

1936
1937
1938

11
Res.
11/12
5112



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

USO DE MICRONDAS EN LA FIJACION DE TEJIDOS
PARA MICROSCOPIA OPTICA E INMUNOHISTOQUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P r e s e n t a

BEATRIZ ARELLANO REYNOSO



Asesor: MVZ. MPhil. Germán Valero Elizondo

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

**USO DE MICROONDAS EN LA FIJACIÓN
DE TEJIDOS PARA MICROSCOPIA
ÓPTICA E INMUNOHISTOQUÍMICA**

tesis presentada ante la División de Estudios
Profesionales de la Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista
por

Beatriz Arellano Reynoso

Asesor: MVZ. MPhil. Germán Valero Elizondo.

México, D. F.

1995

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a Martín y Eduviges, porque ellos formaron a una mujer en mí.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las personas que colaboraron conmigo para realizar esta tesis, en especial al Dr. G. Valero por su paciencia como asesor.

A Carlos y a la señora Licha por su apoyo y ayuda en la preparación de este trabajo.

La inclusión de tejidos en parafina fue realizada por B. Zúñiga del CENID-MICROBIOLOGÍA.

Los cortes y la tinción de HE fueron realizados por G. Juárez de la F. M. V. Z.

Los ratones fueron proporcionados por E. Labrandero, del CENID-MICROBIOLOGÍA.

La cepa de virus rábico de desafío, los antisueros conjugados con fluoresceína y el microscopio de epifluorescencia fueron facilitados por el Dr. M. A. Cámara, del CENID- MICROBIOLOGÍA, quien además realizó las lecturas de inmunofluorescencia de rabia.

Los reactivos fueron proporcionados por la Dra. Carolina Ramírez, del proyecto de Tuberculosis bovina del CENID- MICROBIOLOGÍA.

Agradezco también a los Drs. R. Colín, J. Ramírez, J. Campuzano y E. Aburto, de la F. M. V. Z. así como a D. González, J. Monroy y F. Morales del CENID-MICROBIOLOGÍA, por la evaluación de laminillas de HE.

A R. M. Urrutia y al Dr. M. A. Luna del CENID- Microbiología, por las facilidades y reactivos proporcionados. Y al Dr. E. Díaz por su colaboración en la estadística del trabajo.

El Dr. D. González gentilmente permitió el empleo de la figura del sitio de inoculación en ratón, obtenido de su capítulo sobre diagnóstico de rabia del libro de diagnóstico veterinario.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN.....	2
HIPÓTESIS.....	2
OBJETIVO.....	2
MATERIAL Y MÉTODOS.....	3
EXPERIMENTO I: FIJACIÓN POR 24 HORAS.....	3
EXPERIMENTO II: FIJACIÓN POR CUATRO HORAS.....	4
EXPERIMENTO III: INMUNOFUORESCENCIA DE RABIA.....	6
RESULTADOS.....	11
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I.....	11
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II.....	12
RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III.....	13
DISCUSION	15
DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO I.....	15
DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO II.....	15
DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO III.....	16
DISCUSIÓN GENERAL.....	16
CONCLUSIONES.....	18
LITERATURA CITADA.....	19
APÉNDICE A. FOTOGRAFÍAS AL MICROSCOPIO.....	21
<i>FIGURA 1.1 Fotomicrografía de un hígado donde se observan algunas células vacuoladas.....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 1.2 Fotomicrografía de un riñón donde se observan glomérulos y túbulos renales bien conservados.....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 1.3 Fotomicrografía de un hígado donde se observan hepatocitos vacuolados e hinchados.....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 1.4 Fotomicrografía de un riñón donde se observan células de túbulos renales hinchadas, perdiéndose la luz.....</i>	<i>21</i>
<i>FIGURA 1.5 Fotomicrografía de un hígado donde se observa disociación de cordones hepáticos, células hinchadas y algunos núcleos picnóticos.....</i>	<i>22</i>

<i>FIGURA 1.6 Fotomicrografía de un riñón donde se observa ruptura de las células de algunos túbulos renales y citoplasma espumoso en otros.</i>	22
<i>FIGURA 1.7 Fotomicrografía de un hígado donde se observa desorden en los cordones hepáticos y hepatocitos hinchados con núcleos picnóticos.</i>	22
<i>FIGURA 1.8 Fotomicrografía de un riñón donde se observan las células de los túbulos renales hinchadas, perdiéndose la luz y una gran separación entre el ovillo glomerular y la cápsula glomerular.</i>	22
<i>FIGURA 2.1 Fotomicrografía de un hígado donde se observan zonas de hepatocitos vacuolados, hinchados; no se distingue la separación entre células.</i>	23
<i>FIGURA 2.2 Fotomicrografía de un hígado donde se observa vacuolización de hepatocitos.</i>	23
<i>FIGURA 2.3 Fotomicrografía de un hígado donde se observa buena conservación del detalle celular.</i>	23
<i>FIGURA 2.4 Fotomicrografía de un hígado donde se observa vacuolización, ruptura de hepatocitos y disociación de cordones hepáticos (autólisis).</i>	23
APÉNDICE B. CUESTIONARIO SUMINISTRADO A LOS PATÓLOGOS	24
APÉNDICE C. CUADROS CON RESULTADOS DE EVALUACIONES	25
CUADRO I: MEDIAS DE LAS LAMINILLAS DEL EXPERIMENTO I	25
CUADRO II: MEDIAS DE LAS LAMINILLAS DEL EXPERIMENTO II	25
CUADRO III: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO I	26
CUADRO IV: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO II	27
CUADRO V: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO III	28
APÉNDICE D. PUBLICACIONES RESULTADO DE ESTA TESIS	29

RESUMEN

ARELLANO REYNOSO, BEATRIZ. Uso del horno de microondas en la fijación de tejidos para histopatología e inmunohistoquímica (bajo la dirección de: Germán Valero Elizondo).

Es indispensable la buena fijación de las muestras en histopatología para obtener buenos cortes y observarlos al microscopio óptico. Recientemente se ha descrito el uso del horno de microondas en la fijación de tejidos, tanto para histopatología, citología, inmunohistoquímica y microscopía electrónica; obteniéndose una excelente imagen y reduciendo el tiempo de fijación. La hipótesis a probar fue que el empleo de un horno de microondas permite una fijación de tejidos tan buena como la convencional con aldehídos y que también se puede usar para demostrar antígenos por inmunohistoquímica de cortes incluidos en parafina. Para esto se realizaron tres experimentos: En el primero se utilizaron trozos de riñón e hígado de 2 mm de grosor de ratonas blancas destetadas de la cepa CD 1, que se fijaron bajo cuatro métodos utilizando formalina, radiación con microondas 8 segundos (s) y una combinación de ambos, todos por 24 horas (h). En el segundo experimento se utilizaron trozos de riñón de 2 mm de grosor de ratonas blancas destetadas de la cepa CD 1, que se agruparon en cinco métodos de fijación con formalina, microondas 12 s y una combinación de ambas a 4 y 24 h. En el experimento III se utilizaron los encéfalos de ratones con y sin rabia para fijarlos por los métodos descritos en el experimento II, se incluyeron en parafina y los cortes se tiñeron con la técnica de anticuerpos fluorescentes para rabia. En el experimento I, los mejores métodos de fijación fueron el convencional con formalina al 10% 24 h y utilizando formalina al 5% 4h con posterior irradiación 8 s. En el experimento II el tratamiento que resultó en mejor preservación del detalle celular fue el irradiar los tejidos por 12 s, seguido de la fijación convencional con formalina al 10% por 24 h. En cuanto al experimento III, se obtuvo una marcada disminución de la cantidad de la fluorescencia en todos los tratamientos, lo que dificultó su diagnóstico; sin embargo, el grupo que mostró más sensibilidad y especificidad fue el que no recibió ningún tratamiento de fijación. El empleo del horno de microondas en la fijación de tejidos para histopatología resultó en una buena preservación del detalle celular de los tejidos, sin embargo se debe experimentar más para usarlo en técnicas de inmunohistoquímica.

INTRODUCCIÓN

La apropiada fijación de las muestras es requisito indispensable para la obtención de buenas laminillas de histología ^{3, 11, 14, 17}. Convencionalmente se han utilizado aldehídos para la fijación de tejidos; formaldehído para histología y glutaraldehído para microscopía electrónica (ME) ¹⁷. El calentar las muestras durante el fijado acorta el tiempo necesario, pero a costa de pérdida del detalle celular ^{11, 17}. Recientemente se ha descrito el uso de hornos de microondas en la fijación de piezas, empleados por si solos ^{2, 9}, o en combinación con aldehídos ^{2, 9, 10, 12} tanto para histopatología, ME, citología e inmunohistoquímica ^{5, 12, 13}.

Las microondas actúan excitando las moléculas de agua y lípidos dentro del tejido ^{2, 5}. Al absorber la energía de las microondas, estas moléculas aumentan rápidamente su temperatura; el calentamiento súbito causa la desnaturalización de las proteínas, lo que las vuelve insolubles y suficientemente estables para resistir el proceso de inclusión en parafina ⁸. Se ha demostrado que las microondas aceleran el proceso de penetración y reacción química de las sustancias fijadoras, dando a su vez una excelente imagen para microscopía óptica ^{2, 8, 9}.

Las ventajas del empleo de microondas sobre otras técnicas para fijar tejidos son que la desnaturalización de proteínas es menos severa, lo que permite utilizar las muestras para estudios de inmunohistoquímica ^{7, 9}; los reactivos se pueden emplear a menor concentración, con menor gasto de reactivos y se procesan las muestras en un tiempo menor ^{9, 12}.

HIPÓTESIS

La hipótesis a probar fue que el empleo de un horno de microondas permite una fijación de tejidos para histología e inmunohistoquímica simple, tan buena como la fijación convencional con aldehídos, en menor tiempo y con la misma o mejor conservación del detalle celular.

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue demostrar las ventajas y desventajas de fijar tejidos con microondas para su inclusión en parafina y posterior proceso rutinario para observación al microscopio óptico, así como la demostración de antígenos por inmunohistoquímica de cortes obtenidos a partir de las piezas incluidas en parafina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM en Ciudad Universitaria y el CENID-MICROBIOLOGÍA del INIFAP, SARH, en Palo Alto, Cuajimalpa, D. F. Se efectuaron tres experimentos:

EXPERIMENTO I: FIJACIÓN POR 24 HORAS

Se usaron cinco ratonas blancas convencionales de la cepa CD 1, hembras, recién destetadas. Los animales se sacrificaron humanitariamente ¹⁶ y se incidió cavidad abdominal con tijeras para extraer riñones e hígado dentro de los 7 minutos posteriores a la muerte. De cada animal se separaron cuatro porciones de riñón y cuatro porciones de hígado para su fijación.

Fijación con formaldehído (grupo 1):

Encima de una tableta de parafina se colocaron trozos pequeños de tejido, que se cortaron en rebanadas de 2 mm de espesor, medidas con vernier. Las piezas se guardaron identificadas en solución de formalina al 10% amortiguada con fosfatos a temperatura ambiente, a razón de 20 ml de solución fijadora por cada gramo de tejido, durante 24 horas ^{2, 17}.

Fijación con formaldehído mas microondas (grupo 2):

Encima de una tableta de parafina se colocaron trozos pequeños de tejido, que se cortaron en rebanadas de 2 mm de espesor. Estas piezas se sumergieron en solución de formalina al 5% amortiguada con fosfatos a temperatura ambiente, a razón de 20 ml de solución fijadora por cada gramo de tejido, dentro de frasquitos de vidrio. Se conservaron en esta solución por cuatro horas, para después ser irradiadas en la cavidad central de un horno de microondas casero de 720 Watts de potencia nominal durante ocho segundos a la máxima potencia ⁹. Posteriormente se pasaron a un frasco con solución amortiguadora de fosfatos, en el que se conservaron por 20 horas.

Fijación con microondas únicamente (grupos 3 y 4)

Encima de una tableta de parafina se colocaron trozos pequeños de tejido, que se cortaron en rebanadas de 2 mm de espesor. Estas piezas se pusieron en solución amortiguadora de fosfatos a temperatura ambiente, a razón de 20 ml de solución amortiguadora por cada gramo de tejido, dentro de frasquitos de vidrio. Se irradiaron en un horno de microondas casero de 720 Watts de potencia nominal durante ocho segundos a la máxima potencia ², y se conservaron a temperatura ambiente dentro de la misma solución de fosfatos por 24 horas (grupo 3).

Adicionalmente se utilizó otro grupo de tejidos en solución amortiguadora de fosfatos (grupo 4) que se irradiaron durante 22 segundos, hasta que se observó ebullición de la solución.

Inclusión en parafina

Después de la fijación con las técnicas descritas, los cuatro grupos de tejidos se trasladaron a capsulitas de plástico y se colocaron en etanol al 70%, para procesarse con la técnica convencional de inclusión en parafina por histokinetite¹⁷.

Corte en microtomo

Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo rotatorio a siete micras de grosor.

Coloración hematoxilina-eosina

Los cortes de parafina se colorearon con la técnica rutinaria de hematoxilina-eosina¹⁴.

Comparación de los resultados

Las laminillas coloreadas con HE del experimento I se sometieron a un panel de cinco patólogos graduados, con un mínimo de cinco años de experiencia, quienes juzgaron la preservación del detalle celular en una escala de cero a nueve, donde 0= autólisis severa y 9= excelente preservación. (Apéndice B).

Análisis estadístico

Los resultados se estudiaron por χ^2 con el programa *STATCALC* en una computadora personal, para evaluar el efecto de técnica de fijado.

EXPERIMENTO II: FIJACIÓN POR CUATRO HORAS

Se utilizaron cinco ratonas hembras convencionales de la cepa CD 1, recién destetadas, las que se sacrificaron humanitariamente¹⁶ y se incidió cavidad abdominal con tijeras, extrayendo el hígado de cada una de ellas, dentro de los 7 minutos posteriores a su muerte. Encima de una tableta de parafina se separaron cinco porciones de cada hígado, de 2 mm de espesor cada una, medidas con vernier. Inmediatamente después se colocaron en cinco frasquitos de vidrio, cada porción en un frasco diferente, y se sometieron a diferentes tratamientos de fijación (grupos 5, 6, 7, 8 y 9):

Fijación con formaldehído (grupos 5 y 6)

Una porción de hígado de 2 mm de cada ratona se colocó en un frasquito de vidrio conteniendo 13 ml de solución de formalina al 10% amortiguada con fosfatos, a razón de 20 partes de solución fijadora por cada gramo de tejido,

permaneciendo en esta por 24 horas (grupo 5). Posteriormente, las secciones de tejido se pasaron a capsulitas de plástico para su deshidratación progresiva en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina¹⁷. El procesamiento de tejidos se realizó manualmente utilizando frascos de vidrio.

En otro frasquito de vidrio se colocaron las porciones de hígado sumergidas en formalina al 5 % amortiguada con fosfatos, a razón de 20 tantos de solución por cada gramo de tejido. El tejido permaneció en esta solución por 4 horas y de inmediato se pasó a capsulitas de plástico para su deshidratación progresiva en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina (grupo 6).

Fijación con formaldehído mas microondas (grupo 7)

En un frasquito de vidrio con 13 ml de formalina al 5% amortiguada con fosfatos, se colocaron rebanadas de hígado de 2 mm de espesor de cada ratona, permaneciendo en esta solución por 4 horas. Posteriormente se irradiaron en un horno de microondas casero de 720 watts a la máxima potencia durante 12 segundos. Inmediatamente después se colocaron los tejidos en capsulitas de plástico, para su deshidratación con alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Fijación con microondas únicamente (grupo 8)

Las porciones de hígado de cada animal se colocaron en un frasquito de vidrio con 13 ml de solución amortiguadora de fosfatos, a razón de 20 tantos de solución por cada gramo de tejido y se irradió en el horno de microondas a la máxima potencia durante 12 segundos. Inmediatamente después se pasaron los tejidos a capsulitas de plástico para su deshidratación en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Deshidratación de tejidos sin fijación (grupo 9)

En el último frasquito de vidrio se colocó una porción de hígado de cada ratona, sumergidos en 13 ml de solución amortiguadora de fosfatos durante 4 horas, en seguida se pasaron los tejidos a capsulitas de plástico para su deshidratación en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Corte en microtomo

Los bloques de parafina se cortaron en un microtomo rotatorio a siete micras de grosor.

Coloración con hematoxilina-eosina

Los cortes de parafina se colorearon con la técnica rutinaria de HE¹⁴.

Comparación de los resultados

Las laminillas coloreadas con HE del experimento II se sometieron a un panel de seis patólogos graduados, con un mínimo de cinco años de experiencia,

quienes juzgaron la preservación del detalle celular en una escala de cero a nueve, donde 0= autólisis severa y 9= excelente preservación. (Apéndice B)

Análisis estadístico

Los resultados se estudiaron por χ^2 con el programa *STATCALC* en una computadora personal, para evaluar el efecto de técnica de fijado.

EXPERIMENTO III: INMUNOFLUORESCENCIA DE RABIA

Se inocularon 25 ratones de la cepa CD 1, de 45 días de edad, intracranalmente con 0.03 ml de la cepa de virus de exposición de virus rábico (CVS) ⁴. Se vigilaron diariamente después de la inoculación. Ocho días después, cuando el 90% de los ratones presentó signos indicativos de rabia (erizamiento de pelo, incoordinación, parálisis) se sacrificaron y se obtuvieron los encéfalos para fijarlos por las diferentes técnicas descritas mas adelante, y posteriormente incluirlos en parafina. Adicionalmente, se trabajó con un grupo testigo de nueve ratones sin inocular con el virus rábico, sacrificándose al mismo tiempo que los anteriores y dándoles los mismos tratamientos de fijación a los encéfalos y posterior inclusión en parafina. Adicionalmente, se prueba la hipótesis de que los antígenos no se desnaturalizan por el calentamiento súbito que las microondas causan en el tejido ⁷.

Los cortes desparafinados de los cerebros de los ratones inoculados y los ratones testigos se procesaron para inmunofluorescencia según la técnica habitual ⁴.

Inoculación de virus rábico en ratón

Para la inoculación intracerebral se utilizaron jeringas para tuberculina de 1.0 ml y agujas calibre 26 de 1.5 cm. de largo. A los ratones se les inoculó intracerebralmente con 0.03 ml de una suspensión de cepa de virus de exposición (CVS). La aguja se introdujo en el cráneo del ratón (Figura 3.1) en un punto situado en el vértice de un ángulo imaginario cuyos lados están dirigidos hacia el ojo y oreja derecha del animal. La aguja se

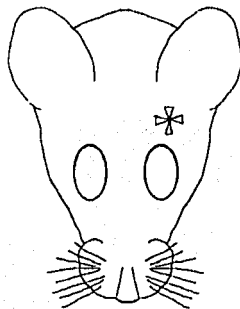


Figura 3.1 . Sitio de inoculación intracerebral en el ratón. (Figura cortesía de los Drs. D. González y G. Valero, del libro "Diagnóstico Veterinario", segunda edición).

introdujo de 1 a 2 mm en el tejido cerebral, depositando el inóculo. Los ratones se colocaron en cajas previamente preparadas e identificadas.

Técnicas de fijación para los encéfalos

De cada ratón se extrajeron los encéfalos y se separaron en dos hemisferios. Los hemisferios se colocaron aleatoriamente en uno de cinco frasquitos de vidrio, con 20 partes de fijador por una parte de tejido; que corresponden a los cinco diferentes tratamientos de fijación (grupos 10, 11, 12, 13 y 14) descritos a continuación:

Fijación con formaldehído (grupos 10 y 11)

Diez medios encéfalos se fijaron en 40 ml de solución de formalina al 10% amortiguada con fosfatos durante 24 horas (grupo 10).

Diez medios encéfalos se fijaron en 40 ml de una solución de formalina al 5% amortiguada con fosfatos durante 4 horas (grupo 11).

Después de la fijación, los tejidos se pasaron a capsulitas de plástico en grupos de cinco medios encéfalos en cada una, para su deshidratación en alcoholes (la cual se realizó manualmente en frascos de vidrio), aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Fijación con formaldehído mas microondas (grupo 12)

Diez medios encéfalos se fijaron en 40 ml de una solución de formalina al 5% amortiguada con fosfatos durante 4 horas y después se irradiaron por 12 segundos en un horno de microondas casero de 720 Watts (grupo 12). En seguida se pasaron los tejidos a capsulitas de plástico en grupos de cinco medios encéfalos en cada una, para su deshidratación en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Inmersión en solución de fosfatos (grupo 13)

Diez medios encéfalos se mantuvieron en 40 ml de una solución amortiguadora de fosfatos durante 4 horas y después se pasaron a capsulitas de plástico en grupos de cinco medios encéfalos en cada una, para su deshidratación en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Inmersión en solución de fosfatos mas microondas (grupo 14)

Diez medios encéfalos se sumergieron en 40 ml de una solución amortiguadora de fosfatos, después se irradiaron por 12 segundos en un horno de microondas casero de 720 Watts y de inmediato se pasaron a capsulitas de plástico en grupos de cinco medios encéfalos en cada una para su deshidratado en alcoholes, aclarado en xilol e inclusión en parafina.

Comprobación de animales positivos

Después de quitar los encéfalos de los animales inoculados con CVS, se obtuvieron improntas del tejido restante en la cavidad craneana, fijándose en acetona y tiñéndolas con la técnica de anticuerpos fluorescentes para rabia⁴; esto con el fin de comprobar la positividad a rabia de los animales inoculados y posteriormente poder comparar la cantidad de fluorescencia por esta técnica y la encontrada en los cortes desparafinados de los mismos casos.

Corte en microtomo

Los bloques en parafina de los encéfalos se cortaron en un microtomo rotatorio a siete micras de grosor; los cortes se montaron en laminillas y se desparafinaron para posteriormente teñirlas con la técnica de anticuerpos fluorescentes para rabia⁴.

De cada bloque se obtuvieron dos laminillas; en total se tiñeron y examinaron 30 laminillas; con 5 medios encéfalos cada una para los animales positivos y con 2 ó 3 medios encéfalos en cada una de las laminillas de los animales testigos negativos.

Técnica de anticuerpos fluorescentes

Es una prueba inmunológica, rápida y confiable que se utiliza para detectar antígeno rábico en tejidos, con fines diagnósticos e investigación. El fundamento consiste en marcar el anticuerpo con un fluorocromo, dejar que el anticuerpo marcado reaccione con el antígeno específico de rabia y el resultado de la reacción se observa con el microscopio de fluorescencia. Para esta prueba se necesita un microscopio de luz ultravioleta, conjugado de buena calidad y un técnico experimentado. Se utilizan los siguientes reactivos:

Conjugado antirrábico

Consiste en un suero hiperinmune marcado con isotiocianato de fluoresceína; el colorante está agregado de acuerdo a la cantidad de proteína presente. El suero hiperinmune se obtiene al inmunizar con virus rábico atenuado diferentes especies animales, como el conejo, hámster, caballo, etc.

Suspensión de cerebro de ratón normal de 21 días

Se preparó de la siguiente manera: Se sacrificaron los ratones, se extrajeron los cerebros, se hizo una suspensión al 20% con solución de albúmina bovina fosfatada. Los cerebros se homogeneizaron, luego se centrifugaron a 1000 r.p.m. en una centrifuga clínica durante 10 minutos; el sobrenadante se distribuyó en tubos de plástico con tapón de rosca a un volumen de 0.8 ml y se conservaron a - 20 C hasta su uso.

Suspensión de cerebro de ratón infectado

Se preparó de igual forma, utilizando cerebros de ratones de 21 días de edad, inoculados por vía intracerebral (Figura 3.1), con una suspensión de virus fijo CVS. Los cerebros se colectaron cuando los ratones mostraron signos paralíticos y estaban moribundos. Para hacer la suspensión se procedió de la misma manera que para preparar suspensión de cerebro de ratón normal.

Preparación del conjugado

El conjugado viene liofilizado y se reconstituyó a su volumen original (1 ml) con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2).

Para la adsorción del conjugado se adicionó 0.2 ml a los 0.8 ml de la suspensión al 20 % de cerebro de ratón normal, de igual forma se adicionó 0.2 ml a 0.8 ml a la suspensión al 20 % de cerebro de ratón infectado, se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de usarse.

Preparaciones testigo

Las improntas testigo se prepararon con cerebros enteros de ratones jóvenes inoculados por vía intracerebral (Figura 3.1) con CVS y sacrificados antes de morir. Las laminillas se fijaron en acetona durante 24 horas, y se conservaron en seco a - 20 C, hasta que se utilizaron.

Fijación

Las laminillas con los cortes histológicos se colocaron en un vaso de Coplin que contenía acetona fría y se mantuvieron en un congelador a - 15 C, durante 30 minutos. Se secaron al aire y cada impresión se delimitó con barniz para uñas.

Tinción

Un corte de cada laminilla se tiñó depositando una gota con conjugado adsorbido con la suspensión de ratón infectado, y el otro corte se tiñó con una gota de conjugado adsorbido en la suspensión de cerebro de ratón normal; de igual forma se tiñó la laminilla testigo de un caso positivo de rabia y otra laminilla con un caso negativo de rabia.

Incubación

Las laminillas se colocaron inclinadas en una cámara húmeda, colocando un pedazo de papel absorbente humedecido en la parte posterior. La cámara se colocó en posición vertical en una estufa a 37 C, durante 30 minutos y 15 minutos más a temperatura ambiente. Así se realizó la reacción antígeno-anticuerpo sin permitir que se seque el conjugado.

Enjuague

Después de la incubación, se enjuagaron las preparaciones sumergiéndolas varias veces en solución salina amortiguada con fosfatos por 10 minutos a pH 7.2; posteriormente se enjuagaron con agua destilada.

Montaje

Se secaron a temperatura ambiente, en posición vertical. A las laminillas se les depositó una gota de glicerina al 50 % amortiguada con fosfatos y con pH de 8.5; se colocó un cubreobjetos y quedaron listas para la observación al microscopio.

Lectura de laminillas

Un MVZ con 15 años de experiencia en la observación de fluorescencia de rabia evaluó los cortes histológicos teñidos, en una escala del 0 al 9, las siguientes características:

- * *Intensidad de la fluorescencia* (Qué tan bien teñido quedó el corte en general y qué tan brillante se observa).
- * *Fluorescencia inespecífica* (Todo lo que fluoresce sin ser debido al virus rábico).
- * *Diagnóstico* (Positivo o negativo).
- * *Cantidad de fluorescencia* (En caso de ser positivo, cantidad de corpúsculos fluorescentes).

Interpretación de resultados

En las improntas testigo positivas y en las improntas problema que contengan antígeno rábico se observan partículas de color verde manzana o amarillo verdoso con fluorescencia brillante, que tiende a ser ligeramente más opaco hacia el centro, sobre un fondo oscuro que puede o no contener material fluorescente no específico. Las partículas se observan de diferentes tamaños, cuando son minúsculas se les conoce como polvo antigénico, mientras que las partículas grandes corresponden a los cuerpos de Negri, que en este caso no deben observarse, pues el CVS no los produce.

Antes de examinar los casos problema se examinaron las improntas testigo positivo y testigo negativo, para comprobar que el microscopio, accesorios y conjugado funcionaron correctamente.

No debe observarse fluorescencia en las improntas teñidas con conjugado adsorbido en cerebro de ratón infectado con CVS. Este procedimiento es importante para determinar la especificidad de la fluorescencia y evitar los resultados falsos positivos.

RESULTADOS

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I

Las medias de las laminillas del experimento I se muestran en el cuadro I del apéndice C. Los datos originales se muestran en el cuadro III del apéndice C. La fijación con formaldehído (grupo 1) resultó en buena preservación del detalle celular. El hígado presentó de buena a regular conservación, con las células hepáticas un poco hinchadas, el citoplasma vacuolado y en algunos casos las vacuolas desplazan el material citoplásmico hacia la periferia (figura 1.1). Hay buena conservación del epitelio de los conductos biliares y de los eritrocitos. En riñón se observó buena conformación en la arquitectura del órgano; se conservó la división entre las células glomerulares y de las células del epitelio de los túbulos renales (figura 1.2).

La fijación con formaldehído más microondas (grupo 2) resultó en buena preservación del detalle celular en general. El hígado presentó regular conservación del detalle celular; se conservó la arquitectura del órgano; sin embargo, no todos los cortes observados tuvieron igual preservación. En algunos cortes hubo hepatocitos vacuolados e hinchados (figura 1.3), en otros cortes se presentaron núcleos desplazados hacia la periferia por las vacuolas y hubo algunos núcleos desnudos. Se observó desorden en los cordones hepáticos, sin delimitarse bien unas células de otras. En riñón, los glomérulos estuvieron bien conservados, aunque se presentó un espacio grande entre el ovillo glomerular y la cápsula glomerular. El citoplasma de las células del epitelio de los túbulos renales se observó espumoso e hinchado, con pérdida de la luz de los túbulos (figura 1.4).

En la fijación con microondas por ocho segundos únicamente (grupo 3), la conservación del detalle celular fue pobre, aunque se distingue aún el órgano del que se trata. En hígado se observó disociación de cordones hepáticos, hepatocitos hinchados y ruptura de algunos núcleos (figura 1.5). El tejido renal presentó hinchamiento de túbulos renales y ruptura de algunas células de los mismos túbulos, aunque se conservó la membrana basal de éstos (figura 1.6); en los glomérulos se observó ruptura de algunas células y gran separación del ovillo glomerular de la cápsula glomerular.

En la fijación con microondas hasta observar ebullición (grupo 4), la preservación del detalle celular también fue pobre; sin embargo, no tan mala como en el grupo 3. En tejido hepático se observó hinchamiento de los hepatocitos por zonas, con algunos núcleos picnóticos y disociación de cordones hepáticos por zonas también (figura 1.7). El epitelio de los

canaliculos biliares y el endotelio vascular se conservaron bien. El riñón presentó regular conservación en general; hubo mejor conservación de células al centro del corte, pues a la periferia las células de los túbulos se observaron hinchadas y algunas vacuoladas, perdiéndose la luz del mismo. La separación entre los túbulos renales fue muy marcada y hubo gran separación entre el ovillo glomerular y la cápsula glomerular; el epitelio de los vasos sanguíneos se observó roto, deshilachado, con crenación de eritrocitos en su interior; sin embargo el epitelio de la pelvícula renal se conservó muy bien. (figura 1.8)

Los tratamientos que permitieron la mejor preservación del detalle celular fueron la fijación con formalina amortiguada al 10% (grupo 1) y la fijación con formalina amortiguada al 5% por cuatro horas y posteriormente irradiadas con microondas ocho segundos (grupo 2). Estadísticamente ambos resultaron iguales ($p > 0.05$).

El tratamiento que no permitió la buena conservación del detalle celular fue la fijación con microondas por ocho segundos únicamente (grupo 3).

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II

Las medias de las laminillas del experimento II se muestran en el cuadro II del apéndice C. Los datos originales se muestran en el cuadro IV del apéndice C. La conservación de los tejidos fijados con formalina al 10 % (grupo 5) fue buena en general, aunque se observaron pequeñas zonas con los citoplasmas de los hepatocitos hacia la periferia o vacuolado y pequeñas zonas en las que el citoplasma se encontró muy vacuolado. El epitelio de los conductos biliares se conservó muy bien.

La preservación del detalle celular en los tejidos fijados con formalina al 5% durante 4 horas (grupo 6), resultó ser regular, pues se observaron zonas de hepatocitos en las que no se distingue la separación entre células y solamente se observan núcleos con material amorfo eosinofílico alrededor (figura 2.1). Sin embargo, el epitelio de los conductos biliares conservó muy bien el detalle celular.

Los tejidos fijados con formalina al 5 % durante 4 horas y posteriormente irradiados en el horno de microondas durante 12 segundos (grupo 7) se observaron con una regular a mala conservación del detalle celular, ya que en algunos cortes el citoplasma de los hepatocitos mostró vacuolización total, con el material citoplásmico desplazado hacia la periferia, y tampoco se notó la división entre células (figura 2.2). Sin embargo, en otros cortes del mismo tratamiento se observó buena conservación del detalle celular, con una clara delimitación entre células.

La conservación en los tejidos fijados con el horno de microondas por 12 segundos (grupo 8) fue buena, aunque hubo zonas en las que no se observan

bien delimitados los cordones hepáticos y se pierde el espacio sinusoidal, pero en general hay buena conservación de hepatocitos (figura 2.3).

Los tejidos que se mantuvieron en solución amortiguadora de fosfatos por cuatro horas sin fijación alguna (grupo 9), presentaron de regular a mala conservación del detalle celular, núcleos desnudos y disociación de cordones hepáticos; todo lo anterior se acentúa más hacia la periferia, hubo células vacuoladas y estas vacuolas desplazaban el material citoplásmico hacia la periferia (figura 2.4).

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III:

No hubo animales muertos dentro de las 48 horas posteriores a la inoculación, por causas inespecíficas o traumatismo.

Al octavo día postinoculación el 90% de los ratones presentaron signos característicos de rabia: 24 animales tenían dificultad para caminar y mantenerse parados, encorvamiento, crizamiento de pelo y tremor. Solo un ratón no presentó signología.

En las improntas tomadas de los restos de tejido de la cavidad craneana de los ratones inoculados con CVS, y posteriormente teñidas con la técnica de anticuerpos fluorescentes para rabia, se observó gran cantidad de fluorescencia positiva, con formaciones típicas de rabia⁴, en todos los animales, inclusive en el ratón que no presentó signología de rabia.

Después de aplicar los diferentes tratamientos de fijación a los medios encéfalos, tanto de los animales enfermos como de los testigos, e incluirlos en parafina y aplicarles la tinción de anticuerpos fluorescentes, se leyeron aleatoriamente por un MVZ, el cual emitió sus diagnósticos (ver cuadro V del apéndice C) y los resultados fueron los siguientes:

Cantidad de fluorescencia

Se observó escasa cantidad de fluorescencia en todos los cortes de tejidos de animales inoculados con CVS; inclusive el médico que examinó los casos los calificó de "muy difíciles, con escasa fluorescencia", en comparación con las improntas tomadas en fresco.

El tratamiento con mayor cantidad de fluorescencia fue el 12 (formol 5% 4h, microondas 12 seg); sin embargo, también se observó fluorescencia inespecífica en los testigos negativos del mismo tratamiento, que el MVZ diagnosticó como positivos.

El tratamiento con menor cantidad de fluorescencia fue el 11 (formalina al 5% durante 4 h); debido a esto, la mayoría de los positivos se dieron como negativos.

Fluorescencia inespecífica

En general, se encontró poca fluorescencia inespecífica en todos los cortes, tanto en los de animales inoculados como en los de testigos negativos; y de esta fluorescencia inespecífica, muy poca fue debida a la parafina (M. A. Cámara, comunicación personal, 1994).

Los tratamientos con mayor cantidad de fluorescencia inespecífica fueron el 10 (Formol al 10%, 24 h) y el 12 (Formol 5% 4h, Microondas 12 s).

Intensidad de la fluorescencia

En todos los cortes de todos los tratamientos hubo una excelente intensidad en la fluorescencia.

Diagnóstico

En el tratamiento 10 (Formol al 10% 24 h), de las cuatro laminillas positivas solo dos el médico las diagnosticó como positivas; y las dos laminillas negativas las diagnosticó como positivas.

En el tratamiento 11 (Formalina al 5% durante 4h), de las cuatro laminillas positivas, solo una se diagnosticó como positiva y de dos laminillas negativas, una se diagnosticó como positiva. Este tratamiento fue el que mostró menor sensibilidad y especificidad.

De las cuatro laminillas positivas del tratamiento 12 (Formol 5% 4h, microondas 12 s), tres se diagnosticaron como positivas; y de las dos negativas las dos se diagnosticaron como positivas.

En cuanto al tratamiento 13 (Solución amortiguadora de fosfatos por 4h), las cuatro laminillas positivas se diagnosticaron como tal; y de las dos laminillas negativas, una se diagnosticó positiva. De hecho, este tratamiento fue el que presentó mayor sensibilidad y especificidad.

En el tratamiento 14 (Solución amortiguadora de fosfatos, microondas 12s), de las cuatro laminillas positivas solo dos se diagnosticaron como positivas y de las dos negativas, una se diagnosticó como positiva.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO I

En el primer experimento, fue evidente que el riñón se conservó mejor que el hígado en cualquiera de los tratamientos.

Si bien la fijación con formalina al 5% y microondas (grupo 2) resultó en buena preservación, no podría asegurarse que la mera acción de las microondas fijaran el tejido, ya que podría argumentarse que la formalina al 5% por sí sola fijó los tejidos, por ser los trozos muy pequeños. Por esta razón se diseñó el experimento II, donde solamente se utilizó tejido hepático; ya que, como se observó en los resultados del experimento I, es el que más difícilmente se conserva. Para el experimento II se aumentó el tiempo de irradiación en el horno de microondas, pues se pensó que ocho segundos no eran suficientes para coagular el tejido, al contrario de lo que se menciona en la bibliografía^{1,2}, y así endurecerlo debidamente para su inclusión en parafina.

Por otra parte, la irradiación de tejidos sumergidos en solución amortiguadora de fosfatos en el experimento I había resultado en autólisis marcada, pero existía la posibilidad de que fuera suficiente el irradiar los tejidos para que endurecieran y se pudiesen deshidratar en alcoholes e incluirlos inmediatamente, sin dar tiempo a que se autolisen, por lo que en el experimento II, los tejidos sumergidos en solución de fosfatos, recién irradiados, fueron inmediatamente deshidratados en concentraciones crecientes de etanol. Además, se incluyeron tejidos que no fueron irradiados, para comparar la facilidad o dificultad de incluir tejidos sin fijar y fijados.

DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO II

En este experimento los resultados fueron totalmente diferentes a los observados en el experimento I, ya que estadísticamente el tratamiento con mejor resultado fue el 8 (irradiación en microondas 12 segundos en solución amortiguadora de fosfatos), seguido del tratamiento 5 (fijación en formol al 10 % por 24 h). Los tratamientos 6 (formol al 5% por 4 h), 7 (formol al 5 % por 4 h y microondas 12 s.) y 9 (PBS 4 h) resultaron estadísticamente iguales; de hecho, 4 de 6 patólogos dieron mejores calificaciones al tratamiento 8 y los otros 2 dieron mayores calificaciones al tratamiento 5.

Con lo descrito anteriormente se podría decir que el empleo de formalina al 5% durante cuatro horas no fijó lo suficiente los tejidos, pero el empleo de microondas sí ayudó a endurecer los tejidos lo suficiente para

resistir el proceso de inclusión en parafina; aunque tampoco puede afirmarse que la mera acción de las microondas fije el tejido. Se observó también que se acortó el tiempo de proceso de las muestras al irradiarlas tan solo 12 segundos y procesarlas para incluirlas en parafina de inmediato, obteniendo incluso mejor preservación que con el método convencional con formalina al 10%, en el que hay que esperar 24 horas como mínimo para proseguir con la inclusión en parafina.

DISCUSIÓN DEL EXPERIMENTO III

En este experimento se observó reducción de la cantidad de la fluorescencia, en comparación con las improntas teñidas en fresco. Esto puede deberse a la inactivación de los receptores del virus rábico por el proceso de inclusión en parafina, ya que en todos los tratamientos la disminución de la fluorescencia fue equitativamente notable. También debe tomarse en cuenta que los cortes histológicos son mucho más gruesos (7 μm), que las improntas (3 μm); y esto pudo haber afectado la penetración del anticuerpo conjugado.

En este experimento, el tratamiento con mejores resultados fue el 13 (Solución amortiguadora de fosfatos por 4 h) en el que solamente se diagnosticó un falso positivo; y por el contrario, los tratamientos que resultaron en más falsos positivos y falsos negativos fueron el 10 (Formol al 10%, 24 h) y el 11 (Formalina al 5%, 4h).

En este experimento III de inmunofluorescencia de rabia, no se puede evaluar si las microondas tienen algún efecto benéfico o detrimental en la aplicación de esta técnica, ya que, en general los resultados fueron similares para todos los tratamientos; excepto para el tratamiento que no recibe fijación alguna, en el que se observan más diagnósticos acertados.

DISCUSIÓN GENERAL

En este trabajo se pudo probar que las microondas son útiles para fijar tejidos e incluirlos posteriormente en parafina. Para esto es importante estandarizar tiempos de fijación, según el grosor y cantidad de tejidos que se deseen procesar; ya que, como se describe en los resultados del experimento I, en los cortes histológicos fijados con microondas hay secciones muy bien fijadas y otras no, lo que concuerda con la bibliografía ⁸. En el experimento II, al aumentar el tiempo de fijación con microondas, los cortes se observaron más uniformes. Se observó también que si es posible procesar los tejidos para incluirlos en parafina inmediatamente después de irradiarlos en el microondas; ya que las microondas endurecen el tejido lo suficiente para resistir el proceso

de inclusión en parafina, pero no detienen el proceso de autólisis. Sin embargo, con esta metodología se reduce el tiempo de fijación.

El prefijar los órganos con formol al 5% y posteriormente irradiarlos en el microondas, no dió tan buenos resultados como se afirma en la bibliografía⁹, ya que nuevamente se encontró buena fijación en algunas zonas, pero en otras se presentó autólisis, principalmente en el centro del tejido; puesto que el fijador químico penetra de fuera hacia dentro lentamente y se acelera el proceso al momento de irradiar el tejido en el microondas, pero queda diferentemente fijado el centro del exterior de la pieza^{2, 8, 9}.

En cuanto al experimento III, se observó disminución en la cantidad de la fluorescencia en comparación con las improntas teñidas en fresco, lo que dificultó grandemente el diagnóstico acertado de las mismas; sin embargo, no se puede afirmar que esto es debido a la acción de las microondas o el formol sobre el antígeno rábico.

CONCLUSIONES

Se puede afirmar que el empleo de un horno de microondas en un laboratorio de histopatología es de gran utilidad, ya que se comprobó que los tejidos irradiados en este pueden procesarse para su inclusión en parafina, inmediatamente después, con una excelente preservación del detalle celular.

Se observó que 12 segundos a la máxima potencia es buen tiempo de exposición a las radiaciones para tejidos de 2 mm de grosor. Los frascos conteniendo los tejidos recién irradiados no se calentaron demasiado, pues podían manejarse al tacto.

Las ventajas de fijar tejidos en el horno de microondas fueron la reducción del tiempo de fijación y la disminución o ausencia total de fijadores, con la utilización de solución amortiguadora de fosfatos en su lugar, que no resulta lesiva para el tejido y es económica. Además, se evita la exposición del personal a los vapores tóxicos del formaldehído.

El empleo de un horno de microondas para la fijación de tejidos es una técnica fácil de implementar en un laboratorio de histopatología a bajo costo. Sin embargo, las desventajas de utilizar radiación de tejidos en el horno de microondas en lugar de sumergirlos en fijadores, pueden ser la observación de algunas áreas mejor fijadas que otras, al no estar bien estandarizados los tiempos y cantidades de tejido irradiado; pudiendo esto confundir al patólogo al momento de hacer un diagnóstico.

Se debe probar el uso de fijación con microondas en otras técnicas de inmunohistoquímica antes de afirmar que no se pueden utilizar ambas técnicas juntas, ya que la bibliografía afirma que la fijación con microondas intensifica la reacción¹³, aunque en este trabajo se observó disminución en la reacción de inmunofluorescencia para rabia.

LITERATURA CITADA

1. Argall, K. y Armati, P.: Use of microwave fixation in preparation of cell cultures for observation with the scanning electron microscope. *J. of electron microscopy technique*. 16: 347-350. (1990).
2. Boon, M. E; Gerrits, P. O; Moorlag, H. E; Nieuwenhuis, P y Kok, L. P. : Formaldehyde fixation and microwave irradiation. *Histochem j.* 2: 313-322. (1988).
3. Culling, C. F. A. : Handbook of Histopathological and Histochemical Techniques. *Butterworths*, London. 1974.
4. González, V. D y Monroy, B. J. : Diagnóstico de rabia, en: Valero, G (editor): Diagnóstico Veterinario. *Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A. C.* México: pp 89-97. 1993.
5. Gove, D. W; Lang, A. S. : Rapid microwave-stimulated fixation of fine needle aspiration biopsies for transmission electron microscopy. *Diag Citopath.* 6: No 1. 68-71. (1990).
6. Hamilton, T. M y Pilgaard, J. : Microwave - assisted frozen section diagnosis. *APMIS* 98: 200- 202. (1990).
7. Hellström, S; Tengblad, A; Johansson, C; Hedlund, U and Axelsson, E. : An improved technique for hyaluronan histochemistry using microwave irradiation. *Histochem. J.* 22: 677-682. (1990).
8. Horobin, R y Flemming, L. : Trouble-shooting microwave accelerated procedures in histology and histochemistry: understanding and dealing with artefacts, errors and hazards. *Histochemical Journal* 22: 371-376. (1990).
9. Kok, L. P y Boon, M. E : Microwaves for microscopy. *J. of microscopy*. 158: pt 3.291- 322. (1990).
10. Leong, A. S; Daymon, M. E y Milios, J. : Microwave irradiation as a form of fixation for light and electron microscopy. *J. of path.* 146: 313-321 (1985).
11. Lillie, A. P. : Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. 3rd ed. *McGraw-Hill*, New York., U. S. A. 1965.
12. Login, G. R y Dvorak, A. M. : Microwave fixation provides excellent preservation of tissue, cells and antigens for light and electron microscopy. *Histochem J.* 20: 373- 387. (1988).

13. Login, G. R; Dweyer, B. K y Dvorak, A. M. : Rapid primary microwave osmium fixation. I. Preservation of structure for electron microscopy in seconds. *The journal of histochem and citochem* .38: No. 6. 755- 762. (1990).
14. Luna, L. G. : Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. *McGraw-Hill*, New York, U. S. A. 1960.
15. Thomson, S. W. : Selected Histochemical and Histopathological Methods. *Charles C. Thomas*, Springfiel, Illinois, U. S. A. 1966.
16. UFAW. : Humane Killing of Animals . *The Universities Federation for Animal Welfare*. 1967.
17. Valero, G; Valero, G. y Morales, J. F. : Técnica de Histopatología, en: Valero, G. Diagnóstico Veterinario. *Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C.* pp 18-24 .1993.

APÉNDICE A. FOTOGRAFÍAS AL MICROSCOPIO



FIGURA 1.1 Fotomicrografía de un hígado donde se observan algunas células vacuoladas.
Barra = 10 μm .



FIGURA 1.2 Fotomicrografía de un riñón donde se observan glomerulos y túbulos renales bien conservados.
Barra = 10 μm .



FIGURA 1.3 Fotomicrografía de un hígado donde se observan hepatocitos vacuolados e hinchados.
Barra = 10 μm .



FIGURA 1.4 Fotomicrografía de un riñón donde se observan células de túbulos renales hinchadas, perdiéndose la luz.
Barra = 10 μm .



FIGURA 1.5 Fotomicrografía de un hígado donde se observa disociación de cordones hepáticos y células hinchadas. Barra = 10 μ m.

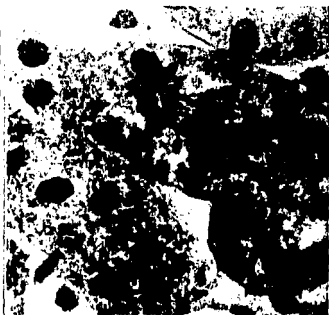


FIGURA 1.6 Fotomicrografía de un riñón donde se observa ruptura de las células de algunos túbulos renales (r) y citoplasma espumoso en otros (e). Barra = 10 μ m.

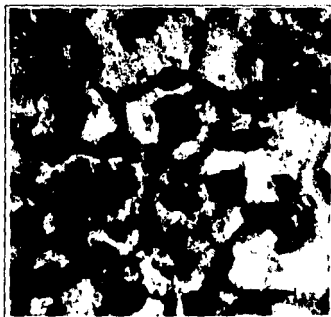


FIGURA 1.7 Fotomicrografía de un hígado donde se observa desorden en los cordones hepáticos y hepatocitos hinchados con núcleos picnóticos (p). Barra = 10 μ m.



FIGURA 1.8 Fotomicrografía de un riñón donde se observan las células de los túbulos renales hinchadas, perdiéndose la luz y una gran separación entre el ovillo glomerular (og) y la cápsula glomerular (cg). Barra = 10 μ m.

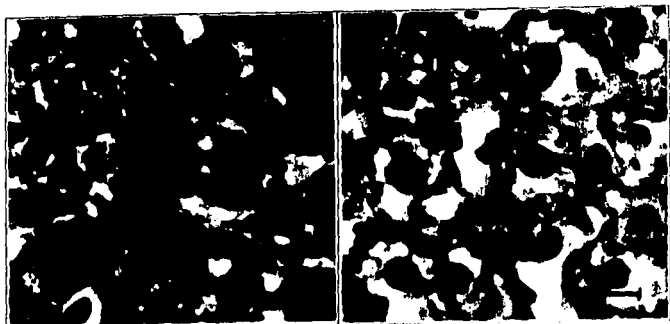


FIGURA 2.1 Fotomicrografía de un hígado donde se observan zonas de hepatocitos vacuolados, hinchados; no se distingue la separación entre células.
Barra = 10 μm .

FIGURA 2.2 Fotomicrografía de un hígado donde se observa vacuolización de hepatocitos.
Barra = 10 μm .

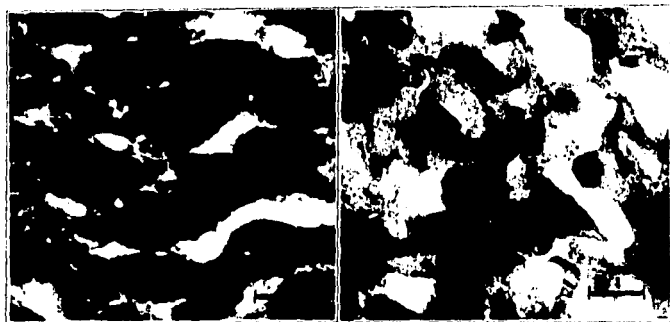


FIGURA 2.3 Fotomicrografía de un hígado donde se observa regular conservación del detalle celular.
Barra = 10 μm .

FIGURA 2.4 Fotomicrografía de un hígado donde se observa vacuolización, ruptura de hepatocitos y disociación de cordones hepáticos (autólisis).
Barra = 10 μm .

APÉNDICE B. CUESTIONARIO SUMINISTRADO A LOS PATÓLOGOS

Como parte de la tesis de licenciatura de Beatriz Arellano, le pedimos que evalúe la preservación del detalle celular de 41 laminillas, calificándolas en una escala del 0 al 9, donde 0= autólisis severa y 9= excelente preservación del detalle (si quiere puede emplear valores decimales o redondeados). Lo ideal es que pueda revisar todas las laminillas en una sola sesión de menos de 60 minutos. Son riñones e hígados de ratones hembras, recién destetadas y aparentemente sanas. Favor de escribir su nombre: _____ y el número aproximado de años de experiencia en la observación de laminillas _____.

#	calificación	observaciones (si las hubiese)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		

¿Desea Usted que su nombre aparezca en los agradecimientos de la tesis y el manuscrito para publicación? _____

GRACIAS

B. Arellano y G. Valero

APÉNDICE B. CUESTIONARIO SUMINISTRADO A LOS PATÓLOGOS

Como parte de la tesis de licenciatura de Beatriz Arellano, le pedimos que evalúe la preservación del detalle celular de 41 laminillas, calificándolas en una escala del 0 al 9, donde 0= autólisis severa y 9= excelente preservación del detalle (si quiere puede emplear valores decimales o redondeados). Lo ideal es que pueda revisar todas las laminillas en una sola sesión de menos de 60 minutos. Son riñones e hígados de ratones hembras, recién destetadas y aparentemente sanas. Favor de escribir su nombre: _____ y el número aproximado de años de experiencia en la observación de laminillas _____.

#	calificación	observaciones (si las hubiese)
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		

¿Desea Usted que su nombre aparezca en los agradecimientos de la tesis y el manuscrito para publicación? _
 GRACIAS *B. Arellano y G. Valero*

APÉNDICE C. CUADROS CON RESULTADOS DE EVALUACIONES

CUADRO I: MEDIAS DE LAS LAMINILLAS DEL EXPERIMENTO I.

patólogo	grupo 1		grupo 2		grupo 3		grupo 4		promedio	
	hígado	riñón	hígado	riñón	hígado	riñón	hígado	riñón	hígado	riñón
1	4.2	6.4	6.1	7.6	7.0	6.6	5.8	7.6	5.7	7.0
2	2.4	7.2	2.1	4.8	1.2	1.8	1.6	4.8	1.8	4.6
3	7.2	6.8	5.8	6.8	5.0	6.8	6.4	7.6	6.1	7.0
4	3.0	6.8	2.0	7.2	2.4	2.0	2.0	4.4	2.3	5.1
5	4.8	6.4	5.1	6.6	2.0	5.0	3.6	4.8	3.8	5.7
promedio	4.3	6.7	4.2	6.6	3.5	4.4	3.4	4.3	3.9	5.9

grupo 1 = formalina al 10% por 24 horas

grupo 2 = formalina al 5% por 4 horas, microondas 8 segundos

grupo 3 = solución de fosfatos más microondas por 8 segundos

grupo 4 = solución de fosfatos más microondas por 22 segundos

CUADRO II: MEDIAS DE LAS LAMINILLAS DEL EXPERIMENTO II.

patólogo	grupo 5	grupo 6	grupo 7	grupo 8	grupo 9	promedio
1	6.5	6.2	5.0	8.0	5.6	6.2
2	6.6	5.8	6.4	6.4	6.2	6.2
3	6.6	5.2	5.2	6.4	5.0	5.6
4	4.0	3.6	2.6	6.2	4.2	4.1
5	3.8	4.6	5.0	5.2	4.6	4.6
6	3.8	4.2	4.4	6.8	3.8	4.6
promedio	5.2	4.9	4.7	6.5	4.9	5.2

grupo 5 = formalina al 10% por 24 horas

grupo 6 = formalina al 5% por 4 horas

grupo 7 = formalina al 5% por 4 horas más microondas 12 segundos

grupo 8 = solución de fosfatos más microondas 12 segundos

grupo 9 = solución de fosfatos por 4 horas

CUADRO III: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO I.

#	órgano	grupo	patólogo 1	patólogo 2	patólogo 3	patólogo 4	patólogo 5
1	Riñón(R)	3	6	7	6	8	6
2	R	3	6	7	7	6	6
3	R	3	7	8	7	7	7
4	R	3	6	8	7	6	6
5	R	3	7	6	7	7	7
6	R	4	7	6	8	6	7
7	R	4	7	5	7	7	7
8	R	4	8	5	6	7	6
9	R	4	8	4	6	8	7
10	R	4	8	4	7	8	6
11	Higado (H)	3	4	3	8	4	4
12	H	3	4	2	7	2	4
13	H	3	4	2	6	2	5
14	H	3	4	2	8	3	5
15	H	3	5	3	7	4	6
16	H	1	6	1	5	1	4
17	H	1	6	2	7	3	4
18	H	1	7	2	7	3	4
19	H	1	6	2	6	2	3
20	H	1	4	1	7	1	3
21	H	4	6	2	7	1	6
22	H	4	5	2	6	1	5
23	H	4	6	2	5	2	5
24	H	4	6	2	6	3	4
25	H	4	7	3	6	3	5
26	H	4	7	2	5	2	6
27	R	1	7	3	8	4	4
28	R	1	7	6	8	5	6
29	R	1	8	7	7	4	4
30	R	1	8	4	8	5	5
31	R	1	8	4	7	4	5
32	R	2	6	1	8	2	3
33	R	2	6	2	8	2	6
34	R	2	7	2	5	2	5
35	R	2	7	2	6	1	6
36	R	2	7	2	7	3	5
37	H	2	6	1	3	2	2
38	H	2	7	1	7	3	2
39	H	2	7	2	5	3	2
40	H	2	8	1	6	2	2
41	H	2	7	1	4	2	2

grupo 1 = formalina al 10% por 24 horas

grupo 2 = formalina al 5% por 4 horas, microondas 8 segundos

grupo 3 = solución de fosfatos más microondas por 8 segundos

grupo 4 = solución de fosfatos más microondas por 22 segundos

CUADRO IV: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO II.

#	órgano	grupo	patólogo 1	patól. 2	patól. 3	patól. 4	patól. 5	patól. 6
1	hígado(H)	5	7	7	8	3	3	5
2	H	5	6	7	8	7	4	6
3	H	5	7	6	5	2	3	2
4	H	5	7	7	8	4	4	1
5	H	5	7	6	4	4	5	5
6	H	6	6	5	5	3	5	5
7	H	6	6	6	4	3	2	5
8	H	6	7	6	5	5	6	6
9	H	6	7	6	6	4	4	3
10	H	6	5	6	6	3	6	2
11	H	7	5	7	7	4	6	4
12	H	7	5	5	1	0	3	2
13	H	7	5	6	4	1	4	3
14	H	7	5	7	6	2	5	6
15	H	7	5	7	8	6	7	7
16	H	8	8	6	6	5	4	6
17	H	8	8	6	6	6	5	7
18	H	8	8	6	5	5	5	6
19	H	8	8	7	8	8	6	8
20	H	8	8	7	7	7	6	7
21	H	9	7	6	6	4	4	3
22	H	9	7	7	5	8	5	7
23	H	9	5	6	6	3	5	3
24	H	9	4	7	4	4	4	3
25	H	9	5	5	4	2	5	3

grupo 5 = formalina al 10% por 24 horas

grupo 6 = formalina al 5% por 4 horas

grupo 7 = formalina al 5% por 4 horas más microondas 12 segundos

grupo 8 = solución de fosfatos más microondas 12 segundos

grupo 9 = solución de fosfatos por 4 horas

CUADRO V: RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES DEL EXPERIMENTO III.

Grupo	Dx real	Dx MVZ	Cantidad fluorescencia	Intensidad fluorescencia	fluorescencia inespecifica
10	+	-	0	7	3
10	+	-	0	9	2
10	+	+	3	8	3
10	+	+	4	9	2
10a	+	+	1	8	3
10a	-	+	1	8	1
11	+	-	0	8	1
11	+	-	0	9	2
11	+	-	0	9	0
11	+	+	1	9	1
11a	-	-	0	9	0
11a	-	+	1	9	1
12	+	-	0	7	4
12	+	+	2	9	2
12	+	+	3	9	2
12	+	+	4	7	2
12a	-	+	2	7	3
12a	-	+	2	7	2
13	+	+	1	8	0
13	+	+	2	9	2
13	+	+	1	9	1
13	+	+	2	9	3
13a	-	-	0	9	1
13a	-	+	3	9	3
14	+	-	0	8	0
14	+	-	0	8	1
14	+	+	1	9	1
14	+	+	3	9	1
14a	-	+	3	9	1
14a	-	-	0	8	1

a= Ratones testigos negativos.

grupo 10 = formalina al 10% por 24 horas

grupo 11 = formalina al 5% por 4 horas

grupo 12 = formalina al 5% por 4 horas más microondas 12 segundos

grupo 13 = solución de fosfatos por 4 horas

grupo 14 = solución de fosfatos más microondas 12 segundos

APÉNDICE D. Publicaciones resultado de esta tesis

Con el permiso del H. Consejo Técnico de la FMVZ, se presentaron algunos datos obtenidos en el transcurso de esta investigación en el III congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C., en México D.F. el 14 de julio de 1994, y en el XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias en Acapulco, Guerrero el 11 de octubre de 1994



Memorias de la V Reunión de Egresados en Patología Veterinaria y III Congreso de la Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, A.C. México, D.F. del 13 al 15 de julio de 1994, página 17

USO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA FIJACIÓN DE TEJIDOS PARA HISTOPATOLOGÍA (USE OF MICROWAVE OVEN FOR THE FIXATION OF TISSUES FOR HISTOPATHOLOGY)

Arellano*, B.; Valero, G.^{1,2}

¹CENID-Microbiología, INIFAP-SARH, Km. 15.3 carretera México-Toluca, México D.F. 05110. FAX 5702810, 5700682.

²Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, Ciudad Universitaria, México D. F. 04510. FAX 5508697.

Se ha descrito que las microondas pueden acelerar y mejorar el proceso de fijación de tejidos, tanto para histopatología, citología y microscopía electrónica. El objetivo de este trabajo fue comparar el grado de conservación del detalle celular en riñones e hígados de ratones sanos, irradiados en un horno de microondas casero en soluciones amortiguadoras de fosfatos y formalina amortiguada, comparándolos con la fijación convencional en formalina amortiguada a temperatura ambiente. Se utilizaron 5 ratonas albinas destetadas hembras, aparentemente sanas. Se sacrificaron humanitariamente por desnucamiento y se depositaron 0.6 g de hígado y riñón en frasquitos con 13 ml de los siguientes: 1.- Formalina amortiguada (FA) al 10% por 24 horas (h); 2.- FA al 5% por cuatro h, junto con irradiación en un horno de microondas (750 watts por 8 segundos (s)) y posterior remojo en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) por 20 h; 3.- SAF junto con imh por 8 s y remojo en SAF por 24 h; 4.- SAF con imh hasta observar ebullición y remojo en SAF por 24 h. Las laminillas se sometieron a 5 patólogos experimentados, quienes evaluaron en una escala del 0 al 9 el grado de preservación del detalle celular. Los resultados se analizaron por χ^2 . Los tratamientos que proporcionaron la mejor preservación del detalle celular fueron el 1 y el 2. La preservación más deficiente del detalle celular fue por el tratamiento 3 ($p < 0.05$). El uso de imh resultó en reducción del tiempo de fijación y disminución de la concentración de la formalina. Se concluye que, para fines prácticos conviene fijar los tejidos con un remojo de formol por cuatro horas e irradiación con microondas por ocho segundos.

Los autores agradecen la elaboración de E. Labranderio, E. Díaz y G. Juárez.

La información presentada es componente de la tesis de la primera autora, bajo la supervisión del segundo autor, y con la aprobación del Consejo Técnico de la FMVZ-UNAM.

[palabras clave: microondas, fijación, formaldehído]



ESTUDIO HISTOPATOLOGICO DE TESTICULOS DE CERDOS PREMATUROS DE CENASAS REPRODUCTIVAS AL FRANCOCANAL DE LOS AZULES.
 García, P. A., ¹Castellanos, J. A., ²Reinos, S. T., ³Quintero, J. S. Sección de Análisis Clínicos y Patología, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, A.p. 321, C.P. 54700, Cuautitlán Izamal, Estado de México.

Se describieron por histopatología 70 testículos de cerdos nacidos de 4 meses prenatados de cerdas micropúvilas al parecer durante del Oto Anni. Las lesiones encontradas en testículos fueron inflamación no supurativa en 19 de los casos asociada a un cuadro deparatuberculosis aguda, 15 de los cuales presentaron fibrosis ligera a moderada. Así mismo en epidídimo en 35 de los casos un entorzo leucito inflamatorio no supurativo, en 9 de los mismos asociados con fibrosis de ligera a moderada. Las lesiones histológicas de testículo y epidídimo pueden sugerir la presencia del virus y el tiempo aproximado de infección.

PRAXIS DE LA CITOLOGIA EN MEDICINA VETERINARIA.
 Romero, L. y de Man, M. Depto. Patología, Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., Ciudad Universitaria, Coahuacán 04510, Tapic, G. Depto. de Genética, Facultad de Medicina Veterinaria, Zootecnia, U.N.A.M., Ciudad Universitaria, Coahuacán 04510.

El diagnóstico citológico es la ciencia de interpretar las células del cuerpo humano y animal, lo pueden describir lícitamente de las superficies epiteliales, o bien ser recogidas de los tejidos por diferentes procedimientos clínicos, como son: técnicas de lavado o aspirado, aspiración con aguja delgada y colección de líquidos corporales. La citología debe estar basada en la síntesis de toda la evidencia disponible, más que en los cambios individuales de las células. Este estudio diagnóstico ha adquirido cada día mayor importancia debido a la rapidez de la técnica, bajo riesgo y bajo costo.

Se analizaron 117 casos de citología con correlación histológica realizados en la sección de Citología del departamento de Patología de la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. durante el periodo F.R.V.I. de enero de 1968 a diciembre de 1971. A estos datos se les aplicaron diferentes pruebas estadísticas para determinar la exactitud del estudio citológico en base al estudio histopatológico. Se observó que un número laboratorio el diagnóstico citológico tiene una alta especificidad de 91% y una sensibilidad moderada de 78%, con un valor predictivo positivo de 94% y una probabilidad de obtener resultados falsos positivos de solamente 0.071.

En medicina veterinaria, la citopatología se ha convertido en parte importante de la evaluación clínica, con frecuencia aportando información diagnóstica crítica, que a veces sirve a un problema cuando se comienza con detalles de la historia clínica y la anamnesis.

USO DEL HORNO DE MICROONDAS EN LA FIJACION DE

TEJIDOS PARA HISTOPATOLOGIA

Ardiano, B. ¹, Valera, G. ² **CENID-Microbiología, (INIP-SARH, Km 11) carretera México-Toluca, México DF 05110, ²Departamento de Patología, FMVZ-UNAM, Ciudad Universitaria, México D. F.**

Se ha descrito que las microondas pueden acelerar y mejorar el proceso de fijación de tejidos, tanto para histopatología, citología y microscopía electrónica. El objetivo de este trabajo fue comparar el grado de conservación del detalle celular en rñeros y hígados de ratones blancos, tratados en un horno de microondas como en técnicas usuales de fijación de tejidos y formalina emparrugada, comparándolos con la fijación convencional en formalina emparrugada a temperatura ambiente. Se utilizaron 5 ratones albino de cada sexo, aproximadamente iguales. Se inyectaron humanamente por desecamiento y se depositaron 0.6 g de hígado y rñero en frascos con 13 ml de los siguientes: 1 - Formalina emparrugada (10.4 ml 10% por 24 horas (H); 2 - FA 4% por cuatro h. junto con alcohol en un baño de microondas (10m) de 150 watts por el segundo (S); y posterior remojo en solución emparrugada de formalina (FAF) por 20 h; 3 - SAF como caso de control por 4 h y remojo en SAF por 24 h; 4 - SAF 4% con día hasta observar obtundición y remojo en SAF por 24 h. Los tejidos se autoseccionaron a patólogos emparrugados, quienes evaluaron en una escala del 0 al 9 el grado de preservación del detalle celular. Los resultados se analizaron por χ^2 . Los tratamientos, que proporcionaron la mejor preservación del detalle celular fueron el 1 y el 2. La preservación más deficiente del detalle celular fue por el tratamiento (1) (p 0.01). El uso de un horno de microondas en la fijación y desecación de los tejidos no tuvo efecto en la conservación de la formalina. Se concluye que, para fines prácticos conviene usar un horno de formalina por cuatro horas a temperatura ambiente por ocho segundos.

La información presentada es componente de la tesis de la primera autora, bajo la supervisión del segundo autor y con la participación del Consejo Técnico de la FMVZ-UNAM. Fue leído fue presentado en el III Congreso de la Sociedad Mexicana de Patología Veterinaria. Los autores agradecen la colaboración de E. Ibarra, R. Díaz y J. Juárez.

PROLIFERACION MITOTICA DE UN ADENOCARCINOMA MAMARIO INFIETADO EN EL RATON FLEMINGA M. BARRERA F.; MINERVA F. Facultad de Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Médicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de la Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Se conoce la presencia de protooncogenes citosólicos (c-fms) en las células alveolares de la glándula mamaria de la hembra de ratón. Dicho fenómeno también se ha observado en algunas neoplasias mamarias. Con el objeto de definir un modelo apropiado para ensayos cromosomológicos se diseñó el presente experimento.

Se tomaron muchas albinas de la cepa C57BL/6J, identificadas individualmente con un adencarcinoma mamario respiratorio, establecidas para análisis de productividad, se distribuyeron en lotes (6-7). Los mamarios se sacrificaron cada 4 horas a partir de la 00:00 h. durante un ciclo de 24 horas. Todos los animales recibieron colchicina 4 horas antes del sacrificio (2 mg/g) por vía IP. Muereas de tumor fueron fijadas en formalina emparrugada al 10 %, incluidas en parafina, cortadas a 5 μ m y coloradas con Hematoxilina-Eosina. Se recitaron, por animal, bajo objetivo de inmersión, 140 campos microscópicos de áreas compáreas. Se registró el número de núcleos metafásicos y no metafásicos y determinó el índice de metafases por 1000. Los resultados de cada grupo se expresaron por la \bar{x} \pm S.E. La significación de las diferencias se analizó con la prueba de χ^2 de Student. El valor máximo se encontró a las 16 h (37% \pm 1.61) y disminuyó a las 20 h (15.3% \pm 1.07), (p < 0.02). Conclusiones: El tumor establecido presenta un índice de metafases en la gástrica en la normal. El comportamiento del resultado hallado es preferencialmente útil para el diseño de experimentos que contemplan la distribución temporal de la fase M del ciclo celular, de la población neoplásica metafásica.

ÍNDICE

—A—

Anticuerpos:fluorescentes:para rabia, 8

—C—

CONCLUSIONES, 18

Cuestionario suministrado a los patólogos, 24

—D—

DISCUSION DEL EXPERIMENTO I, 15

DISCUSION DEL EXPERIMENTO II, 15

DISCUSION DEL EXPERIMENTO III, 16

DISCUSION GENERAL, 16

—F—

Fluorescencia:en rabia, 10

—G—

grupo 1, 3; 11; 12

grupo 2, 3; 11; 12; 15

grupo 3, 3; 11; 12

grupo 4, 4; 11

grupo 5, 5; 15

grupo 6, 5; 12; 15

grupo 7, 5; 12; 15

grupo 8, 5; 12; 15

grupo 9, 5; 13; 15

grupo 10, 7; 14; 16

grupo 11, 7; 13; 16

grupo 12, 7; 13; 14

grupo 13, 7; 14; 16

grupo 14, 7; 14

—I—

Inoculación en ratón para Dx de rabia, 6

INTRODUCCION, 2

—L—

LITERATURA CITADA, 19

—M—

Material y Métodos

Experimento I, 3

Experimento II, 4

Experimento III, 6

—N—

Negri, cuerpos de, 10

—R—

Rabia:inoculación en ratón, 6

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO I, 11

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO II, 12

RESULTADOS DEL EXPERIMENTO III, 13

RESUMEN, 1