Darow, M.A. Compilers & editors; Staining procedures used by the Biological Stain Commission; Biotech Publications; Geneva, N. Y. 1943-1944.
8. Cormack, D.H.: "Histología de Ham". 9ª ed. Edit. Interamericana. México, 1988 .
9. De Lara Galindo, S. Terminología morfológica internacional. Ed Harla. México. 1993.

10. Dellman, D. H. Text book of veterinary histology. 4th Lea & Febiger Philadelphia 1993.
11. Drury, R.A.B. y WALLINGTON, E.A. Carleton's histological technique. 4a. Ed. Oxford University Press. Reino Unido, 1967.
12. Estrada F., E. y col. Manual de técnicas histológicas. 1a. Ed. A.G.T. México, 1982.
13. Fawcett, D.W.: "Tratado de Histología". 11ª ed., Edit. Interamericana-mcgraw-Hill, México, 1989.
14. Franzen C, Fatkenheuer G, Salzberger B, Muller A, Mahrle G, Diehl V, Schrappe M; Intestinal microsporidiosis--also frequent in Germany? Dept. of Internal Medicine I, Univ. of Cologne, Germany. *Int Conf AIDS 1993 Jun 6-11;9:378*
15. Gaete, B. "Manual de técnicas histológicas para médicos veterinarios zootecnistas" tesis de licenciatura UNAM, 1994.
16. Garrido, F.G. Apuntes para el curso "Procedimientos básicos de histología". F.E.S. Cuautitlán, UNAM. México. 1998.
17. Garrido, F.G., Cornejo C.M., Jiménez, E. Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas. Editorial F.E.S. Cuautitlán, UNAM. México. 2002.
18. Glauert, A.,M.; Fixation, dehydration and embedding of biological specimens.; Practical methods in electron microscopy, Editor Glauert, A., M.; 8th reprint; North-Holland Pub. Co. Amsterdam Hol. 1991.
19. Glauert, A.M. "Epoxy resin: an update on their selection and use", *Microscopy and Analysis*, Sept. 1991.

20. Hyatt, M.A., Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications, 3rd Edition 1989.
21. Lillie, R. D; Fulmer, H. M.; Histopatologic technique and practical histochemistry; 4th edn; Mac Graw Hil; N. Y. 1976.
22. Luna, L.G. Editor; Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology; 3th edn; N.Y. 1968.
23. Martoja, R. y Martoja-Pierson, M. Técnicas de histología animal. 1a. Ed. Toray-Másnon. España, 1970.
24. Murielle Boisson, Véronique Gomord, Corinne Audran, Nathalie Berger, Bertrand Dubreucq, Fabienne Granier, Patrice Lerouge, Loïc Faye, Michel Caboche and Loïc Lepiniec Arabidopsis glucosidase I mutants reveal a critical role of N-glycan trimming in seed development The EMBO Journal, Vol. 20, No. 5 pp. 1010-1019, 2001
25. Nunn, R., E.; Microscopía electrónica; El manual Moderno; México; 1975.
26. Ramón y Cajal S. & Tello y Muñoz, J. Histología normal y de técnica micrográfica. Editorial Nacional 20^a edición. México. 1955.
27. Tolosa, S.J. y Ochoa, V. "Morfología Veterinaria". I. Citología y Embriología General. 1^a ed. , México, 1984.
28. Wischnitz, S. Introduction to electron microscopy. Pergamon Press Inc. 2nd ed.. New York USA. 1970.
29. Wrobel, K. H. Histology structure and function of domestic animals. 2nd edition Lea & Febiger Philadelphia. 1988.