

1985-I

REG. No. 80652569

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA
TEJIDO CONECTIVO.

MA. DE LOURDES RAMIREZ AGUILAR

" MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA
TEJIDO CONECTIVO " .

AUTOR:

MA. DE LOURDES RAMIREZ AGUILAR.

DIRECTOR DE TESIS:

M. V. Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA.

LUGAR DONDE SE REALIZO:

BIBLIOTECA DE CIENCIAS MEDICO-BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

A MIS PADRES:

Que con su esfuerzo hicieron posible la culminación de esta carrera.

A MIS HERMANOS:

Por su apoyo moral que me brindaron.

A MIS MAESTROS:

Principalmente a mi asesor de tesis por sus enseñanzas que siempre me guiaron hacia el bien.

- INDICE -

CONTENIDO:	PAG. No.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	4
PRIMERA PARTE: GENERALIDADES DE TEJIDOS.	
CAPITULO I	
3. Generalidades de los tejidos	5
- Concepto	5
- Definición de tejido	5
- Niveles de organización	5
- Clasificación de los tejidos	6
- Clasificación morfofisiológica	7
- Clasificación embriológica	7
- Clasificación según el estado de diferenciación	7
- Clasificación según la anatomía	8
- Clasificación según la cantidad de sustancia intercelular	9
- Histogénesis	9
- Proceso de crecimiento de los tejidos	9
- Diferenciación	10
- Factores que rigen la diferenciación	10
- Senectud tisular	10
- Necrosis	11
- Necrobiosis	11
- Metaplasia	11
CAPITULO II	
4. Generalidades de tejido Conjuntivo	12
- Definición y concepto	12
- Estructura general	12
- Tejido conectivo laxo	12

CONTENIDO:

Pag.No.

- Tipos hemopoyéticos de tejido conectivo	13
- Tipos de tejido conectivo resistentes, de sostén	13
- Tejido conectivo laxo	13
- Sustancia intercelular	14
- Fibras	15
- Fibras colágenas	15
- Fibras elásticas	17
- Fibras reticulares	18
- Las células conjuntivas	18
- Célula mesenquimatosa indiferenciada	19
- Fibroblastos	20
- Células macrófagas o histiocitos	21
- Células plasmáticas o plasmocitos	22
- Células cebadas o mastocitos	23
- Células pigmentarias	24
- Células adiposas	24
- Células de paso o polimorfonucleares	25
- Leucocitos	25
- Eosinófilos	25
- Linfocitos	26
- Sustancia fundamental amorfa	26
- Edema	28
- Variedades de tejido conjuntivo	29
- Tejido conjuntivo propiamente dicho	29
- Tejido conjuntivo laxo o areolar	30
- Tejido conjuntivo denso	30
- Tejido elástico	30
- Tejido reticular	31
- Tejido mucoso	31
- Histiología	31
- Almacenamiento	32
- Defensa	32

CONTENIDO:**Pag. No.**

- Reparación	33
- Transporte	33
- Efectos hormonales	33
- Factores nutricionales	34
- Tejido cartilaginoso	34
- Cartílago hialino	35
- Estructura histológica del cartílago hialino	36
- Las células	36
- La sustancia intercelular	36
- Otras sustancias químicas del cartílago	37
- Técnicas de estudio y afinidades tintoriales	38
- El cartílago elástico	38
- El cartílago fibroso	38
- Tejido óseo	39
- Composición química del hueso	39
- La lámina ósea	40
- Las células óseas	40
- La matriz intercelular	40
- Estudio microscópico del hueso	41
- Síntesis	41
- El hueso esponjoso	42
- Envoltura del hueso	42
- Osificación	43
- Tipos de osificaciones	43
- Evolución celular	45
- Depósitos de sales cálcicas	45
- Forma en que se depositan los minerales	46
- Núcleo de cristalización	46
- Formación de una laminilla ósea	47
- Osificación indirecta o endocondral	47
- Trastornos tróficos en el cartílago subyacente	48
- Penetración de los vasos osificantes	48

CONTENIDO

Pag.No.

- Osificación yuxtaparacondral	49
- Modelado del hueso	50
- Sangre	51
- Concepto	51
- Tipos de vasos	51
- Arterias	51
- Arterias de gran calibre o elásticas	51
- Histofisiología	52
- Elementos figurados de la sangre	52
- Parte sólida o elementos figurados	52
- Histogénesis	53
- Tamaño y forma	53
- Tipos de leucocitos	54
- Plaquetas	56

SEGUNDA PARTE: INSTRUMENTACION Y TECNICAS.

CAPITULO .III

5. Instrumentos y accesorios	57
- Técnica general para el estudio de los tejidos	57
- Instrumentos de observación y sus accesorios	57
- Microscopio	57
- Modo de emplear el microscopio	60
- Aparatos de corte	60
- Microtomo de tornillo	61
- Microtomo para cortes por parafina	61
- Microtomo para cortes por congelación	62
- Otros instrumentos	72
- Cámaras húmedas	62
- Cámara húmeda de portaobjetos	63
- Cámara húmeda de campana	63
- Cámaras calientes	63

CONTENIDO

Pag. No.

- Material de laboratorio 64
- Reactivos 66

CAPITULO IV

- 6. Métodos histológicos 69
 - Métodos analíticos 69
 - Examen en vivo 69
 - Líquidos orgánicos 70
 - Examen de tejidos íntegros o disociados 71
 - Examen de órganos transparentes 71
 - Cultivos celulares 71
 - Microcirugía 71
 - Disociación 71
 - Disociación mecánica 71
 - Disociación química 72
 - Composición química de los líquidos 72
 - Método de los cortes 72
 - Proceder de la congelación 73
 - Procederes que exigen la inclusión de las piezas en sustancias especiales 74
 - Fijado de las piezas 74
 - Induración 74
 - Nombres de algunos fijadores 75
 - Deshidratación 75
 - Disolventes empleados para la inclusión 75
 - Inclusión 75
 - Marcha de las operaciones necesarias para una buena inclusión 76
 - Inclusión en parafina 77
 - Procedimiento mixto 79
 - Seriación y montaje de los cortes en porta objetos 80

CONTENIDO:

Pag. No.

- Método de las coloraciones 81
- Consideraciones generales acerca de la coloración histológica 81
- Métodos generales en que se emplean colorantes orgánicos 83
- Métodos generales en que se emplean sales metálicas de impregnación 83

TERCERA PARTE: TECNICAS DE ESTUDIO E HISTOLOGICAS

CAPITULO V

- 7. Técnicas de estudio en histología 84
 - Técnica histológica 84
 - Técnica histológica corriente 84
 - Obtención de material 85
 - Fijación 86
 - Cualidades de los fijadores 87
 - Características de los fijadores 87
 - Acción del fijador sobre los tejidos 87
 - Desventajas de los métodos de fijación 88
 - Velocidad de penetración y velocidad de fijación 88
 - Coeficiente de endurecimiento 89
 - Variaciones de volumen y presión osmótica 89
 - Efecto de mordiente 89
 - Defectos de la fijación 90
 - Clasificación primaria de los fijadores 90
 - Fijadores simples 90
 - Fijadores compuestos 91
 - Agentes fijadores 92
 - Mezclas que contienen alcohol 95

CONTENIDO:

Pag. No.

- Mezclas que contienen ácido pícrico, ácido acético y formol	96
- Mezclas con bicromato de potasio	96
- Fijadores con tetróxido de osmio	97
- Mezclas fijadoras	97
- Fijadores generales y específicos	99
- Fijadores físicos y químicos	99
- Fijadores químicos	100
- Fenómenos lntimos de la fijación	100
- Selección de un fijador	102
- Modo de empleo de un fijador	102
- Técnica de fijación	103
- La fijación en la práctica	104
- Procedimientos particulares de fijación	105
- Fijación por criodesecación	105
- Fijación por congelación-disolución	105
- Inclusión	106
- Deshidratación	107
- Líquidos de conservación	108
- Inclusión en parafina	110
- Proceso de inclusión	113
- Inclusión en celoidina	114
- Proceso de inclusión	116
- Doble inclusión celoidina-parafina	117
- Diferencias entre la inclusión en parafina y celoidina	118
- Inclusión en gelatina	119
- Cuadro de resumen de los principales tipos de inclusión	121
- Cortes	122
- Microtomos y cuchillas	122
- Cortes en tejidos blandos	124

CONTENIDO:**Pag. No.**

- Cortes en parafina	125
- Corte del bloque	125
- Fijación del bloque y orientación	126
- Orientación de la cuchilla	126
- Corte y extensión	127
- Desparafinado y tinción	129
- Procedimiento por congelación	130
- Cortes por congelación	131
- Cortes en celoidina	132
- Tratamientos especiales	133
- Cortes en tejidos duros	133
- Procedimiento de tallado	133
- Técnicas de estudio de los materiales calcificados y su observación	134
- Procedimiento de descalcificación	134
- Descalcificación	134
- Métodos para descalcificación de huesos y dientes	135
- Ácidos inorgánicos en descalcificación	136
- Técnica de desgaste	137
- Extensión y aposiciones	137
- Coloraciones	138
- Naturaleza de los colorantes	139
- Propiedades de los colorantes	140
- Clasificación de los colorantes	140
- Métodos de coloración	142
- Coloraciones generales y específicas	142
- Coloraciones directas e indirectas	142
- Coloraciones progresivas y regresivas	142
- Coloraciones simples y combinadas	143
- Coloraciones panorámicas	144
- Coloraciones en bloque	144

CONTENIDO:

Pag. No.

- Impregnaciones metálicas	144
- Colorantes intravitales, supravitales y postfijación	145
- Colorantes neutros	145
- Colorantes naturales	146
- Colorantes artificiales o sintéticos	147
- Colorantes sintéticos ácidos	148
- Colorantes sintéticos básicos	148
- Colorantes combinados	149
- Técnica de la coloración con hematoxilina-eosina	149
- Coloración de May-Grünwald-Giemsa	151
- Montaje final	152
- Método empleado cuando es posible la deshidratación	153
- Método empleado cuando no es posible la deshidratación	153

CAPITULO IV

8. Técnicas histológicas

- Tejidos conjuntivos	154
- Fibras	154
- Fijación	154
- Métodos demostrativos de las fibras colágenas y reticulares	154
- Diferencia entre las fibras colágenas y las reticulares	155
FIBRAS RETICULARES	156
- Método de impregnación argéntica de Gomori	156
- Método de Río-Hortega para las fibras reticulares	157

CONTENIDO:

Pag. No.

TINCIÓN DIFERENCIAL DE LAS FIBRAS COLAGENAS, RETICULARES Y ELASTICAS	
- Método de Humason y Lushbaugh	158
- Método de doble impregnación en caliente de Río-Ortega para armazones fibrilares y células	162
- Método de doble impregnación con permanganato para armazones fibrilares	162
- Método de óxido de plata amoniacal para reticulina (segunda variante de Río-Ortega - al método Achúcarro)	163
FIBRAS COLAGENAS	
- Hemalumbre picrocarmín de índigo	164
- Métodos demostrativos de las fibras elásticas, sin poner de manifiesto las fibras colágenas y reticulares	165
FIBRAS ELASTICAS	
- Método de Unna con orceína-azul policromo	166
- Método de Fucsina-paraldehído	167
- Método de Gallego	168
- Método de Unna-Tänzer	170
- Método de Impregnación con carbonato simple en caliente	171
- Método de óxido de plata amoniacal para fibras elásticas	172
- Método de Gallego para fibras elásticas, modificación de Reyes Mota	173
- Métodos demostrativos de las fibras conjuntivas en general	174
MÉTODOS DE FIBRAS CONJUNTIVAS	
- Método de Salthouse (1965) con azul luxol	174

CONTENIDO

Pag. No.

CELULAS CONJUNTIVAS

- Método de verde de metilo-pironina 176
- Tinción con verde de metilo-pironina 176
- Otros métodos 177
- Método de Arvy y Gabe (1950) 177

ADIPOCITOS

- Método de rojo escarlata (sudan IV) para grasa 178

CELULAS CEBADAS

- Métodos combinados dobles:
 - Método de hematoxilina-eosina (hematoxilina de Harris-eosina alcohólica) 179
- Triples:
 - Método tricrómico de Gallego 181
- Metacrómicos:
 - Método de azul de toluidina para metacromasia 183
 - Método de azul de toluidina de Lillie para metacromasia 184
 - Método de tionina para células cebadas de Levine 185
 - Método de rojo neutro para células cebadas 186

CELULAS PLASMATICAS

- Métodos combinados dobles y triples (mencionado ya anteriormente en pags. Nos. 179 y 181) 187

FIBROBLASTOS

- Métodos combinados dobles y triples (Mencionados anteriormente) 187

MACROFAGOS

- Método de impregnación argéntica para macrófagos de Río-Hortega, variante de Costero 188
- Método de impregnación argéntica para macrófagos variante de Polak 189

CONTENIDO:

Pag. No.

SUSTANCIA FUNDAMENTAL Y MEMBRANA BASAL

- Método de Mann-Dominici 190

TINCIONES MONOCROMATICAS:

- Hematoxilina férrica 192

SUSTANCIA AMORFA

- Reacción metacromática 193
- Método de azul alciano para mucopolisacáridos 194
- Método azul alciano-Schiff para mucopolisacáridos 195
- Hemalumbre picrocarmín de índigo 198

METODOS DE DEMOSTRACION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS 199

- Triple coloración de A. Prenant 200
- Tricromico de Masson, variante de Golder 202
- Tricromico en un tiempo 203
- Tinciones con azocarmín-anilina o azan 205
- Azan de Heiderhain 205
- Azan de Romeis 207
- Otras variantes 208
- Tetracrómico de Herlant (1960) 208

SANGRE Y ORGANOS HEMATOPOYETICOS

- Elaboración de las preparaciones 210
- Fijación de las extensiones y aposiciones 210
- Tratamiento de piezas fijadas 211
- Métodos de tinción 211
- Azul policromo de Unna 212
- Triácido de Ehrlich 212
- May Grünwald-Giemsa 213
- Método panóptico de Pappenheim 214
- Tinción pancrómica de Pappenheim 215
- Tinción de azur-eosina de Lillie 216
- Método de Maximow 216
- Método de azul policromo-naranja G, variante de Unna 217

CONTENIDO

Pag. No.

- Método de Jacobson para sangre y médula ósea roja	218
- Método de Pappenheim (para frotis)	219
- Método de Wright (para sangre)	220
- Método de sudán negro B para grasas	221
- Método de Benzidina para hemoglobina	222
- Método de alizarina de Okajama (para hemoglobina)	223
LOS CAPILARES	
- Solución colorante	225
TEJIDO CARTILAGINOSO	226
- TEJIDO DENSO	226
TEJIDOS OSEOS	
- Tratamiento de huesos y otros tejidos	227
- Técnicas para médula ósea	230
- Método de la taza de agar	230
- Técnicas para muestras de huesos grandes	232
- Técnicas para tejidos óseos	232
- Notas sobre fijación	234
- Pruebas para descalcificación	235
- Prueba radiológica	235
- Prueba química	236
- Prueba de palpación	237
- Eliminación del polvo del hueso	238
- Eliminación del fluido de descalcificación	238
- Métodos individuales	238
- Fluido de Custer	238
- Acido tricloacético	239
- Acido nítrico-formalina	240
- Acido nítrico para muestras grandes	240
- EDTA	241
- Líquido de Müller	241
- Bajas descalcificaciones por congelación	242

CONTENIDO:

Pag. No.

- Von Kossa para sales de calcio 243
- Grandes preparaciones 244
- Otros métodos de descalcificación 245
- Método ácido 245
- Soluciones ácidas descalcificantes 246
- Combinación de ácido fórmico-ácido hidro-
clórico 247
- Soluciones para descalcificaciones electro
líticas 247
- Agentes penetrantes 248
- Ventajas 248
- Desventajas 249
- Métodos Versene 249

MEDULA OSEA Y CELULAS RELATIVAS

- Método de Barret para médula ósea 250
- Cromatropo 2 R 253

BIBLIOGRAFIA

254

INTRODUCCION

Este manual de técnicas histológicas para Tejido - Conectivo, dará a conocer los procedimientos histológicos, del cómo y el por qué son usados. Los métodos tratarán de satisfacer algunas de las necesidades de un laboratorio general de Histología, y serán descritos con suficiente detalle para ser entendidos con o sin previa experiencia.

La técnica histológica es el conjunto de recursos prácticos utilizados por los histólogos para evidenciar la estructura de los elementos anatómicos de los organismos.

Cada estructura particular de los tejidos requiere el empleo de varios métodos; es por esta razón que este manual va encaminado al conocimiento de las técnicas histológicas sólo para TEJIDO CONECTIVO el cual comprende -- el Tejido Conectivo propiamente dicho (laxo y denso, modelado y no modelado), tejido de propiedades específicas (cartilaginoso, óseo, hemocitopoyético (linfóide y mielóide), adiposo, reticular y mucoso).

Es importante que los estudiantes de Biología se familiaricen con algunas técnicas para el análisis de tejidos, ya que con frecuencia se ve que tienen que recurrir a una extensa variedad de bibliografía antes de poder localizar la técnica que requieren para su trabajo. En vista de esto se intuyó la necesidad de que existiera un Manual de Técnicas Histológicas, además de que también son útiles para la Embriología, Citología, Zoología, Patología, etc.

Existe la esperanza de que este manual despierte -

el interés, por ejemplo a aquellos estudiantes que necesitan saber acerca de Técnicas Histológicas sin tener la -
necesidad de practicarlas; este grupo puede comprender -
estudiantes tanto de Biología, Medicina, Veterinaria, --
Agricultura, y aún puede adiestrar a futuros patólogos.

No es intención que este manual deba contener una referencia completa sobre Histología, pero sí de los métodos especiales más usados; estarán incluidos principalmente aquellos que no son complicados y que están bien establecidos.

Se ha demostrado que la preparación de métodos presenta dificultades o requiere especial cuidado si se quiere que los resultados obtenidos sean buenos; se pretende detallar una guía para dar estas preparaciones, aunque debe considerarse que lo escrito no toma el lugar de la instrucción práctica.

Es importante presentar aspectos teóricos que frecuentemente presentan problemas al principiante.

Muchos de los métodos especiales de coloración usados en laboratorios de Histología no son tan específicos; algunos métodos han sido usados por muchos años y han sido modificados con el paso del tiempo; por esta razón se pretende investigar técnicas de preparación de tejidos, -
lo más actualizadas posible, tratando de utilizar la bibliografía más reciente.

Este manual está enfocado a la preparación de ciertos grupos de técnicas especiales para tejido conectivo -
que proporcionarán grandes servicios a los biólogos.

que precisan de las técnicas histológicas, ya que la ciencia histológica abre el camino al conocimiento químico de la célula.

OBJETIVOS:

- Tener la información necesaria y actualizada sobre las técnicas histológicas del Tejido Conectivo.
- Contar con el apoyo técnico necesario para la clase de Histología.
- Apoyar cualquier investigación que se realice en esta área.

CAPITULO I

GENERALIDADES DE LOS TEJIDOS

CONCEPTO

Los seres multicelulares provienen de la división de una célula huevo o cigota.

A medida que el número de células aumenta la tarea que cabe a cada una disminuye y llega a una situación tal que cada grupo de células se afecta a una función determinada.

Esto es en lo que Biología se conoce como principio de la división del trabajo.

Este reparto muy equitativo, lleva aparejado un perfeccionamiento morfofisiológico de los elementos celulares.

La diferenciación morfofisiológica de los elementos celulares, debida a la división del trabajo, da como resultado los tejidos.

DEFINICION DE TEJIDO

Es un conjunto de células y sustancia intercelular que tienen el mismo origen embriológico, semejantes morfológicamente y que cumplen en conjunto una función determinada.

NIVELES DE ORGANIZACION

La inercia de la naturaleza nos lleva siempre de lo más sencillo a lo más perfecto. De acuerdo con la ma-

nera de vivir y organizarse de cada organismo de la escala zoológica se pueden ubicar en determinados grados de complejidad. A estos grados de complejidad se los denomina: niveles de organización.

En la célula, la sustancia viviente se encuentra organizada a base de un núcleo y los elementos del citoplasma. Estas células pueden vivir completamente aisladas o agrupadas. Cuando se agrupan, pueden conservar su individualidad. Si por el contrario cada célula ocupa un lugar activo, en función del conjunto, hablamos de un tejido.

Los tejidos, por su parte, se conjugan para formar órganos. Los órganos, se relacionan para constituir los aparatos y sistemas.

En síntesis, podemos dejar sentados los niveles de organización: nivel celular - nivel colonial- nivel tisular - nivel organológico- nivel aparatológico o de sistemas.

CLASIFICACION DE LOS TEJIDOS

La clasificación de los tejidos puede encararse desde diferentes puntos de vista:

Los parámetros que se consideran son:

- a.- clasificación morfofisiológica
- b.- clasificación embriológica
- c.- clasificación según el grado de diferenciación
- d.- clasificación según la autonomía
- e.- clasificación según la cantidad de sustancia intercelular.

a.- CLASIFICACION MORFOFISIOLOGICA

Es la clasificación fundamental de la histología. Está referida a la forma y función de cada tejido. Se reconocen cuatro tejidos:

- 1.- epitelial
- 2.- conjuntivo
- 3.- muscular
- 4.- nervioso

b.- CLASIFICACION EMBRIOLOGICA

Los tejidos provienen de una de las tres hojas embrionarias. Cada tejido reconoce como origen una de las tres hojas (salvo el epitelial), y en consecuencia, los tejidos se clasifican en:

- a.- ectodérmicos: son el epitelial y el nervioso
- b.- mesodérmicos: son el conjuntivo y el muscular.
- c.- endodérmicos: el único tejido endodérmico es el epitelial.

c.- CLASIFICACION SEGUN EL GRADO DE DIFERENCIACION

Todos los tejidos comienzan por estar constituidos por simples láminas formadas por células adaptadas entre sí; luego sufren los distintos cambios de la diferenciación. En el tejido epitelial, por ejemplo, las células se multiplican y pueden dar varias capas. El tejido conjuntivo se caracteriza por la formación de una sustancia intercelular en cuya producción participan los elementos

celulares del tejido. Esta sustancia puede ser amorfa o tener forma. La sustancia amorfa puede ser líquida o sólida. En caso de presentarse en forma sólida se encuentra impregnada de sales minerales.

Dentro de los elementos con forma, tenemos los distintos tipos de fibras.

En el tejido muscular la diferenciación se hace por medio de la aparición en el citoplasma de unos elementos que reciben el nombre de miofibrillas. En las células nerviosas, reciben el aporte de otros elementos similares: las neurofibrillas.

Existen tejidos que sufren durante su existencia un continuo reemplazo de elementos. Por ejemplo, el tejido epitelial y el tejido conjuntivo. Otros, cuando alcanzan su máxima diferenciación, no pueden ser reemplazados. Por ejemplo, las células nerviosas.

Si se hace una síntesis de lo expuesto, diremos -- que de acuerdo con el grado de diferenciación se nos presentan los siguientes tipos:

- a- TEJIDOS MUY DIFERENCIADOS: Tejido muscular y nervioso
- b- TEJIDOS DISCRETAMENTE DIFERENCIADOS: Tejido epitelial
- c- TEJIDOS POCO DIFERENCIADOS O INDIFERENCIADOS: Conjuntivo.

d.- CLASIFICACION SEGUN LA ANATOMIA

Esta clasificación ha caído casi en desuso. Se basa en la capacidad que tiene un tejido para prescindir de los demás. Por lo tanto, tenemos tejidos autónomos y tejidos

combinados.

Tejido autónomo se considera el tejido conjuntivo. Combinados son el nervioso, muscular y epitelial. Clasificación muy teórica.

e. - CLASIFICACION SEGUN LA CANTIDAD DE SUSTANCIA INTERCELULAR.

Un tejido es el resultado de la unión de las células y la sustancia intercelular. Según la cantidad de sustancia intercelular mediante los tejidos pueden ser:

- a - Sustancia intercelular abundante: tejido conectivo
- b - Sustancia intercelular escasa: nervioso, muscular y epitelial.

HISTOGENESIS

Los tejidos del organismo se forman mediante un proceso llamado histogénesis.

Concretamente, el proceso histogenético es el resultado de dos procesos: el crecimiento y la diferenciación.

PROCESO DE CRECIMIENTO DE LOS TEJIDOS

Los tejidos poseen una capacidad que los impulsa a crecer indefinidamente. Sin embargo, esta tendencia de crecimiento indefinido se ve restringida por diversos factores. Estos factores en conjunto constituyen lo que se denomina: "mecanismo frenador".

Es importante destacar que el crecimiento de los tejidos se realiza por multiplicación celular (mitosis).

DIFERENCIACION

Cada tejido está destinado a cumplir una función determinada. Una vez que por crecimiento ha alcanzado un cierto volumen, la masa celular debe sufrir una serie de procesos que la modifiquen morfológicamente, que determinen la disposición y proporciones de los elementos, etc.- Este proceso se denomina diferenciación.

FACTORES QUE RIGEN LA DIFERENCIACION

Se citan dos tipos de factores: extracelulares e intracelulares. Los factores intracelulares son aquellos que provienen de la célula a seguir una evolución preconcebida. Factores extracelulares son los que gobiernan a la célula desde fuera de la misma. Pueden ser de orden mecánico, físico, químico, etc.

SENECTUD TISULAR

Es el envejecimiento paulatino de los tejidos. Sabemos que los tejidos se hallan asociados al tejido conjuntivo. Este tejido conjuntivo, como hemos de ver más adelante, se halla compuesto por células y fibras con la consiguiente sustancia fundamental. Por medio del conjuntivo, los tejidos se nutren. A medida que el tiempo pasa, va aumentando en el conjuntivo las fibras y aparecen gotas de grasa en el citoplasma celular. La sustancia fundamental por su parte, sufre procesos y comienza a perder su fluidez.

Si seguimos la evolución de los tejidos de una persona, veremos que a medida que pasa el tiempo hay una tendencia al équilibrio por parte de los mecanismos de cre-cimiento y diferenciación. Una vez logrado esto, este equilibrio se mantiene por un tiempo, comienza a continuación el proceso de senectud, que como se sabe, se debe a variaciones del tejido conjuntivo.

NECROSIS

Es la muerte brusca de las células que integran un tejido.

NECROBIOSIS

Es la muerte lenta de las células de un tejido; se debe a factores que actúan a largo plazo o bien por el mecanismo natural de nacer- crecer- reproducirse- morir.

METAPLASIA

Es la transformación de un tejido en otro que provenga de la misma hoja blastodérmica. Este concepto se usa más bien en la terminología patológica.

El proceso de metaplasia puede ser reversible o irreversible.

Un ejemplo de metaplasia es la transformación del tejido conjuntivo en óseo. En este caso, la metaplasia es irreversible.

CAPITULO II

GENERALIDADES DE TEJIDO CONJUNTIVO

DEFINICION Y CONCEPTO

El tejido conjuntivo es un conjunto de células caracterizado por poseer sustancia intercelular abundante, con gran capacidad evolutiva, de origen mesodérmico, autó nomo y que cumple con funciones de sostén, protección, re lleno y nutrición de los tejidos que se asocian, que son los restantes: muscular, nervioso y epitelial. Debido a esta conexión entre los tejidos se le denomina también - tejido conectivo.

ESTRUCTURA GENERAL

Para facilitar el estudio se generalizará el concepto mediante un cuadro sinóptico.

TEJIDO CONECTIVO LAXO

- Sustancia intercelular o fundamental.
 - + Amorfa
 - + Con forma o fibrilar
 - f. colágenas
 - f. de reticulina
 - f. elásticas
 - + Sus células
 - Fibroblastos
 - Mesenquimáticas
 - Histiocitos
 - Plasmocitos
 - Cebadas o mastzellen
 - Adiposas
 - Pigmentarias o cromatóforos
 - De paso.

TIPOS HEMOPOYETICOS DE TEJIDO CONECTIVO

- + Células sanguíneas
 - leucocitos
 - eritrocitos
- + Tejido mieloide
- + Tejido linfático-timo, ganglios, nódulos y bazo.

TIPOS DE TEJIDO CONECTIVO RESISTENTES, DE SOSTEN

- + Tejido conectivo denso dispuesto regular e irregularmente, y cartílago.
- + Hueso
- + Articulaciones

=TEJIDO CONECTIVO LAXO=

El tejido conectivo laxo se llama así porque es blando, plegable, y algo elástico, cualidades que le proporcionan sus sustancias intercelulares.

SUSTANCIA INTERCELULAR

Puede ser amorfa o con forma.

Bañando las células, las fibras y la sustancia fundamental amorfa, hay una pequeña cantidad de líquido llamado PLASMA INTERSTICIAL.

a - Amorfa

Toda célula de un ser multicelular tiene un medio que lo rodea y a través del cual recibe toda la nutrición. A través de este medio se realiza el intercambio metabólico.

Este medio es la sustancia fundamental amorfa intercelu- lar.

En el tejido conjuntivo la sustancia intercelular amorfa varía en cantidad según el tipo o variedad de teji do conjuntivo. El aspecto de esta sustancia fundamental es gelatinoso. Esta gelatina es un mucopolisacárido y particularmente el ácido hialurónico.

El ácido hialurónico tiene la propiedad de rodear a la célula permitiendo la difusión de las sustancias a través de su masa.

La sustancia fundamental es de naturaleza coloi- dal, y aunque se presenta al estado de gel, puede llegar a ser fluido como un sol, lo que tiene importancia en via bilidad de metabolitos intercambiables.

En el tejido cartilaginoso, la sustancia amorfa se halla en contacto con impregnaciones de ácido condroitin- sulfúrico, mientras que el hueso y tejidos dentarios duros tienen fosfatos y carbonatos de calcio.

b - Sustancia intercelular con forma o fibrilar.

Las fibras del tejido conjuntivo pueden ser de tres tipos: Colagenos
Elasticos y
Reticulares.

Los tejidos de este grupo desempeñan la función de: SOS- TEN, RELLENO, DEFENSA Y NUTRICION.

El tejido conjuntivo contribuye a la defensa del -

organismo por poseer células fagocitarias y células productoras de anticuerpos.

El papel que desempeña el Tejido Conjuntivo en la nutrición deriva de su íntima relación con los vasos sanguíneos.

Los tejidos conjuntivos se originan del MESENQUIMA, tejido embrionario caracterizado por poseer células con prolongaciones. Las células mesenquimatosas poseen núcleos ovoides con cromatina fina.

El mesénquima deriva de la hoja embrionaria media y se propaga por el interior del embrión envolviendo los órganos en formación y penetrando en ellos.

FIBRAS

Las fibras COLAGENAS, ELASTICAS Y RETICULARES, se distribuyen desigualmente entre las variedades de tejido conjuntivo.

FIBRAS COLAGENAS

Se les llaman así porque cuando se ponen a hervir por un tiempo forman gelatina, que sirve como cola. Son las más frecuentes del tejido conjuntivo; vistas en fresco son de color blanquecino, dando color a los tejidos donde predominan. Se hallan en todas las variedades de tejido conjuntivo. Se disponen en haces acintadas y ondulantes.

Los haces se entrecruzan en forma arbitraria y entre ellos se sitúan las células y la sustancia intercelular amorfa.

Un haz colágeno está integrado por fibras.

No son fáciles de ser estudiadas en cortes histológicos, más bien se hace un preparado por distensión, que no requiere ser cortado en microtomo.

Una fibra colágena, al microscopio óptico, se ve como una estriación longitudinal dentro del haz colágeno.

=Estructura de una fibra colágena=

Tiene un grosor de 15 micrones. Es flexible, pero inextensible.

La fibra colágena, al microscopio electrónico presenta estriaciones longitudinales muy numerosas y transversales, algo distanciadas. Cada fibrilla está compuesta por filamentos menores formados por moléculas de TROPOLAGENO. El tropocolágeno es el resultado del encadenamiento de aminoácidos, es decir: es una PROTEINA.

Este encadenamiento se constituye en TRIPLE HELIX. En su constitución entran la PROLINA y la HIDROXIPROLINA. La longitud de esta cadena es de 2.800 Å divididos en cuatro porciones de 700 Å debido a que está compuesta por cuatro encadenamientos unidos.

Las fibras colágenas son acidófilas y adquieren una coloración rosada con la técnica de H-E, azul con el Tricromo de Mallory y verde con el de Masson.

=Importancia de las fibras colágenas=

Son elementos muy importantes del organismo. Se -

encuentran formando parte de la matriz ósea, constituyendo los tendones y membranas aponeuróticas.

FIBRAS ELÁSTICAS

Las fibras elásticas se distinguen fácilmente de las colágenas por ser más delgadas y no presentar estriación longitudinal. Se ramifican y se unen unas a otras formando una trama de mallas muy irregulares. Tienen un color amarillento, cuando se observan en fresco y en gran cantidad. Debido a su color reciben la denominación de fibras amarillas del conjuntivo, a diferencia de que las colágenas son blancas.

Las fibras elásticas se tiñen mal e irregularmente con H-E. Pueden tomar la hematoxilina o la eosina, pero lo más común es que aparezcan sin teñir, cuando se usa esa técnica. Existen métodos selectivos, para demostrar las fibras elásticas, entre las cuales se incluyen la fucsina resorcina (púrpura), la fucsina aldehído (púrpura) y la orceína (azul oscuro).

Las fibras elásticas son sintetizadas por diferentes células, principalmente fibroblastos, condrocitos y células musculares lisas.

La proteína que las compone es la elatina, es resistente a la acción de los ácidos débiles y se puede digerir con una enzima que se denomina ELASTASA.

Las fibras elásticas se encuentran por ejemplo en los pulmones. Entran en la estructura del tejido conjuntivo denso elástico. En los pulmones, las fibras elásti-

cas colaboran en gran medida en la recuperación del volumen pulmonar, luego de la inspiración.

Es interesante decir que los álcalis y ácidos diluidos no las afectan, pero la TRIPSINA ALCALINA las ataca paulatinamente.

Su génesis no ha sido bien determinada, pero los investigadores sostienen la existencia de células precursoras: los ELASTOBLASTOS.

FIBRAS RETICULARES.

Son fibras muy delicadas comparables a las fibrillas colágenas que se disponen formando redes.

Se las denomina también precolágenas, ya que se ha supuesto que eventualmente se transformarán en colágenas.

En los preparados coloreados por hematoxilina-eosina, las fibras reticulares no son visibles, siendo su identificación realizada generalmente por medio de impregnaciones argénticas y de la Técnica de PAS, dado que las fibras reticulares son intensamente PAS-positivas. Aparecen de negro en las coloraciones argénticas, y las fibras colágenas adoptan una tonalidad de color castaño.

Las fibras reticulares son abundantes, formando la armazón de los órganos hematopoyéticos (p. ej., bazo, nódulos linfáticos, médula ósea roja).

LAS CELULAS CONJUNTIVAS

La división del trabajo entre las células del teji

do conjuntivo determina la aparición de varios tipos celulares cada uno con características morfológicas y funcionales propias. Se pueden clasificar en estables o propias y emigrantes o de paso.

=Células propias o estables=

Estas células son: mesenquimáticas indiferenciadas
 fibroblastos
 histiocitos o células macrófagas
 plasmocitos
 cebadas o Mastzellen o mastocitos
 pigmentarias o cromatóforos
 adiposas

=Células emigrantes o de paso=

Estas células son: Leucocitos.

CELULA MESENQUIMATOSA INDIFERENCIADA

El tejido conjuntivo se origina en el mesodermo embrionario. El tejido conjuntivo que aparece en esta hoja es el tejido mesenquimático, que es muy indiferenciado. Tiene gran cantidad de sustancia fundamental, células de aspecto estrellado, muy semejantes a los fibroblastos con prolongaciones ténues. Son células menores que los fibroblastos con núcleos alargados y de cromatina débil, citoplasma ligeramente basófilo, además de un centro celular, golgiso, retículo endoplasmático y mitocondrias.

Las células mesenquimáticas tienen gran capacidad de dividirse por ser netamente embrionarias. Su función fundamental es generar tejidos luego de la diferenciación.

FIBROBLASTOS

Célula más común del tejido conjuntivo y el principal responsable de la formación de fibras y del material intercelular amorfo.

Se le clasifica en dos tipos diferentes. Ciertos autores reservan la designación de FIBROBLASTO para la célula joven, llamando a la célula madura FIBROCITO.

El fibroblasto tiene prolongaciones citoplasmáticas irregulares; su núcleo es claro, grande, de forma ovoide, con cromatina fina y nucleolo evidente. El citoplasma es rico en retículo endoplasmático de superficie granular. El aparato de Golgi está bien desarrollado.

El citoplasma es basófilo. Las prolongaciones se anastomosan entre sí, con las otras células, o terminan en la sustancia fundamental.

La célula recibe aminoácidos, los procesa y forma el tropocolágeno.

Cuando la molécula de tropocolágeno se ha formado es eliminada a través de la membrana y se va ordenando en elementos fibrilares.

El fibrocito es una célula menor que tiende a ser fusiforme y con menor número de prolongaciones que el fibroblasto joven.

Tiene núcleo pequeño, alargado y más oscuro, presentando citoplasma acidófilo; hay deficiencia en retículo endoplasmático granular y en Aparato de Golgi.

Su función del fibroblasto es sintetizar colágeno y mucopolisacáridos de la sustancia fundamental amorfa.

CELULAS MACROFAGAS O HISTIOCITOS

Tienen gran capacidad de pinocitosis y fagocitosis; de ahí el nombre de macrófagos; pueden ser fijos o libres. Los fijos también se denominan HISTIOCITOS. Los libres son los que migran por medio de movimientos ameboides.

Los macrófagos fijos son fusiformes o estrellados; tienen núcleos ovoides con la cromatina condensada. En el tejido conjuntivo laxo, los macrófagos fijos son casi tan numerosos como los fibroblastos, con los cuales pueden ser confundidos.

El macrófago libre es más activo en la fagocitosis que el fijo.

Por estar dotados de motilidad y gran capacidad para fagocitar, los macrófagos actúan como elementos de defensa.

La célula realiza fagocitosis, almacenando selectivamente coloides electronegativos como son el Litio carmín, el azul tripan y la tinta china.

Su tamaño varía entre 25 y 30 micrones.

FUNCION FAGOCITICA.- Cuando inyectamos tinta china, la célula emite un pseudopodio que rodea la partícula a la que aloja en una depresión de la membrana. No se sabe perfectamente el mecanismo: si es que se hunde la partícula, si se hace más profunda la excavación o si los

bordes progresan y la partícula queda desglobada. Lo que sí, la partícula pasa a ser integrante de la célula.

Los histiocitos son derivados del mesénquima. Tiene importancia en los procesos de inflamación.

Los macrófagos tienen un papel importante en la eliminación de los restos celulares y los elementos celulares que se forman en los procesos involutivos fisiológicos.

Los macrófagos se originan de los monocitos, células de la sangre que atraviesan la pared de vénulas y capilares y penetran en el tejido conjuntivo, donde adquieren el aspecto morfológico del macrófago; el monocito se origina en la médula ósea.

CELULAS PLASMATICAS O PLASMOCITOS

Son células poco numerosas en el tejido conjuntivo normal, excepto en los lugares sujetos a penetración de bacterias y proteínas extrañas como la mucosa intestinal, pero aparecen en gran cantidad en las áreas donde existe inflamación crónica.

Estas células tienen forma ovoide, con citoplasma muy basófilo gracias a su RER. El aparato de Golgi y el centro celular se encuentran al lado del núcleo. El núcleo del plasmocito es esférico, con la cromatina en grupos compactos y toscos que se alternan con áreas claras de igual tamaño. El núcleo del plasmocito se encuentra en una posición excéntrica.

Son evidentes formadores de anticuerpos, cuando el

organismo recibe un cuerpo extraño. El elemento inyectado se denomina antígeno. El que forma el organismo, anti cuerpo.

Los anticuerpos circulantes encontrados en la sangre son sintetizados por los plasmocitos.

CELULAS CEBADAS O MASTOCITOS

Es una célula globulosa, grande, sin prolongaciones y con el citoplasma lleno de gránulos basófilos que se tiñen intensamente. El aparato de Golgi y los demás organoides no son muy notorios por ser enmascarados por los gránulos probablemente. Su núcleo es esférico y central, pero con frecuencia no es visible por estar cubierto por los gránulos citoplasmáticos. La cromatina es escasa al igual que las mitocondrias.

Las células cebadas son numerosas, pero son difíciles de observar en preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina. Se destacan en los cortes coloreados con azul de toluidina que tiñe los gránulos de color rojo. A esta capacidad de modificar la coloración del colorante, se llama METACROMASIA y se considera que es debida a la presencia de numerosos radicales ácidos en las estructuras. Se sabe que los gránulos de las células cebadas están constituidos principalmente por gluproteínas ácidas y neutras. Por tanto dan reacción PAS-positiva y se tiñen por el Azul Alcian.

Las células cebadas desempeñan probablemente un importante papel en los fenómenos de anafilaxia.

FUNCION.- Algunos autores lo llaman mastocitos. -

Está relacionada con la producción de dos sustancias fundamentales: la heparina y la histamina. La heparina tiene un gran poder anticoagulante y gran importancia farmacológica.

En la sangre evita que el fibrinógeno se transforme en fibrina. La histamina es una sustancia que produce la contracción del músculo liso provocando trastornos capilares.

CELULAS PIGMENTARIAS

Son características de ciertos animales (incluso al hombre). Son células con largas prolongaciones, con un núcleo central. En su citoplasma hay pigmentos abundantes. Son células pequeñas, pero sus prolongaciones pueden tener hasta 100 micrones. En el ser humano, el pigmento es la MELANINA que se activa gracias a los rayos ultravioletas del sol o lámparas especiales.

CELULAS ADIPOSAS

Se originan a partir de los fibroblastos. Estas se cargan de gotitas de lípidos que a su vez se agrupan. La grasa aumenta y desplaza al núcleo contra la periferia donde queda aplastado.

Una vez que la célula ha recibido toda la grasa que puede contener el núcleo, se desplaza totalmente contra la membrana plasmática. El citoplasma es apenas una franja. El resto es todo grasa. Da la sensación de ser un "anillo".

Este proceso es reversible, porque la grasa puede

abandonar la célula. Estas células adiposas son abundantes en una variedad de tejido conjuntivo: el tejido adiposo. El tejido adiposo se localiza debajo de la piel, en el abdomen, axilas, etc., ejerciendo función nutritiva y de protección.

Algunos animales que invernan poseen la llamada -grasa parda.

Las células adiposas son células especializadas en el almacenamiento de grasas neutras.

CELULAS DE PASO O POLIMORFO-NUCLEARES

Las células del torrente sanguíneo pueden formar parte del tejido conjuntivo, especialmente los glóbulos blancos que participan en los procesos infecciosos saliendo de los vasos y llegando hacia ellos.

LEUCOCITOS

O glóbulos blancos de la sangre, son células que se encuentran con frecuencia en el tejido conjuntivo, provenientes de la sangre por migración a través de la pared de los capilares y vénulas; en la inflamación hay un aumento en la migración de leucocitos.

En el conjuntivo normal los leucocitos más frecuentes son los eosinófilos y los linfocitos.

EOSINOFILOS

Su característica es que presenta gránulos cito--

plasmáticos acidófilos. Estos gránulos son lisisomas. - El núcleo del eosinófilo es bilobulado. Célula poco activa en la fagocitosis de bacterias y partículas extrañas. Una de las funciones de los eosinófilos es la fagocitosis del antígeno combinada con anticuerpos.

LINFOCITOS

Células pequeñas.- Tienen núcleo esférico con una leve escotadura, cromatina condensada. Citoplasma basófilo y escaso; es difícil su visualización en los cortes histológicos. Muchos son de vida muy breve y otros viven meses, tal vez años.

Los linfocitos son células poco diferenciadas capaces de dar origen a diversos tipos de células del tejido conjuntivo. Está demostrado que los linfocitos se diferencian en plasmocitos y macrófagos. Muy probablemente ambos pueden dar origen al HEMATOCITOBLASTO, que es la célula madre de las células sanguíneas. ?

SUSTANCIA FUNDAMENTAL AMORFA

Es incolora, transparente y ópticamente homogénea. Rellena los espacios entre las células y las fibras del tejido conjuntivo; es viscosa, por lo tanto forma una barrera a la penetración de partículas extrañas en el interior del tejido. Es de difícil observación al microscopio.

Los fijadores histológicos no la preservan adecuadamente apareciendo modificada en las preparaciones corrientes, en las cuales se ve entre los elementos figurados del tejido conjuntivo un material granuloso irregular

que representa los restos de la sustancia fundamental - amorfa parcialmente preservada y muy alterada.

Su preservación histológica es posible mediante técnicas de congelación y desecación, que consisten en la congelación rápida del tejido medio de baja temperatura - con nitrógeno líquido (-179°C), seguido por extracción de agua por sublimación a alto vacío y a temperatura aproximada de 30°C . En la primera etapa (congelación), el agua se solidifica instantáneamente y, en la segunda (desecación), se remueve sin pasar por el estado líquido.

Una vez fijada la sustancia fundamental amorfa, puede ser colorada por varios métodos, incluso por la técnica de PAS, observándose entonces que es homogénea y se distribuye rellenando los intersticios entre los elementos figurados del tejido conjuntivo.

La sustancia fundamental amorfa está formada por complejos de mucopolisacáridos y proteínas, que hoy se de nominan polisacaridoproteínas.

La casi totalidad del agua presente en la sustancia fundamental amorfa del tejido conjuntivo se encuentra en la capa de solvatación de los complejos de mucopolisacáridos con las proteínas. Esta agua sirve como vehículo para el paso por difusión de innumerables sustancias hidrosolubles, que se difunden en el tejido conjuntivo sin que haya movimientos de líquidos.

Existe en el conjuntivo, junto con la sustancia amorfa, una cantidad mínima de LIQUIDO INTERSTICIAL, cuya composición es semejante a la del plasma sanguíneo. El -

plasma intersticial contiene cantidades pequeñas de proteínas plasmáticas de pequeño peso molecular que atraviesan la pared de los capilares debido a la presión hidrostática de la sangre. En condiciones normales, la cantidad del líquido intersticial es insignificante.

EDEMA

El agua presente en la sustancia intercelular del tejido conjuntivo se origina de la sangre pasando a través de la pared de los capilares a los espacios intercelulares del tejido.

Hay dos fuerzas que actúan sobre el agua contenida en los capilares: una es la presión hidrostática de la sangre. La otra fuerza, que tiene sentido contrario, es la presión osmótica del plasma sanguíneo que atrae el agua hacia el interior de los capilares.

En resumen, en la mitad arterial de los capilares pasa agua de éstos al tejido conjuntivo y, en la mitad venosa, el agua pasa del conjuntivo a los capilares.

Existe un equilibrio perfecto entre el agua que entra en la sustancia fundamental del conjuntivo y la que sale de ella, de modo que la cantidad de agua libre es mínima en el tejido.

En condiciones patológicas diversas, la cantidad de líquido intersticial puede aumentar originando edema que se manifiesta en los cortes histológicos, por una separación mayor entre los elementos figurados del conjuntivo, provocada por el acúmulo del líquido hístico.

El edema puede ser provocado por obstrucción de los vasos linfáticos y en casos de cáncer, etc.

VARIETADES DEL TEJIDO CONJUNTIVO

Hay diversas variedades de tejido conjuntivo formadas por los constituyentes básicos (fibras, células y sustancia fundamental amorfa).

TEJIDO CONJUNTIVO

- Tejido conjuntivo propiamente dicho
- Laxo
- Denso
- Modelado
- No modelado

TEJIDO CONJUNTIVO DE PROPIEDADES ESPECIALES

- Adiposo
- Elástico
- Reticular
- Hemocitopoyético
- Mucoso

TEJIDO CARTILAGINOSO

TEJIDO OSEO

TEJIDO CONJUNTIVO PROPIAMENTE DICHO

No hay predominio acentuado de ninguno de los constituyentes, o si lo hay, es de fibras colágenas. En el primer caso se dice que el tejido es laxo y en el segundo, debido al predominio de las fibras colágenas, el tejido se llama denso.

TEJIDO CONJUNTIVO LAXO O AREOLAR

Es el tejido conjuntivo más común. Rellena los espacios entre las fibras y haces musculares, sirve de apoyo para los epitelios y forma una capa alrededor de los vasos sanguíneos y linfáticos. El tejido conjuntivo laxo, se encuentra en la piel, en las mucosas y en las glándulas.

Las células más comunes son los fibroblastos y los macrófagos. Las fibras colágenas, elásticas y reticulares, también están presentes.

El tejido conjuntivo laxo es de consistencia flexible y poco resistente a las tracciones.

TEJIDO CONJUNTIVO DENSO

Está formado por los mismos elementos estructurales hallados en el tejido conjuntivo laxo, con predominancia de fibras de colágeno. Las células son menos numerosas que en el tejido conjuntivo laxo, y entre ellas sobresalen las tracciones. Cuando las fibras colágenas se disponen en haces sin orientación fija tenemos el tejido DENSO NO MODELADO. En este tejido los haces forman una trama tridimensional; se encuentra en la dermis profunda de la piel.

El tejido DENSO MODELADO presenta los haces colágenos orientados según una organización fija. Los tendones son el ejemplo más típico del tejido denso modelado.

TEJIDO ELASTICO

Formado por fibras elásticas gruesas paralelas y -

organizadas en haces separados por tejido conjuntivo laxo. En estas fibras se observan fibroblastos aplanados.

La riqueza de fibras elásticas confiere al tejido elástico su color amarillo típico y una gran elasticidad. El tejido elástico es poco frecuente, encontrándose en donde es necesario, por ejemplo en los ligamentos amarillos de la columna vertebral, en el pulmón y los vasos arteriales.

TEJIDO RETICULAR

Constituido por fibras reticulares en íntima relación con células reticulares primitivas. Se halla en la médula ósea, vasos y ganglios linfáticos.

TEJIDO MUCOSO

Hay predominio de sustancia fundamental amorfa. Es de consistencia gelatinosa. Contiene fibras colágenas y raras fibras elásticas o reticulares. Las células son fibroblastos. El tejido mucoso es el principal componente del cordón umbilical, donde recibe el nombre de gelatina de Wharton; se encuentra también en la pulpa dental joven.

+HISTOFISIOLOGIA+

Los tejidos conjuntivos desempeñan las funciones de sostén, relleno, almacenamiento, transporte, defensa y reparación.

Las funciones de sostén y relleno son obvias, ya que los tejidos epitelial, muscular y nervioso, están - -

asociadas al tejido conjuntivo que les sirve de soporte - y muchas veces llena espacios entre células. La función de sostén se ve ejercida principalmente por parte de las fibras de tejido conjuntivo.

Las fibras colágenas forman los tendones, aponeurosis, cápsulas de órganos y las envolturas del sistema nervioso central. También constituyen trabéculas y tabiques en el interior de diversos órganos, constituyendo el elemento más resistente del estroma (tejido de sostén) de estos órganos.

ALMACENAMIENTO

El tejido conjuntivo propiamente dicho es de modo especial el tejido adiposo; almacena lípidos que representan una importante reserva nutritiva. Además, el tejido conjuntivo laxo, por su riqueza en mucopolisacáridos, almacena agua y electrolitos entre los cuales predomina el sodio.

DEFENSA

Diversos mecanismos de defensa dependen de las células del conjuntivo. Este tejido contiene células fagocitarias (macrófagos) y células productoras de anticuerpos (plasmocitos). Además, la propia sustancia amorfa, siendo viscosa representa una barrera a la penetración de las bacterias y partículas inertes que llegan al conjuntivo.

El tejido conjuntivo es el responsable de la inflamación que es una reacción defensiva contra elementos extraños que entran en el tejido conjuntivo.

Se forma un edema y se observa aumento de la temperatura en el área afectada.

REPARACION

Las áreas del conjuntivo destruidas por inflamación o por lesión traumática son reconstruidas por la proliferación del conjuntivo adyacente; este tipo de tejido está dotado de gran capacidad de regeneración.

El tejido conjuntivo formado para reponer áreas de destrucción histica constituye las cicatrices.

TRANSPORTE

El tejido conjuntivo transporta sustancias nutritivas de los capilares sanguíneos a los diversos tejidos del organismo. Transporta productos de desecho del metabolismo en el sentido inverso, es decir, de las células a los capilares sanguíneos y linfáticos.

EFFECTOS HORMONALES

Diversas hormonas influyen en el metabolismo del tejido conjuntivo.

La hormona adrenocorticotrópica (ACTH), tiene la capacidad de inhibir la fibrogénesis, retardando la cicatrización. También atenúa la respuesta inflamatoria. El cortisol inyectado actúa directamente sobre las células del conjuntivo, pero la ACTH actúa aumentando la síntesis del cortisol por la suprarrenal.

La ACTH cortisol como la cortisona, tienen efectos benéficos sobre las enfermedades del colágeno. En este tipo de enfermedades ocurren modificaciones en las fibras del conjuntivo como en la sustancia fundamental amorfa. - Se consideran enfermedades del colágeno las siguientes: - fiebre reumática, artritis reumatoidea, lupus eritematosos y poliartritis nudosa, etc.

FACTORES NUTRICIONALES

La deficiencia de vitamina C causa el escorbuto, - enfermedad que consiste en una degeneración generalizada del tejido conjuntivo. Sin la vitamina C, los fibroblastos no sintetizan colágeno, y las fibras destruidas no son substituidas.

TEJIDO CARTILAGINOSO

También llamado cartilago, tiene consistencia rígida. Su superficie es ligeramente elástica y muy lisa, - facilitando los desplazamientos. Desempeña la función de soporte, a la cual se suma la de revestir superficies articulares, facilitando los movimientos.

En el ser humano, el cartilago se ubica a nivel de laringe, tráquea, bronquios, en las superficies articulares de los huesos.

Embriológicamente tiene importancia porque el feto posee todo su esqueleto de naturaleza cartilaginosa.

El tejido cartilaginoso contiene células, los condrocitos y abundante material intercelular que forma la -

matriz. Representa uno de los primeros tejidos adaptados para soportar peso.

La matriz está constituida por colágeno; la función de las células consiste en producir una matriz con características adecuadas y mantenerla en estado normal. La muerte de las células lleva a la degeneración de la matriz.

Las variaciones en la cantidad y tipo de fibrillas dan propiedades especiales al cartílago.

El tejido cartilaginoso no posee vasos sanguíneos_ siendo nutrido por los capilares del conjuntivo que lo no dea a través del líquido sinovial de las cavidades articulares. El tejido cartilaginoso tiene un metabolismo bajo.

Hay tres tipos de tejido cartilaginoso, clasificados de acuerdo con la abundancia y el tipo de fibra presente en la matriz:

- a- Cartílago hialino
- b- Cartílago elástico
- c- Cartílago fibroso

El cartílago hialino

UBICACION: Se lo encuentra fundamentalmente en la superficie en contacto de los huesos en las articulaciones, en los cartílagos de las costillas, en la nariz, tráquea, bronquios, etc.

Visto en fresco, se presenta en un color blanquecino-azulado, siendo notoria su transparencia.

Es el más común y cuya matriz posee una cantidad moderada de fibras colágenas.

NUTRICION: No recibe irrigación sanguínea. Se alimenta por inhibición.

ESTRUCTURA HISTOLOGICA DEL CARTILAGO HIALINO

Desde el punto de vista histológico, el cartilago hialino se compone de células y sustancia intercelular. La sustancia intercelular está formada por fibras enmascaradas por una sustancia fundamental de naturaleza condro-mucoide.

LAS CELULAS

Las células cartilaginosas reciben el nombre de condrocitos. Se agrupan en sitios especiales de la sustancia intercelular llamados lagunas. La célula cartilaginosa posee un núcleo grande y central que presenta un tenue reticuladõ interno.

Su citoplasma presenta gránulos de glucógeno, acúmulos de grasa y algunas veces pigmentos.

Se acepta que en la parte central del cartilago, las células se agrupan en masas compactas, mientras hacia la periferia (porción sub-pericondrial) lo hacen tendiendo a formar hileras.

LA SUSTANCIA INTERCELULAR

Se presenta como una masa homogénea. Está formada por una matriz colágena (fibras) que ha sido enmascarada

por una sustancia fundamental.

Para poder estudiar las fibrillas colágenas de la trama de la sustancia fundamental, hay que eliminar la sustancia que la encubre. Las fibrillas forman un fino reticulado.

Periféricamente, las fibras se ubican en forma paralela al pericondrio (envoltura del cartílago). En la parte central del cartílago, las fibras se ubican según un esquema radial.

En cuanto a la sustancia fundamental, hay que centrar nuestro interés en la composición química. Es un condromucoide, asociado con el ácido condroitinsulfúrico y con ciertos albuminoides.

El condromucoide es muy basófilo.

En el tejido adulto, se ubica cerca de los grupos celulares, en lo que se conoce con la denominación de matriz territorial.

Asociado al condromucoide, se encuentra el ácido condroitinsulfúrico.

Las sustancias albuminoides no aparecen en el cartílago embrionario, pero en el maduro se ubican entre las zonas más alejadas de las cápsulas o lagunas, denominadas éstas matriz interterritorial.

OTRAS SUSTANCIAS QUIMICAS DEL CARTILAGO

También contiene agua (en bastante cantidad= 68%),

sodio, potasio y cloro.

TECNICAS DE ESTUDIO Y AFINIDADES TINTORIALES

Siguiendo la técnica corriente, se denota que en las coloraciones aparecen zonas francamente basófilas y acidófilas. La parte más basófila es la cápsula, o sea el contorno inmediato de las lagunas.

Las fibras colágenas pueden ser observadas, pero luego de tratar el material con tripsina o ácidos diluidos.

El cartílago elástico

Entrando a considerar otra variedad de cartílago, nos encontramos con el elástico.

Estructuralmente, posee células y sustancia intercelular; la diferencia estriba en que aquí, en vez de existir fibras colágenas, hay fibras elásticas. Están dan al material un color amarillento.

En la parte central del cartílago, la malla de fibras es condensada y ancha. En cambio, en la periferia, la malla es más abierta.

UBICACION: Fundamentalmente se encuentra formando el esqueleto de elementos anatómicos que necesitan elasticidad. Por eso, lo hallamos en el pabellón de la oreja, epiglotis, algunos cartílagos de la laringe, etc.

El cartílago fibroso

Es un tipo especial de cartílago. Un tejido de - -

transición fundamentado por la función que debe cumplir . Por ejemplo, lo hallamos en los discos intervertebrales . Siempre está asociado a las articulaciones .

Estructuralmente, resulta de la comunión entre fibras colágenas asociadas en estrecha trama con células cartilaginosas .

Las fibras y las células se encierran en cápsulas comunes . La matriz que las contiene es de naturaleza hialina y su cantidad no es uniforme .

TEJIDO OSEO

Es otra variedad de tejido conjuntivo . Funcionalmente, cumple con varias funciones dentro de las que cabe recalcar: sostén, protección, hematopoyesis por intermedio de su médula, etc .

ESTRUCTURALMENTE: el hueso, por ser un tejido conjuntivo presenta: células, fibras, matriz intercelular . Sin embargo, la sustancia fundamental posee gran cantidad de precipitado de sales cálcicas .

COMPOSICION QUIMICA DEL HUESO

Un 75% es de naturaleza mineral; la sal predominante es el fosfato de calcio, que representa un 85% de las sales presentes . Luego sigue el carbonato de calcio, un 10% y cantidades menores de fluoruros y cloruros de calcio y magnesio .

Todo esto no significa que un hueso sea una masa calcificada simplemente . Muy por el contrario . Existe -

una real vinculación entre la parte inorgánica (mineral) y la orgánica de las estructuras. Si se destruyen los elementos orgánicos, las sales conservan tamaño y forma del hueso, pero pierden coherencia y color naturales.

Si extraemos las partes calcificadas el problema es similar. El hueso conservará su forma, pero no tendrá la resistencia y la rigidez que le confieren los minerales.

LA LAMINA OSEA

Es la base de la estructura del tejido.

Se halla formada por células, parte fibrosa y la matriz intercelular.

LAS CELULAS OSEAS

Reciben el nombre de osteocitos.

Son células morfológicamente aplanadas, más o menos ovoides, con prolongaciones que se internan en canales excavados en la matriz. En estado embrionario, se les denomina osteoblastos.

Se ubican en espacios celulares especiales u osteoplastos.

LA MATRIZ INTERCELULAR

Es fibrosa. Por medio del proceso de oscificación se va cubriendo por el precipitado de las sales minerales.

Presenta canaliculos en los que penetran las pro--

longaciones de los osteocitos.

Se disponen las fibras en haces delicados, conservando todas las de una misma laminilla la misma orientación.

ESTUDIO MICROSCOPICO DEL HUESO

Un hueso compacto presenta fundamentalmente canales longitudinales denominados conductos de Havers. A través de estos conductos pasan los vasos y nervios que irrigarán e inervarán el hueso. El canal de Havers, más las laminillas que lo limitan, concéntricamente dispuestas, constituyen un sistema de Havers u osteón. Todos los conductos de Havers se comunican entre sí de tal manera que conforman una red coherente que asegura la inervación e irrigación del hueso. A esto colaboran los canales de Volkmann, que se ubican oblicuamente o transversalmente al eje longitudinal del hueso.

Sin embargo, no todo el hueso se conforma de este modo. En la periferia, cerca del periostio, las laminillas se ubican paralelamente formando el sistema fundamental o circunferencial externo.

Existe además un sistema circunferencial interno que delimita la zona de los sistemas de Havers respecto de la médula del hueso o canal medular.

Entre una laminilla y otra, hay una sustancia cementante que se tiñe intensamente y que es matriz modificada.

SINTESIS

El hueso compacto posee una parte central en la

que abundan los sistemas de Havers u osteones. Hacia - - adentro (canal medular) y hacia afuera (periostio) hay la laminillas dispuestas circunferencialmente y en forma paralela.

Los canales longitudinales son los de Havers. Los transversales y oblicuos son los de Volkmann. Ambos están intercomunicados de tal forma que aseguran la nutrición del órgano.

Aparte de las fibras que integran las laminillas de hueso, existen otras que se ubican en una posición externa: son las fibras de Sharpey.

El hueso esponjoso.

Este tipo de hueso presenta las laminillas ubicadas irregularmente, entrecruzadas y dejando entre ellas algunos espacios.

Los sistemas de Havers que se encuentran son pocos.

Envoltura del hueso.

Los huesos poseen una envoltura externa que se conoce como periostio.

Además, por dentro, vale decir tapizando el canal medular, hay otra envoltura que se conoce como endostio. Tanto el periostio como el endostio tienen estructura fibrosa.

En el hueso esponjoso, las laminillas se disponen de tal modo que pueden derivar mejor las fuerzas que reciben.

OSIFICACION

Se denomina *osificación* al conjunto de mecanismos por medio de los cuales el tejido conjuntivo se transforma en tejido óseo, que por lo tanto es una variedad del tejido conjuntivo.

Mecanismos de osificación

Para estudiar más ordenadamente el proceso seguiremos la secuencia de los tres pasos que requiere la formación del hueso. Estos son:

1. *Procesos vasculares*: hay gran proliferación de elementos vasculares para nutrir al tejido conectivo sobre el cual se instalará el hueso o a partir del cual se formará.

2. *Procesos celulares*: se refieren a la diferenciación que hacen los fibroblastos del tejido para convertirse en células formadoras de hueso, o sea en osteoblastos.

3. *Procesos intercelulares*: están destinados a la formación de todos los elementos intercelulares previos al depósito de sales cálcicas y a éste en sí.

TIPOS DE OSIFICACIONES

Se consideran tres tipos de osificación:

- a- directa o endoconjuntiva
- b- indirecta o endocondral
- c- yuxtaparacondral.

Osificación directa.

Es aquella por la cual un tejido conjuntivo se va a transformar en un tejido óseo directamente y sin modificaciones de sustancias.

Centros de osificación

Cada hueso se forma a partir de varios puntos más o menos definidos llamados centros de osificación.

El primer fenómeno que aparece en el centro de osificación es un marcado aumento en la irrigación.

Luego, se multiplican y aumentan de tamaño los -- fibroblastos entre dos capilares vecinos, transformándose en osteoblastos.

Estas son células de 15 a 20 micrones de diámetro, con núcleo esférico u oval, citoplasma basófilo (color violeta), ácido ribonucleico y rico en enzimas, como fosfatasa alcalina. La sustancia fundamental se hace más abundante, las fibras colágenas densas de esa zona son rechazadas hacia la periferia, pero algunas quedan entre los osteoblastos incluidos en la sustancia fundamental.

Se producen cambios celulares, aparece la trama precolágena y se ordena como una densa red de fibras de reticulina.

La trama precolágena se acomoda entre los osteoblastos.

En la sustancia fundamental aparece la oselna o --

escleroproteína o sustancia cementante, que se ubica sobre la trama precolágena y la homogeneiza haciéndola invisible a las técnicas corrientes.

Las fibras reticulares homogeneizadas por la oseína forman la matriz orgánica.

EVOLUCION CELULAR

En el tejido conjuntivo adyacente los fibroblastos siguen multiplicándose y se disponen en hilera en el borde del esbozo óseo ya formado, constituyéndose a veces - una serie de osteoblastos tan continua que suele recibir el nombre de pseudoepitelial por su semejanza con la hilera de células que presenta el epitelio.

Algunos osteoblastos encerrados y fibrillas colágenas incluidas dan origen al depósito de nuevas laminillas de oseína. Al mismo tiempo, las zonas más profundas, que comenzaron a diferenciarse primero y que ya han terminado su proceso morfo genético, se van cargando de sales de calcio.

Pero en el tejido conjuntivo adyacente se mantiene el proceso de multiplicación de los fibroblastos y se sigue formando oseína, y el pseudoepitelio continúa retrocediendo.

Así, capa a capa, va formándose el tejido óseo.

Depósitos de sales cálcicas

Las sales que intervienen pueden ser detectadas - por análisis común o por análisis especializados. Así lo

gramos lo siguiente:

Análisis químico común: { carbonatos, citratos, calcio, fosfatos.

Análisis cristológico y microquímico { cristales de apatita { hidroxapatita
carbonoapatita
cristales de citratos de calcio

Forma en que se depositan los minerales.

Del metabolismo intermedio de los hidratos de carbono existe una sustancia: la glucosa-6-fosfato. Llega a la zona de osificación y es desdoblada por la fosfatasa alcalina (fosforilasa) en glucosa e ion fosfato. La glucosa sigue en la circulación. El ion fosfato, que es el que nos interesa en el proceso, se une al ion calcio que proviene de la sangre y forma una sal: el fosfato de calcio. Una vez que llegó a una formación óptima precipita en forma de cristales. El principal es la hidroxapatita, que químicamente es hidroxifosfato decacálcico.

$Ca_{10}(PO_4)(OH)_2$: fosfato decacálcico.

Como producto de desecho del ciclo de krebs, el anhídrido carbónico al estado de ion carbonato es englobado por la sal de calcio, que al unirse con el fosfato de calcio, forma un cristal llamado carbonoapatita.

Núcleo de cristalización

Es un lecho o estroma orgánico formado por mucoproteína, núcleo de cristal donde se va a realizar el primer depósito cálcico.

Formación de una laminilla ósea

El tejido en cuyo seno se forma la laminilla sólo posee sustancia fundamental, fibrillas, células conjuntivas estrelladas unidas en un sincicio por medio de puentes protoplasmáticos.

En la formación de laminillas, podemos describir dos etapas:

1. La aparición de la sustancia cementante
2. su impregnación con sales cálcicas.

Algunos autores consideran que la aparición de sustancia cementante es producida por la secreción de los osteoblastos; otros sostienen que es de origen humoral, por verdadera transformación de plasma intercelular pero aun en este caso se acepta que el osteoblasto segrega sustancias que determinan esa transformación.

Esta sustancia cementante amorfa es conocida también como sustancia preósea u oseína y ya de por sí es bastante rígida, asemejándose en cierta forma a la sustancia fundamental del cartílago.

Osificación indirecta o endocondral.

Es aquella en la cual se produce un reemplazo paulatino de tejido cartilaginoso por un tejido óseo, que siempre se forma por transformación del tejido conjuntivo. La base del cráneo, los huesos largos, la columna vertebral, se forman por osificación indirecta.

- 1- Formación del manguito óseo: se forma por osifi

cación del pericondrio en el centro de la diáfisis.

TRASTORNOS TROFICOS EN EL CARTILAGO SUBYACENTE

a- División celular: se divide, formando pilas de monedas (grupos isógenos), dando origen al cartílago seriado que consiste en una proliferación activa de las células cartilaginosas.

b- Formación de un cartílago hipertrofiado: cuando la nutrición es nula toman agua y comienzan a hincharse, formando un cartílago mal llamado hipertrofiado. Hay una degeneración de las células ex-seriadas.

c- Formación de cartílago calcificado: las sales de calcio precipitan en plena sustancia fundamental cartilaginosa y le dan una coloración más oscura con la hematoxilina.

Penetración de los vasos osificantes

Se originan en el mesénquima y penetran por medio de los capilares sanguíneos.

Los vasos osificantes atraviesan el manguito óseo y van penetrando a nivel del cartílago calcificado acompañado por la mieloplaxa. Las mieloplaxas son células macrófagas que comienzan a fagocitar las células muertas, que no les ofrecen resistencia; también reabsorben algunos tabiques calcificados, que separan grupos isógenos, y se constituye la zona trabecular, compuesta por tabiques a los que se denomina trabéculas directrices, porque rigen todo el proceso de osificación del cartílago calcificado.

Entre las trabéculas directrices encontramos vasos perforantes.

Estos vasos perforantes llevan, contra los restos del cartilago calcificado, a los fibroblastos que se disponen en hilera y constituyen el pseudo epitelio. Aparecen las fibrillas colágenas, se genera oséina y el pseudo epitelio retrocede dejando algunos osteoblastos incluidos. Ya tenemos la primera laminilla de hueso sin calcificar contra la trabécula directriz. Se forma luego una segunda laminilla y se calcifica la primera y así sucesivamente. Junto con los vasos osificantes, hay una invasión de mesénquima que va a formar una especie de médula ósea primitiva.

Los osteoclastos reabsorben las trabéculas, van formando tejido óseo a manera de laminillas y se dispone la médula ósea definitiva dada la menor o mayor cantidad de laminillas. La remodelación alcanza también al manguito óseo, siendo invadido el sector por los osteoclastos y por elementos conductores junto a las epífisis; queda un cartilago hialino para facilitar la posterior articulación de la pieza ósea.

Osificación yuxtaparacondral

Es aquella en que se realiza la formación de tejido óseo, a partir de un cartilago que le sirve de guía o molde.

Crecimiento.- Los huesos pueden crecer a lo largo y a lo ancho. A lo largo, por osificación endocondral, mediante los cartilagos de crecimiento que separan la diáfisis de las epífisis.

A lo ancho, por osificación perióstica. En realidad, es la aparición de nuevas laminillas al manguito.

MODELADO DEL HUESO

EXTERNO

Está ligado a todos los cambios de forma, que se producen por reabsorción y neoformación de su superficie, por la actividad del periostio.

INTERNO

Es la formación del interior del hueso. Se limita por la disposición de sus laminillas óseas.

S A N G R E

=SISTEMA VASCULAR=

CONCEPTO

El sistema vascular es el encargado de distribuir la sangre a las diferentes partes del organismo, así también llevar los desechos a los órganos de excreción o emuntorios.

Consta de una serie de órganos tubulares: arterias, venas y capilares, que reconocen al corazón como órgano central.

Estos tejidos son de origen mesenquimático.

TIPOS DE VASOS

Histológica y fisiológicamente los vasos sanguíneos se clasifican en arterias, venas y capilares.

ARTERIAS

DEFINICIÓN: Son elementos tubulares que conducen la sangre del corazón hacia los capilares de los tejidos del organismo.

=ARTERIAS DE GRAN CALIBRE O ELASTICAS=

Ejemplos: aorta, subclavia, etc.

ESTRUCTURA

Túnica interna: posee tres capas bastante definidas:

- a- capa de células endoteliales
- b- capa de tejido conjuntivo laxo
- c- limitante elástica interna

HISTOFISIOLOGIA

ARTERIA DE GRAN CALIBRE: Como tiene abundante tejido conjuntivo elástico, el pasaje de la sangre es uniforme, con lo que se evita la intermitencia.

ELEMENTOS FIGURADOS DE LA SANGRE

Sangre en general

La sangre es un tejido formado por células libres, y una sustancia intercelular líquida. Es la encargada de transportar a todo el organismo sustancias nutritivas, oxígeno, hormonas y productos de desecho hacia los emuntorios.

La parte líquida de la sangre se denomina plasma. La parte sólida se constituye mediante los elementos figurados de la sangre.

EN SINTESIS:

SANGRE	{	parte sólida: Elementos figurados	{	Glóbulos rojos
		parte líquida: Plasma		Glóbulos blancos
				Planquetas

PARTE SOLIDA O ELEMENTOS FIGURADOS

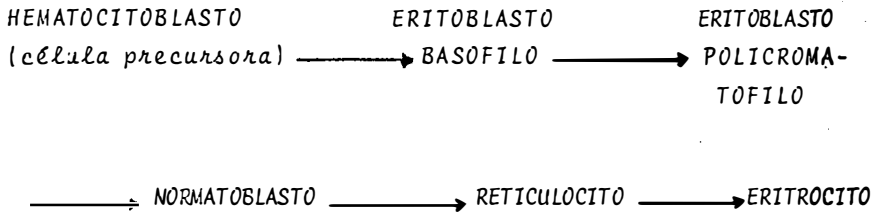
=Glóbulos rojos o eritrocitos o ematies o eritrocitos.=

Son células capacitadas para transportar oxígeno.-

Histológicamente el eritrocito maduro carece de núcleo y otros organoides. Aislados tienen un color amarillento-verdoso. Teñidos con la técnica de Wright toman un color rosado-anaranjado.

HISTOGENESIS

Se genera a partir de una célula precursora, el hematocitoblasto siguiendo el siguiente camino:



La vida media del glóbulo rojo es de 120 días, siendo reemplazado por otro.

TAMANO Y FORMA

Se asemejan a discos bicóncavos, cuyas dimensiones promedio son 7,7 micrones de diámetro; en su periferia poseen un espesor de 1.9 micrones. La forma de los eritrocitos puede variar, ya que son algo elásticos.

Los eritrocitos se hallan generalmente aislados, pero por fenómenos de tensión superficial, se disponen en hileras o pilas de monedas.

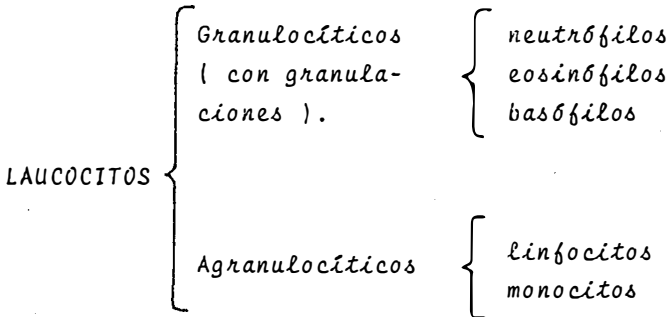
= Glóbulos blancos o leucocitos =

Son células nucleadas, con capacidad de moverse y

de salir de los vasos sanguíneos. Su número es varias veces menor que el de los eritrocitos ya que por cada 600 de éstos hay un leucocito. El aumento del número de glóbulos blancos se llama leucocitosis, y su disminución leucopenia.

TIPOS DE LEUCOCITOS

Los podemos clasificar de acuerdo a si poseen o no gránulos en su citoplasma, en granulocíticos y agranulocíticos.



=Granulocitos=

Se caracterizan por poseer granulaciones en su citoplasma y núcleos multilobulares. Además no pueden reproducirse por mitosis. Hay tres tipos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Neutrófilos: Miden entre 9 y 12 micrones y son los leucocitos más numerosos. Poseen un núcleo multilobulado que en conjunto parece una "S" o una "herradura".

Su nombre es neutrófilo. Está referido a la afinidad tinte de sus granulaciones y no de todo el cito-

plasma. En este caso toma el colorante neutro del compuesto de Romanowsky.

Los leucocitos neutrófilos pueden salir del torrente sanguíneo y fagocitar bacterias, por lo que se les denomina también microófagos.

Eosinófilos: Son más grandes que los neutrófilos. Al microscopio se ven como un núcleo polilobulado, pero el número de lóbulos es menor que en los neutrófilos. Sus gránulos se tiñen intensamente con el rojo neutro.

Su función no ha sido bien determinada. Poseen poca fagocitosis, pero presentan movimiento amiboide. En ciertos casos patológicos su número aumenta.

En caso de acción de la hormona hipofisaria A.C.T.H. (adrenocorticotrofina) o de la cortisona, el número de eosinófilos disminuye.

Basófilos: Su tamaño va de 8 a 10 micrones. De núcleo grande y poliformo aunque no hay una lobulación definida.

En el citoplasma hay gránulos basófilos de tamaño irregular. No se colorean uniformemente.

Su función es aún un misterio, aunque su número aumenta en ciertos estados patológicos.

=Leucocitos agranulocíticos=

Son los linfocitos y los monocitos.

Linfocitos: Se distinguen por tener un núcleo -- grande que se rodea por un anillo de citoplasma. El núcleo puede presentar una "muesca" lateral. La cromatina se presenta en la periferia del núcleo como granulaciones que hacen que éste se tiña muy oscuro.

El centro celular es diplosómico. Las mitocondrias escasas. Los linfocitos constituyen del 20 al 25% del total de los leucocitos.

En el citoplasma puede haber granulaciones denominadas granulaciones azurófilas.

Monocitos: Son células grandes. Representan del 4 al 8% de los leucocitos. El núcleo es menor que en los linfocitos. Tienen nucleolos y mitocondrias, un diploso-ma. Además debemos hacer notar la presencia de un aparato de Golgi. Las mitocondrias se presentan como una roseta. Hay también vacuolas que se tiñen con el rojo neutro.

PLAQUETAS:

Se denominan también tromboplastos o trombocitos.- Su número oscila de cerca de 200,000 a 300,000 por mm^3 .

Estructuralmente tienen una masa granulosa de porción central denominada cromómero, rodeada por otra o hialómero.

CAPITULO III

INSTRUMENTOS Y ACCESORIOS

TECNICA GENERAL PARA EL ESTUDIO DE LOS TEJIDOS

En la técnica general es preciso distinguir las siguientes partes: 1. Instrumentos de observación y sus accesorios. 2. Reactivos. 3. Métodos histológicos y 4. Procedimientos de conservación.

Todo esto en conjunto forma la técnica histológica.

INSTRUMENTOS DE OBSERVACION Y SUS ACCESORIOS

=MICROSCOPIO=

El microscopio es un instrumento óptico que, interpuesto entre un ojo y un objeto máximo, nos hace percibir en éste, detalles imposibles de observar a simple vista.

Si el instrumento amplificante consta de una sola lente o sistema de lentes, se denomina microscopio simple; pero si en él se combinan los poderes amplificantes de los lentes o sistemas de lentes toma la designación de microscopio compuesto.

MICROSCOPIO SIMPLE ESQUEMATICO.- Está representado por una lente biconvexa y planoconvexa, dispuesta de tal suerte que suministra una imagen virtual derecha y más grande que el objeto.

MICROSCOPIO COMPUESTO.- Consiste en un tubo provisto en sus extremos de dos lentes de aumento: la supe-

rior, que por aproximarse al ojo del observador se llama ocular y la inferior que por dirigirse al objeto toma el nombre de objetivo.

Todo microscopio compuesto, comprende una parte mecánica y una parte óptica.

La parte mecánica comprende el pie o estativo, el brazo o columna, la platina y el tubo principal.

El pie es el bloque de metal que sostiene el aparato.

El brazo es un grueso y fuerte prisma de metal que sostiene a las demás piezas: condensador, platina y tubo principal.

En él se encuentran los sistemas de enfoque; de esta parte se deben de tomar los microscopios para moverlos.

La platina es una placa horizontal de vidrio o de metal, donde se coloca el espécimen que se va a observar.

El tubo principal da soporte al revolver, que es sitio donde se montan los objetivos y el ocular.

La parte óptica consta de espejo o prisma, que refleja la luz de la lámpara; condensador, objetivos y oculares.

El condensador consiste en dos a cuatro lentes de gran apertura. Por delante de las lentes el condensador lleva un anillo giratorio, donde se inserta un diafragma, con una palanca de mando para abrirlo y cerrarlo. El condensador nos permite efectos de iluminación muy variados y -

Útiles.

Los objetivos son unos tubos con lentes, que se montan, atornillándolos al revolver; ellos reciben y amplifican la imagen. Los objetivos se diferencian por el número de veces que amplifican dicha imagen; los más usados son los secos, de 10X ó 12.5X, 40X ó 45X y el inmersión de 100X.

Los oculares son tubos cortos que constan de dos lentes: una distal, que concentra la luz y no coadyuva el aumento, y una proximal, que da el aumento.

ILUMINACION.- Es importante considerar la fuente de la energía que alimentará al microscopio; puede ser utilizada desde la luz solar hasta fuentes luminosas muy especializadas.

Lámparas de emisión de luz pueden estar independientes o incorporadas al microscopio; la luz se envía al sistema mediante un prisma o un espejo plano.

Ópticamente el microscopio compuesto funciona combinando los dos casos o condiciones en que las lentes dan imágenes amplificadas: el objetivo opera como una máquina fotográfica o a la manera de un aparato de proyección; es decir, que por residir el objeto más allá del foco principal, proyecta una imagen real, invertida y ampliada; y el ocular actúa como un microscopio simple, o sea formando de la imagen proyectada por el objetivo una copia virtual todavía más grande, derecha con relación a aquella, pero invertida con relación del objeto. Para que el ocular puede funcionar como microscopio simple, es preciso que reciba la imagen de proyección entre el foco princi-

pal y la lente superior.

MODO DE EMPLEAR EL MICROSCOPIO

- Enfocar la preparación a menor aumento hasta obtener una imagen lo más nítido posible.

- Subir el portacondensador hasta el tope.

- Cerrar el diafragma de campo de la lámpara, abrir el diafragma iris del condensador y bajando el condensador, enfocar el polígono, que se observa hasta que los bordes sean nítidos.

- Centrar el polígono de manera que al abrir el diafragma de campo, se ilumine toda el área que se observa, sin que sea el borde del diafragma.

- Regular la intensidad de la luz con el diafragma iris, hasta alcanzar la mejor nitidez y contraste.

- Cada vez que se cambia el objetivo, se debe enfocar con el tornillo micrométrico y rectificar la iluminación.

=APARATOS DE CORTE= (MICROTOMOS)

Los tejidos es necesario que ofrezcan transparencia, lo cual puede lograrse de tres maneras: mediante películas muy delgadas de tejido, disociando el tejido en sus elementos componentes, o reduciéndolo a cortes muy delgados. De aquí la necesidad de los llamados microtomos, cuya función es la ejecución de cortes finos, regulares, extensos y abundantes de los tejidos u órganos.

Son varios los microtomos que hay en la actualidad en los laboratorios; se pueden clasificar, considerando - el mecanismo en virtud del cual impulsan el objeto seccionable, en dos grupos: microtomo de tornillo y microtomo de deslizamiento.

MICROTOMO DE TORNILLO.- El más sencillo de los microtomos de esta especie es el llamado Ranvier. Consiste en un tubo coronado en un extremo por una plataforma; en el otro hay una tuerca donde se mueve un tornillo micrométrico vertical. El movimiento del tornillo empuja la pieza seccionable, que se fija dentro del cilindro mediante un relleno de pedazos de médula de sauco. La navaja - se desliza de plano sobre la plataforma, cortando la parte que sobresale del objeto.

Este microtomo está hoy casi del todo abandonado.- Ciertos fabricantes han perfeccionado este aparato, añadiéndole un pie y un tornillo micrométrico con rueda graduada para apreciar el espesor de los cortes.

Los microtomos de tornillo empleados actualmente son aparatos más complicados, donde el movimiento de la navaja y el ascenso del objeto se operan con gran regularidad y precisión.

MICROTOMO PARA CORTES POR PARAFINA.- Constan de - una base sólida y soportes verticales; uno de estos corre sobre un carril y lleva la pieza conductora de la navaja. Otros soportes sostienen la pieza que contiene la portaplatina y que tiene un mecanismo de ascenso y descenso. - Esta pieza está unida a una manivela; como la platina asciende automáticamente al resbalar, paralela a la navaja,

pueden hacerse cortes sucesivos del objeto seccionable, - regulando el grosor con el tornillo micrométrico.

MICROTOMO PARA CORTES POR CONGELACION.- Consta de una base que puede sujetarse al borde de una mesa; sobre esta base se encuentran las otras piezas, que son: platina, donde se coloca el bloque que se va a seccionar, debajo de la platina encontramos una cámara pulverizadora unida al tanque que contiene el gas, el cual es independiente; otra pieza indispensable es la navaja, que mediante un soporte, le brinda giro en arco de círculo. Ataca perpendicularmente a la pieza seccionable.

Permite obtener en pocas horas cortes finos de una pieza normal o patológica; hay un hecho comprobado de que los tejidos congelados no se alteran, si previamente fueron fijados en formol al 12%.

OTROS INSTRUMENTOS.- Pinceles para recoger los cortes de cuchilla del microtomo; paletas metálicas para trasladarlos al portaobjetos; pocillos de porcelana o de cristal para tratar las secciones con diversos reactivos; agujas para disociar y también para trasegar los cortes de un pocillo a otro; frascos goteros para lubricar la preparación, puesta en el portaobjetos, con líquidos aclaradores; tijeras, pinzas y escalpelos finos de disección, son enséres que nunca deben faltar en la mesa del micrografo.

CAMARAS HUMEDAS: Son aparatos destinados a evitar la desecación de las preparaciones microscópicas, bien durante la observación, bien durante las diversas operaciones de fijado, teñido, etc., de los elementos anatómicos. Existen dos tipos de cámaras húmedas: la llamada de

portaobjetos y la de campana.

CAMARA HUMEDA DE PORTAOBJETOS.- Es una lámina de cristal, en cuyo centro ha sido esculpido un surco circular. Su empleo es el siguiente: se pone en el surco una gota de agua, y en el área rodeada por aquél, la preparación viva cuyos elementos deseamos estudiar; el todo se cubre con una laminilla que puede cementarse al portaobjetos. La evaporación del agua en la cámara de aire que circunda la preparación evita la desecación de ésta.

CAMARA HUMEDA DE CAMPANA.- Se emplea para mantener húmedos los preparados microscópicos mientras dura su teñido.

Consiste en un recipiente semillero de agua, del que sobresale un apoyo de cristal donde se mantienen las preparaciones. El todo se encierra con una campana de vidrio, con lo que el aire interior se satura de humedad, impidiendo la desecación de los objetos.

CAMARAS CALIENTES.- Son aparatos de tipo de las incubadoras, cuyo fin es mantener la preparación durante el examen micrográfico, a una temperatura de 37 a 40°. Estos aparatos son indispensables para la observación de las células vivas de los animales de sangre caliente, y se emplean asociados a la cámara húmeda portaobjetos.

Casi todos los modelos de cámara caliente se reducen a una caja metálica de paredes huecas, que se coloca en la platina del microscopio, y por cuyo interior circula agua caliente.

Todos estos aparatos tienen el inconveniente de

que no se sabe a punto fijo cuáles la temperatura a que se halla la preparación, pues encontrándose ésta bañada por capas de aire continuamente renovadas, sufre grandes alternativas de calor y frío.

MATERIAL DE LABORATORIO

= CRISTALERIA =

1) VASOS DE PRECIPITADOS GRADUADOS Y NO GRADUADOS.

Se usan para colocar sustancias que no sean volátiles, concentradas o corrosivas.

Existen pequeños vasos de 10cc especiales para reactivos argénticos, mejor conocidos como pocillos de Río-Hortega.

2) MATRACES GRADUADOS Y NO GRADUADOS.

Se usan para la preparación de reactivos, como colorantes, alcoholes, etc., y para hacer diluciones o mezclas.

Se usan también para calentar sustancias.

3) PRÓBETAS Y PIPETAS GRADUADAS.

Se emplean en la elaboración de reactivos y soluciones, para medir con precisión los volúmenes de líquidos que se requieren.

4) CAJAS DE PETRI. CAJAS Y VASOS DE KOPLIN.

Se utilizan en la elaboración de técnicas de tin-

ción, y se colocan los cortes libres, en cuyo caso se -- usan cajas de petri o adheridos al portaobjetos, utilizán dose entonces las cajas o vasos de koplín, para teñir cor tes en serie, por inclusión o frotis.

5) FRASCOS GOTEROS

Para guardar reactivos no corrosivos.

6) FRASCOS CON TAPON ESMERILADO PARA REACTIVOS

Se utilizan para guardar reactivos, en especial - los corrosivos, frascos transparentes o de color ámbar; - los primeros para reactivos que no sufran cambios por la acción de la luz, y los segundos cuando se dé el caso con trario.

7) CRISTALIZADORES.

Ideales para efectuar baños sobre otros recipien-- tes que contengan sustancias a las que se desea elevar o bajar la temperatura.

8) VIDRIO DE RELOJ.

Se emplean para hacer pequeñas mezclas, enjuagues o tinciones de pocos cortes, o para cubrir recipientes.

9) FRASCOS DE BOCA ANCHA CON TAPON DE ROSCA.

Se utilizan en la enseñanza, para realizar la fi ja ción de los órganos y para la preparación de las piezas de platina que van a ser incluidas en la parafina.

En los laboratorios de investigación o de técnica, son menos empleados.

10) COBREOBJETOS Y PORTAOBJETOS

Son láminas delgadas de cristal; sirven para montar y cubrir los preparados destinados a la observación microscópica. El tamaño y delgadez varía, para adaptarse a las dimensiones del preparado.

11) EMBUDOS

Indispensables en la preparación de reactivos, íntimamente ligados al uso del papel filtro o algodón de vidrio.

12) OTRO MATERIAL

Algunos accesorios indispensables para la elaboración de técnicas: ganchos de vidrio, agitadores, agujas de disección, necesarios para manejar los cortes y etiquetas, charolas y cajas para manejar las preparaciones.

=REACTIVOS=

Se denominan reactivos a las sustancias que producen en los tejidos, modificaciones físicas o químicas.

Son múltiples los reactivos empleados, y se clasifican de acuerdo a las modificaciones que provocan en los tejidos. Así tenemos reactivos fijadores, aclaradores, opacantes, aisladores, ablandadores, inofensivos, colorantes y conservadores.

1) REACTIVOS FIJADORES

- Detienen o minimizan las alteraciones post-mortem.

- endurecen los tejidos.
- ejemplos de reactivos: alcohol, ácidos crómico acético, pícrico, ósmico, cloruro de platino, bichloruro de mercurio y formol al 10%.

2) REACTIVOS ACLARADORES

- borran o moderan los índices de refracción de los elementos tisulares.
- ejemplos de reactivos: esencias o aceites de clavo, de cedro, o de orégano, xilol y creosota.

3) REACTIVOS OPACANTES

- oscurecen el contorno celular y roban transparencia a la precipitación.
- ejemplo de reactivos: aire, alcohol, éter, agua corriente.

4) REACTIVOS AISLADORES

- liberan los elementos celulares de los tejidos.
- ejemplo de reactivos: ácido nítrico al 25%, potasa al 40%, alcohol al 30%, ácido sulfúrico diluido, ácido pícrico a saturación, etc.

5) REACTIVOS ABLANDANTES

- reblandecen a los tejidos duros (hueso y dientes).
- ejemplo de reactivos: ácido nítrico, tricloa-

cético, crómico, clorhídrico y pícrico, en soluciones diluidas a excepción del pícrico (saturación).

6) REACTIVOS INOFENSIVOS

- se les llaman también soluciones o sueros fisiológicos.
- alteran poco o nada la forma y vitalidad de los elementos celulares.
- ejemplo de reactivos: soluciones salinas (líquido de Ringer, de Locke, o cloruro de sodio 0.9 g disuelto en 100cc de agua destilada).

7) REACTIVOS COLORANTES

- permiten distinguir detalles estructuralmente invisibles.
- pueden ser de dos tipos generales:
 - a) colorantes naturales, extraídos de productos naturales o vegetales, como el carmín, la hematoxilina, la orceína y la safranina.
 - b) colorantes artificiales: colorantes de anilina, colorantes de carbón o colorantes sintéticos.

8) REACTIVOS CONSERVADORES

- protegen a los tejidos de la putrefacción.
- conservan el color.
- evitan cambios que pudieran sufrir las preparaciones histológicas.
- ejemplos de conservadores: la glicerina, bálsamo de Canadá, resinas sintéticas, gelatina, licor de Apathy y licor de Ferrant.

CAPITULO IV

METODOS HISTOLOGICOS

METODOS HISTOLOGICOS.- Conjunto de operaciones - destinadas a ver la disposición estructural de los tejidos.

- METODOS ANALITICOS.**- Pueden ser cinco: - examen en vivo - con los cultivos celulares (permite ver la multiplicación).
- microcirugía (aisla porciones celulares).
 - disociación (presenta células -- aisladas).
 - método de los cortes (cels. en actitudes naturales)
 - método de las coloraciones (destaca determinados - elementos).
 - método de las inyecciones (relle-no de cavidades - orgánicas).

EXAMEN EN VIVO.- Puede realizarse en líquidos orgánicos, en tejidos disociables, en membranas transparen-

tes del animal íntegro, en plasma extraído del cuerpo del animal.

LIQUIDOS ORGANICOS.- La observación de los humores vivos, es de las más sencillas, por ejemplo: sangre, linfa, esperma, etc. En el centro del portaobjeto se deposita la gota de líquido que se desea examinar, se cubre rápidamente, para evitar la intrusión de microbios, se cementa con parafina.

EXAMEN DE TEJIDOS INTEGROS O DISOCIADOS.- Los pedazos de tejidos separados, podrán mantenerse vivos por medio de cámaras húmedas (varias horas). Para evitar la muerte rápida de los elementos, la disociación preliminar de las células debe ser muy ligera. Los cubreobjetos no deben oprimir la preparación.

EXAMEN DE LOS ORGANOS TRANSPARENTES.- El mesenterio, pulmón, lengua del renacuajo, etc., constituyen órganos adecuados para la observación microscópica de algunos tejidos vivos, como son: nervios, los vasos de la sangre, linfa, tejido conectivo, etc. Para inmovilizar al animal se le añade al agua donde se encuentra unas gotas de solución (curare) 1/100 para inmovilizar a la rana, se evitará la desecación de la piel mojando de cuando en cuando. El mesenterio de la rana se presta muy bien debido a la delgadez y transparencia, al estudio de vasos, sangre y corpúsculos de tejido conectivo.

Para examinar mesenterio en conejilla de indias (circulación). La inmovilización se efectúa inyectando hidrato de cloral 2 ó 3 g. de solución acuosa al 5/100.

CULTIVOS CELULARES.- La idea de mantener las célu

las vivas "in vitro" es ya antigua. A. Harrison (1907) colocó ganglios raquídeos de larvas de rana en linfa coagulable, verdaderos cultivos de tejido. Carrel y Burrows - sustituyeron linfa por plasma, aplicándolos a tejidos -- adultos. Los Lewis (M.R. y W.H.) sustituyeron el plasma por el líquido de Locke con el medio por ciento de glucosa.

Harrison y Burrows, aconsejan para preparar plasma, recibir sangre de un animal vivo o recién muerto, en un tubo interiormente parafinado, se va a la centrífuga - para descartar hematíes. La peptona también evita la coagulación, pudiéndose obtener plasma nutritivo, se mantiene en estufa y cámara húmeda durante algunos días. Reducido el fragmento a 1 ó 2 mm, se lava rápidamente con líquido Ringer, se esteriliza, se monta en cubreobjetos, bañándolos en una gota de plasma, la laminilla portadora de tejido se coloca, con la gota del conservador hacia abajo, sobre el portaobjetos excavado, cuyo fondo esté humedecido con líquido ringer. Preparados los cortes (parafinados) se van a la estufa a 37°. Se renueva el plasma del cultivo cada 24 a 48 horas, lavando los trozos histológicos.

MICROCIRUGIA.- o microvivección y microdisección, método que tiene por objeto realizar secciones en las células dentro del campo del microscopio.

DISOCIACION.- Se puede efectuar por acción mecánica y/o acción química.

DISOCIACION MECANICA.- Recae en tejidos blandos, como muscular, nervioso, fibroso, cristalino; están constituidos por filamentos largos. La disociación se ejecuta

ta sobre un portaobjetos, colocado encima de un fondo negro o blanco, según el tipo de tejido. El desmenuzamiento se efectuará con agujas enmangadas, y bajo una gota de líquido indiferente. En muchos casos se facilita mucho la operación con el microscopio simple.

La compresión de tejidos frescos, la dilución de líquidos cargados y la inyección de estos mismos líquidos son procedimientos mecánicos que pueden aplicarse con provecho.

DISOCIACION QUIMICA.- Se obtiene por medio de -- reactivos que disuelven el cemento separatorio de las células. Por ejemplo, cuando el epitelio aparece desintegrado y es fácil trasladar células sueltas al portaobjetos, que se tiñen con hematoxilina o con picrocarminato.- La potasa al 40/100; ácido nítrico al tercio, líquido metílico de Schiefferdecker; líquido Landois, serán útiles en casos especiales.

=COMPOSICION QUIMICA DE LOS LIQUIDOS=

- Líquido metílico de Schiefferdecker: agua, 20; glicerina, 10; alcohol metílico.

- Líquido de Landois: Solución saturada de bicromato amónico neutro, 5; solución saturada de fosfato potásico, 5; solución saturada de sulfato sódico, 8; agua 100.

=METODO DE LOS CORTES=

Conjunto de operaciones que deben realizarse para conseguir secciones delgadas y transparentes de un órgano o tejido.

Se debe tener cuidado al obtener las secciones de los tejidos; cuando los tejidos son blandos o son duros, casi pétreos.

A. CORTES EN TEJIDOS BLANDOS.- A este tipo de tejido hay que darle una consistencia adecuada. Se puede alcanzar por congelación o inclusión. Los fijadores o indurantes no son muy seguros.

- PROCEDER DE LA CONGELACION.- La congelación se obtiene por evaporación de anhídrido carbónico líquido - en el microtomo.

PASOS PARA LA PREPARACION DE TEJIDOS EN ESTOS CASOS:

I. FIJACION.- Es conveniente y muy necesaria la fijación, ya que muchas de las materias que integran los tejidos se encuentran en estado semisólido, disgregándose los cortes al descongelarlos. Se hace de preferencia en disolución de formalina del 10 a 20/100 de 24 horas en -- adelante, pero también otras piezas que hayan sido fija--das en alcohol pueden ser cortadas por congelación, si se les tiene en agua algunas horas para que se laven e hidraten.

II: LAVADO.- Por pocos minutos para extraer el - exceso de formol.

III. BLOQUE DE SECCIONES.- (1/2 cm. de espesor) - se coloca en plataforma sobre un trozo de papel chupón humedecido (microtomo).

IV.- CONGELACION.- Se obtiene abriendo en intervalos la llave de salida de gas; hay que dar tiempo para -

que el frío producido en la plataforma se propague a través de la pieza, se observa cambio de color de la porción congelada.

V. CORTES.- Cuando la congelación ha llegado a la parte superior, se comienza a contar. Cuando la congelación no es suficiente los cortes se desgarran, y cuando están demasiado congelados tienden a arrollarse; en este caso se puede ayudar con el calor de la mano.

VI. TRASLADO DE CORTES.- Por medio de los dedos, o con un pincel, sin comprimirlos, a una vasija con agua o formalina al 4/100 donde se extienden y se conservan hasta su siguiente destino.

En tejidos muy duros, o que hayan sufrido la acción de indurantes enérgicos, tejidos que tengan grandes huecos, es conveniente la inclusión, que permite obtener cortes más finos.

PROCEDERES QUE EXIGEN LA INCLUSIÓN DE LAS PIEZAS EN SUSTANCIAS ESPECIALES.- Organos blandos, parenquimatosos, por ejemplo: ovario, hígado, intestino, médula, ganglios, etc. deben de dárseles el endurecimiento conveniente: fijación, induración y encastramiento o inclusión.

+ FIJADO DE LAS PIEZAS.- Por medio del fijador, el cual varía según lo que queramos demostrar.

+ INDURACION.- Se extrae la pieza del líquido fijador, se lava en abundante agua (no cuando se utiliza alcohol absoluto) y se sumerge en alcohol o en acetona.

El endurecimiento en alcohol es obligado de toda -

la acción fijadora conseguida con otros reactivos; excepción hecha sólo con los tejidos destinados a la congelación.

En el alcohol se permanece de 2 a 3 días después de la fijación.

- NOMBRES DE ALGUNOS FIJADORES: ácido ósmico, licor de Flemming, bicloruro de mercurio, licor de Kleinenberg, formol, etc.

+ DESHIDRATACION.- Se efectúa con alcohol absoluto, si se quiere que la masa de inclusión penetre.

DISOLVENTES EMPLEADOS PARA LA INCLUSION: Éter, cloroformo, xilol, esencias, etc.

+ INCLUSION.- Operación por la cual se hace penetrar en el espesor de la pieza deshidratada por el alcohol una materia solidificante, que lleva al máximo la consistencia del tejido y facilita la ejecución de cortes.

Lo que más se emplea es inclusiones en parafina y celoidina.

Otros métodos de inclusión son: inclusión en jabón, en albúmina, en agar-agar, en goma, etc.

a) INCLUSION EN CELOIDINA.- (M. Duval) sirve primeramente de coloidon espeso, dinitrato de celulosa. Desde Schiefferdecker, se prefiere la celoidina (especie de coloidon sin impurezas) soluble lentamente en una mezcla a partes iguales de Éter a 65° y alcohol absoluto. Algunos proponen la fotoxilina que se disuelve más rápidamente.

te en la mezcla alcohólico-etérea y forma solidificada - una masa transparente.

La solución celoidina debe tener consistencia espesa.

En ella permanecen uno o varios días las piezas, - se abandonan 24 horas en alcohol 36° o cloroformo puro. - Estos líquidos roban el éter de la celoidina, que adquiere una consistencia semejante al caucho.

MARCHA DE LAS OPERACIONES NECESARIAS PARA UNA BUENA INCLUSIÓN.

1.- Los trozos de tejido blando, de un espesor que no pasará de medio centímetro, permanecerán 24 horas en una mezcla de éter y de alcohol.

2.- Después se sumergirán, por 24 a 48 horas o más (según el espesor de las piezas), en una primera solución de celoidina al 2/100.

3.- Durante 2, 3 ó más días, atendido el volumen, se empaparán las piezas en una segunda solución de celoidina al 8 ó más /100. Este líquido debe tener consistencia de espeso jarabe.

4.- Extraída la pieza de la celoidina, se montará inmediatamente (evitando la desecación del vehículo) sobre un corcho limpio y seco o sobre un trozo de madera. - Pegada a tal soporte quedará expuesta al aire durante algunos minutos, a fin de que se condense más la celoidina envolvente.

5.- Los corchos o maderas con los objetos pegados se introducirán en un frasco de boca ancha que contenga alcohol de 70/100. Ahí permanecerán las piezas (que deben quedar bañadas por el alcohol) unas 24 horas.

6.- Puesta la pieza con su soporte de corcho en la pinza portaobjetos del microtomo, se procederá a seccionarla, cuidando de lubricar la navaja con alcohol al 70/100.

7.- Los cortes serán recogidos en agua, donde permanecerán hasta el momento de ser teñidos. Si la tinción debiera demorarse 2 ó más horas, la conservación de los cortes durante este tiempo se hará en alcohol al 70/100.

OBSERVACIONES: Este método de coloidon o celoidina es aplicable a todos los tejidos sin excepción, aun los más duros a condición de estar decalcificados.

b) INCLUSION EN PARAFINA.- Mezcla de hidrocarburos que hierven a 300° con otros más fluidos en proporciones variables. Las piezas adquieren una consistencia muy notable, siendo fáciles de reducir en el microtomo de 3 a 5 milésimas. Hasta los tejidos más blandos se cortan sin ninguna dificultad, como son: tejido nervioso, ovario, testículo, intestino, embriones, etc.

El orden de las operaciones es el siguiente:

1. Las piezas deshidratadas o fijadas, se colocarán en una mezcla, a partes iguales de alcohol y cloroformo. El cloroformo debe echarse después del alcohol y a favor de una pipeta que penetrará hasta lo más hondo, a fin de constituir una capa profunda exclusivamente cloro-

fórmica. En cuanto a las piezas, que se mantendrán algún tiempo entre las dos zonas de alcohol y cloroformo, des--ciendan del todo, pueden trasladarse:

2. Al cloroformo puro, donde quedarán por 6 a 24 horas.

3. Del cloroformo se trasportarán a una solución concentrada de parafina en cloroformo, donde se abandonarán por 6 a 24 horas.

4. Se conducirán a baño María (Giesbrecht o Nápo--les) que contenga parafina derretida y temperatura apenas superior al punto de fusión. Aquí permanecerán, según -- las dimensiones, de 8 horas a 2 ó 3 días.

La temperatura de fusión relacionada con la temperatura ambiente, así debe estar la parafina: generalmente entre 50 y 60° de fusión en épocas calientes. El mejor grado se consigue mezclando parafinas de distintas temperaturas. Conviene más emplear dos baños: 1o. parafina blanda 40°, y otro, de la temperatura definitiva 56 a 60°, unas horas en cada uno, según grosor de las piezas.

5. Extraída la pieza (extraída repentinamente) para que la materia de inclusión se solidifique en cristales finísimos; para ello se vierte la parafina en moldes o cajitas de papel de dimensiones apropiadas al tamaño de la pieza, y rápidamente, con piezas calientes, se coloca esta dentro de la parafina, en la posición conveniente; cuando la solidificación es suficiente de la superficie, se introduce el molde que circunscriben sobre una placa de metal también espacios rectangulares o cuadrados de -- dimensiones variables a voluntad.

6. Al montar las piezas en el microtomo, se tallará en cuadrillo, procurará que una de las capas se dirija hacia adelante. El filo de la maviija deberá ser paralelo a dicha superficie, es decir perpendicular a la resbaldadera, disposición que favorece la obtención de series o cintas de cortes.

7. Los cortes se depositan en hojas de papel o en cartones, preservados del viento hasta el momento de utilizarlos.

Los cortes de la parafina tienden a arrollarse imposibilitando el logro de las series. He aquí algunos re medios propuestos:

- Mecánicamente se evita esto, superponiendo a la pieza, mientras se corta, un pincel ancho y flexible.

- Se aconseja tallar en prisma triangular, de -- arista aguda anterior el bloque de parafina, con lo que si el corte se arrolla en espiral, podrá aplanarse a un suave calor en el portaobjetos, teniendo precaución de po ner el lado ancho y la base de la espiral hacia abajo.

- El proceder de Strasser, consiste en mojar antes de cortar la superficie del bloque con parafina blanda de rretida, da buen resultado.

- Otros aconsejan mojar el bloque con agua caliente o templar con el aliento.

PROCEDIMIENTO MIXTO.- Cuando la naturaleza del ob jeto exija la inclusión y no consienta el método colorante a emplear, el uso de la celoidina o la parafina, se -

hace una inclusión en una disolución acuosa de gelatina - al 10/100, o de agar al 2/100 en estufa, se solidifica - por enfriamiento, como la parafina, y se corta con el microtomo de congelación.

SERIACION Y MONTAJE DE LOS CORTES EN PORTAOBJETOS.-

Cortes a la celodina.- Podrán seriarse con sólo recoger los en una sucesión ordenada de pocillos de porcelana. - En cada pocillo sufrirá el corte todas las operaciones - de teñido, lavado, deshidratación, aclaración, etc.

Cortes a la parafina.- Con los microtomos de Minot, y de báscula, se obtienen fácilmente, si la parafina posee la debida consistencia.

Para sujetar en el portaobjetos los cortes aislados, como los trozos de cinta, se comienza por llevarlos a la superficie de una masa de agua, a la temperatura de 40 a 45°, donde se extienden; después se introduce en el agua, por debajo de los cortes que se quieren utilizar, un portaobjetos bien limpio y por medio de agujas, se colocan los cortes en la situación debida, extrayéndose en seguida el porta con los cortes por deslizamiento oblicuo. Se secan por debajo los portas y se colocan en una estufa a 37° unas horas para que se evapore el agua, por lo que los cortes habrán quedado pegados.

B. SECCIONES EN TEJIDOS DUROS. El hueso y el diente, así como el cartilago en vías de osificación, pueden seccionarse.

La obtención de cortes de diente y hueso en su consistencia natural, se logra de la manera siguiente:

He aquí el *modus operandi* en el hueso:

1. Obtención con la sierra pelo de relojero de un corte grosero, que comprenda todo el espesor de la diáfasis de un hueso largo (radio, cúbito, fémur, etc.).

2. Sobre una piedra arenisca o rueda de vaciador se desbasta el corte por ambas caras, hasta que presente un espesor de menos de medio milímetro.

3. El corte se lleva a una piedra fina de afilar, mojada con alcohol, se pule y adelgaza hasta que resulte transparente.

4. Lávese el corte en alcohol limpio y se deja secar sobre papel chupón.

METODO DE LAS COLORACIONES

CONSIDERACIONES GENERALES ACERCA DE LA COLORACION HISTOLOGICA.- La coloración de los cortes histológicos se funda en la afinidad que para determinados colores poseen los diversos factores integrantes de la célula y sus sustancias intercelulares.

Distinguen dos maneras generales de tejido: 1a. - La coloración directa o sustantiva, en la cual intervienen dos cuerpos: el tejido, el color, combinándose de suerte que la materia colorante queda fijada y resiste la acción de sus disolventes. 2a. La coloración INDIRECTA o ADJETIVA, en la cual cooperan tres cuerpos: el tejido, el mordiente y la materia tintórea. En este proceso llamado PIGMENTACION, el mordiente se combina, por un lado con el tejido, y por otro con el color, constituyendo una

laca o compuesto, insoluble al agua.

El proceso de coloración se facilita por la fijación.

Prescindiendo del mecanismo de coloración y atendiendo nomás el tratamiento ulterior de los preparados teñidos, aquella se distingue en PROGRESIVA Y REGRESIVA. - Designase progresiva, cuando el tejido adquiere lenta y progresivamente el grado de color necesario, sin existir ulterior operación de desteñido. REGRESIVAS son aquellas en que el objeto, sobrecoloreado por la excesiva concentración del agente tintoreo, debe sufrir la acción de un disolvente de éste. Disolvente cumplidor en este caso de dos fines esenciales: descartar el exceso de materia colorante y DIFERENCIAR, es decir, respetar el teñido de determinadas partes del preparado. Los reactivos decolorantes o diferenciadores más usados son: las SUSTANCIAS ALCALINAS (sosa, potasa, aceite de anilina, etc.); los ALCOHOLICOS (etílico y metílico); ciertos ACIDOS (sulphúrico, nítrico, acético, pícrico, oxálico, etc.), determinados OXIDANTES (permanganato potásico, ferricianuro potásico, etc.), algunos REDUCTORES enérgicos (hidroquinona, ácido pirogálico, ácido fórmico, formol), SALES METÁLICAS de acción mordiente (alumbre de hierro, cloruro férrico, yoduro potásico), METALOIDES (yodo, bromo, etc.).

Algunos de éstos se utilizan para acentuar las coloraciones, sin ser verdaderos mordientes.

Los métodos de coloración pueden ser clasificados en generales y especiales; los primeros basados en el teñido intenso de los núcleos. Los segundos son muy selectivos, sólo se aplican cuando se requiere estudiar las -

particularidades que tienen de modo casi exclusivo.

A.- METODOS GENERALES EN QUE SE EMPLEAN COLORANTES ORGANICOS

- carmín y eosina.
- hematoxilina y eosina.
- hematoxilina ferruginosa de M. Heidenhain.
- hematoxilina de Mallory al ácido fosfomolibdico.
- hematoxilina de Mallory al ácido fosfotúgtico.
- coloración triple de Van Giesson.
- método de triple coloración con la fuchina o magenta, el ácido pícrico y el carmín de índigo - (Cajal).
- fuchina ácida, azul de anilina, de Mallory.
- azán.- modificación de Heidenhain al método anterior de Mallory.

B.- METODOS GENERALES EN QUE SE EMPLEAN SALES METALICAS DE IMPREGNACION.

NOTA: Aquí se utilizan sólo utensilios de vidrio.

- método tanoargéntico de Achucarro (1911-1912)
- método de Achúcarro, modificado por Río Hortega (1916).
- método de Río-Hortega al carbonato de plata
- modificación de Cajal al método de Bienlschowsky.
- carmín borácico al alcohol.

CAPITULO V

+TECNICAS DE ESTUDIO EN HISTOLOGIA+

*HISTOLOGIA.- Parte de las ciencias biológicas ocu
pada en el estudio de los tejidos de los seres vivos.*

TECNICA HISTOLOGICA

*Conjunto de procedimientos físicos, químicos y - -
biológicos de que se vale el investigador para poder ob--
servar la intimidad micrográfica de los tejidos.*

TECNICA HISTOLOGICA CORRIENTE

*La que se usa con mayor frecuencia en histología .
Consta de los siguientes pasos fundamentales:*

- a- obtención de la pieza o material,*
- b- fijación de la misma,*
- c- inclusión*
- d- corte o reducción a láminas delgadas*
- e- coloración de los elementos deseados*
- f- montaje*

*La finalidad de la técnica histológica es lograr -
que el material para estudiar quede reducido a delgadísi-
mas láminas de unos pocos micrones de espesor a los efec-
tos de que pueda ser atravesado por la luz reflejada del_
microscopio óptico. Además se busca colorear el material_
para observar cada una de sus partes constitutivas.*

*A continuación pasaremos a analizar cada uno de -
los pasos de la técnica corriente.*

OBTENCION DEL MATERIAL

El material que se utiliza puede tener dos orígenes: de animales de laboratorio • de ser humano.

Para obtener la pieza debemos matar el animal. Su muerte debe ser incruenta, (evitando en lo posible el sufrimiento). Por ejemplo, envenenamiento pasivo por medio de potentes anestésicos (embotal, pentothal, etc.) que -- producen colapso pulmonar. También se usan los traumatismos.

Luego que el animal está muerto debemos hacer su - disección para tomar el órgano • los órganos que nos interesan. Para la disección se utilizan elementos tales como el bisturí, pinzas de Kocher, tijeras, etc. La disección se realiza sobre tacos de corcho de dimensiones adecuadas, ubicando al animal firmemente sujeto.

En el ser humano, la obtención de material está su peditada a diversos factores, porque un hombre no es un - animal de experimentación. El material puede provenir de biopsias, de necropsias • de extirpación quirúrgica.

La biopsia se realiza sobre un individuo con vida, y con fines clínicos pues se presupone que el tejido extraído debe de estar enfermo. Por lo tanto no nos sirve en histología normal sino en anatomía patológica.

La necropsia es la extracción de tejidos de un cadáver. Esta forma de obtención es la más correcta para - tener material histológico normal humano. Pero, de más - está decirlo, hay que tener en cuenta que el individuo no debe haber muerto por una enfermedad en el órgano que de-

seamos estudiar.

El material obtenido en operaciones quirúrgicas no es apto, al menos totalmente, ya que si debió ser extirpado es porque estaba enfermo, y estamos de nuevo en el caso de las biopsias.

O sea que para el estudio de material humano en -- histología normal lo más apto son las necropsias.

+ FIJACION +

Cuando extraemos la pieza, debemos lograr que se conserve por lo menos, el tiempo necesario para su estudio. La fijación es un proceso que tiene por finalidad la conservación del material o pieza teniendo en cuenta que se mantenga en lo posible la configuración y el ordenamiento que tenía originalmente.

Para lograr esto, se consigue por medio de reactivos que solidifiquen por coagulación o precipitación, las sustancias proteicas celulares, al mismo tiempo esta acción endurece los tejidos celulares.

(La finalidad primordial de la fijación histológica o citológica es la de poner de manifiesto el sustrato morfológico y asegurar su conservación).

La fijación es una etapa esencial de la técnica -- histológica, la rapidez en la fijación es de gran importancia; también hay que tener presente la velocidad de penetración del fijador en los tejidos para asegurar la fijación.

No existe un fijador universal. Todas las combinaciones tienen sus ventajas y sus inconvenientes, por lo que hay numerosos métodos de fijación.

No debe olvidarse:

- que un defecto de fijación no puede ser subsanado;
- que es inútil pretender hacer un estudio histológico de un material fijado.

CUALIDADES DE LOS FIJADORES

- potencia de penetración en los tejidos.
- la acidez de un fijador.
- rapidez de acción de un fijador.
- un buen fijador no debe arrugar ni encoger los tejidos, no los debe ennegrecer, ni dejarlos quebradizos o frágiles.

CARACTERISTICAS DE LOS FIJADORES

- no todos los líquidos endurecedores son buenos fijadores.
- la fijación debe producir la insolubilidad de los elementos constitutivos de células y tejidos.

ACCION DEL FIJADOR SOBRE LOS TEJIDOS

Es muy variable y depende del fijador.

Para el efecto de los fijadores nos vamos a basar en el formol al 10% que es uno de los más usuales.

El formol afecta a los grupos amino, imino, amido, péptido, guanidilo, hidróxilo, carbóxilo, sulhidrico y anillos aromáticos.

Muchas de estas reacciones son reversibles, algunas lábiles y cierto número de reacciones irreversibles.

DESVENTAJAS DE LOS METODOS DE FIJACION

- Deficiente imagen nuclear, especialmente en tejidos con cantidades grandes de células.

VELOCIDAD DE PENETRACION Y VELOCIDAD DE FIJACION

Las soluciones químicas penetran a distintas velocidades en el interior de los tejidos; este dato nos permite determinar la dimensión de las piezas a fijar.

Mientras que la velocidad es un fenómeno físico, la velocidad de fijación es un fenómeno químico. La fijación al igual que la penetración del fijador, no es instantánea, por lo que el tiempo que debe durar la fijación está en función de su velocidad de fijación.

Por ejemplo el tetroxido de osmio tiene una velocidad de penetración muy lenta, pero fija rápidamente, por lo que las piezas a fijar son de dimensiones reducidas, pero permanecerán poco tiempo en el fijador.

El caso opuesto puede ser el del formol, que penetra rápidamente, pero fija despacio; por lo tanto, las piezas a fijar deberán estar bastante grandes, pero deberán estar bastante tiempo en el fijador.

Esto nos demuestra que en el proceso de fijación debe tenerse en cuenta el tiempo y la dimensión de las piezas.

COEFICIENTE DE ENDURECIMIENTO

Los fijadores en general endurecen los tejidos; es conveniente, pero no debe sobrepasar el tiempo compatible con la obtención de los cortes.

El efecto endurecedor de un fijador depende del tipo de tejido, y se puede incrementar por la deshidratación y en el proceso de preparación del material para la inclusión.

VARIACIONES DE VOLUMEN Y PRESION OSMOTICA

Las variaciones de volumen provocadas por los fijadores son fatales, debido a que las retracciones no son homogéneas y conducen a distorsiones de las estructuras celulares. Algunos tejidos son insensibles a la presión osmótica del fijador, pero otros requieren un fijador cuya presión osmótica sea próxima a la de las células.

EFECTO DE MORDIENTE

No todos los organismos celulares pueden teñirse (a excepción de las vacuolas y las mitocondrias) por lo que se emplean fijadores que preparan las estructuras celulares al proceso de tinción.

Por ejemplo el sublimado es un excelente mordiente, mientras que el tetróxido de osmio dificulta las tinciones, e incluso interfiere en ellas.

DEFECTOS DE LA FIJACION

ARTEFACTOS.- Cada fijador tiene su tiempo óptimo de utilización. Si el tiempo de fijación es corto, las afinidades tintóreas de los constituyentes químicos; si la fijación es larga provocará demasiada afinidad por los colorantes, y algunas veces, pérdida de constituyentes químicos.

La fijación puede provocar la aparición de aspectos citológicos que no existían *in vivo*; se observarán imágenes artificiales o artefactos; éstos se pueden evitar con una cuidadosa fijación.

El aspecto que presenta el glucógeno dentro de la célula es considerado como artefacto, ya que hay aspectos que son inevitables.

CLASIFICACION PRIMARIA DE LOS FIJADORES

1. De acuerdo con la cantidad de sustancias que lo integran. Según la cantidad de sustancias que integran un fijador tenemos dos tipos, a saber: simples y compuestos.

FIJADORES SIMPLES

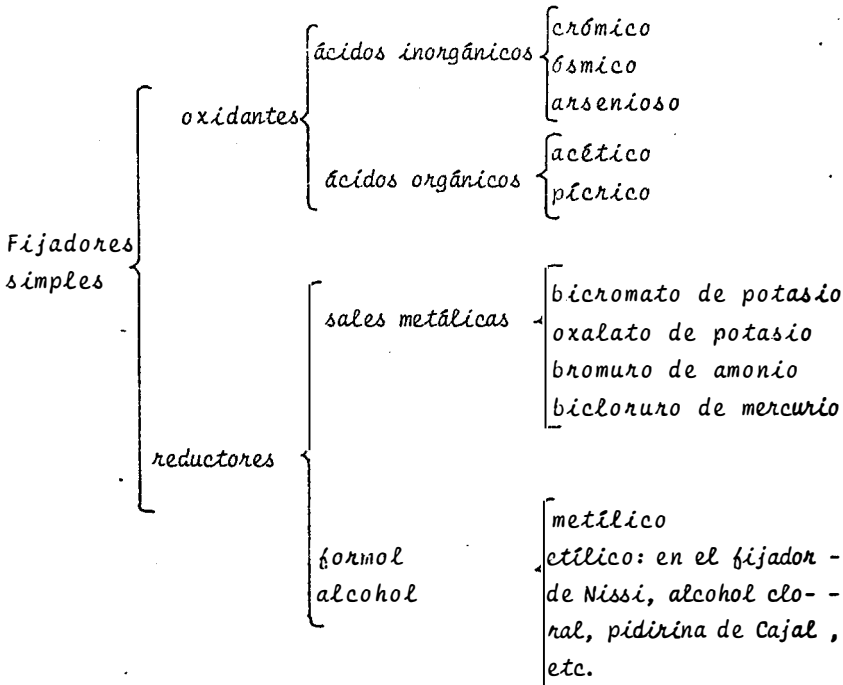
Son aquellos formados por un simple componente: formol, ácido ósmico, bicromato de potasio, alcohol, hidrato de cloral, etc.

A pesar de ir todos en solución acuosa (no se usan puros) se llaman puros porque sólo actúan ellos, ya que el agua no tiene poder fijador. El alcohol de 100° se usa puro. Por eso es 100°.

Los fijadores simples pueden ser oxidantes o reductores.

Dentro de los oxidantes, tenemos los ácidos orgánicos, inorgánicos y las sales metálicas. Por ejemplo: los ácidos crómico, ósmico, arsenioso (inorgánicos); el acético y pícrico (orgánicos); y como sales metálicas, las de potasio, mercurio, amonio, etc.

Dentro de los reductores tenemos los alcoholes tales como: el formol, el metílico y etílico, que se usan según la técnica empleada.



FIJADORES COMPUESTOS

Son aquellos que tienen dos o más sustancias fija-

doras. Esto se hace con el fin de aprovechar las ventajas y evitar los inconvenientes de cada componente. Por ejemplo el alcohol tiene poca penetración, por lo que se le agrega ácido pícrico, que es muy penetrante; ambos forman un fijador compuesto. También reciben el nombre de mezclas fijadoras.

Los ingredientes que forman un fijador compuesto se escogen de manera que sus cualidades se complementen.

AGENTES FIJADORES

Los reactivos fijadores más usados son los ácidos minerales, sales metálicas, ácidos orgánicos y reductores orgánicos.

Sustancias químicas empleadas en la preparación de fijadores combinados:

1) ACIDOS MINERALES

- Acido crómico: (concentración óptica del 0,5 al 2%):

Fija bien los núcleos, rara vez usado.

- Fuente oxidante
- Precipita toda clase de proteínas;
- Facilita las tinciones con colorantes básicos;
- Debe eliminarse totalmente, lavando con abundante agua.

- Acido ósmico: (Tetróxido de Osmio) (Concentración óptima del 1 al 2%): Fija bien el citoplasma y el condrioma, pero no el núcleo. Im

pide una buena diferenciación óptima; en estado de vapor es un fijador excelente en piezas muy delgadas y pequeñas como son los frotis y protozoarios.

- Fuerte oxidante.
- Fija de manera homogénea, sin precipitar -- proteínas.
- Poca velocidad de penetración.

No contrae

- Eliminado mediante lavado de agua.

2) SALES METÁLICAS

- Bicromato de potasio: (Concentración óptima - del 0,5 al 2%): Fija bien el citoplasma, pero altera el núcleo.
- oxidante
- precipita toda clase de proteínas;
- facilita las tinciones con colorantes básicos;
- debe eliminarse totalmente, lavando con abundante agua.
- Bicoloruro de Mercurio o sublimado (solución saturada): fijador de primer orden, pero es necesaria su eliminación completa de los tejidos, para evitar la formación de cristales.
- Precipita todas las proteínas
- gran velocidad de penetración;
- endurece mucho;
- debe ser eliminado con un compuesto yodatado;
- excelente mordiente
- provoca artefactos nucleares.

3) ACIDOS ORGANICOS

Mezclas fijadoras (pícrico, acético, tricloracético) pero aisladamente no se utilizan.

- Acido acético: [concentración óptima del 0,3 al 5%]:
 - No fija proteínas citoplasmáticas, pero precipita las del núcleo, buen fijador de los cromosomas.
 - destruye el condrioma
 - provoca hinchamiento de los tejidos y no los endurece.
- Acido pícrico: (solución saturada)
 - precipita las proteínas;
 - contrae los tejidos sin endurecerlos
 - despolimeriza los ácidos nucleicos

4) REDUCTORES ORGANICOS

- Alcohol etílico: (Concentración óptima del 70 al 100%): Poco penetrante, endurece mucho los tejidos, disuelve las grasas, fija mal el núcleo. Fijador pobre, se usa para demostrar carbohidratos.
 - reductor;
 - precipita las proteínas, pero casi no insolubiliza las nucleoproteínas;
 - precipita el glucógeno sin fijarlo;
 - provoca fuerte contracción.
 - prepara mal la tinción.

- Alcohol metílico: Se usa puro, importante en la técnica de frotis desecados.
- Acetona: se usa pura. No es buen fijador, su ventaja es que no disuelve el ácido úrico ni el glicógeno.
- Formol: (concentración óptima del 4 al 10%):
Universalmente usado por su buena fijación, endurece y conserva las grasas y lipoides.
 - reductor
 - no precipita proteínas, pero adiciona átomos a moléculas.
 - no contrae las estructuras, pero las endurece considerablemente.
 - mejor fijador de conjunto.

MEZCLAS QUE CONTIENEN ALCOHOL.- Alcohol etílico, fijador mediocre. El Carnoy es una mezcla alcohólica.

Velocidades de penetración y fijación grandes. Permanencia en el fijador corta, deshidratación con alcohol absoluto, debe ser rápida ya que el agua del sistema proviene exclusivamente de los tejidos.

METODO:

1. Fijar piezas de 5 milímetros de grosor, como máximo, durante 12 horas.
2. Detener la fijación, poniendo directamente alcohol absoluto.

MEZCLAS QUE CONTIENEN ACIDO PICRICO, ACIDO ACETICO

Y FORMOL.- Mezclas más empleadas y se designan con el -- nombre de "fijadores corrientes".

El líquido de Bouin considerado el fijador universal, y el de Halmi, tan fácil de emplear como el líquido de Bouin.

Las piezas pueden tener tamaños considerables, por lo que estos fijadores son los indicados para estudios morfológicos y de anatomía microscópica.

Las dos mezclas penetran bien, por lo que las piezas pueden ser relativamente gruesas; no se requiere ningún lavado acuoso.

METODO:

1. Fijar durante 24 a 48 horas, piezas de 5 mm. de -- grosor máximo.
2. Sustituir el fijador por alcohol de 95°, que será renovado dos veces como máximo.

MEZCLAS CON BICROMATO DE POTASIO (sin tetróxido de osmio).- Se encuentran las mezclas de Zenker y de Helly. Son excelentes fijadores, las piezas deben de ser lavadas en agua.

Piezas a fijar con este método deben ser pequeñas y duración y fijación corta.

La poscromización prolonga la acción del bicromato sobre las piezas; tiene acción de mordiente.

METODO:

1. Fijar piezas de 3 mm. de grosor como máximo durante 12 horas.
2. Lavar durante 24 horas en agua destilada.

FIJADORES CON TETROXIDO DE OSMIO.- Fijadores incomparables, de manejo cuidadoso, resultados frecuentemente irregulares dentro de la pieza fijada. Su empleo se reserva para estudios citológicos de tejidos cuya morfología es ya conocida.

Las piezas a fijar deben ser pequeñas, y se deben lavar con agua.

MEZCLAS FIJADORAS

En la actualidad se usan mezclas fijadoras combinadas, que tienen como objetivo completar la acción de un fijador con otro, balanceando las acciones nocivas.

Se mencionarán algunas mezclas, separadas por grupos caracterizados por el elemento más activo.

a) Mezclas fijadoras a base de cromo, en forma de ácido crómico o bicromato.

Mezcla de Orth o Müller/ formol. Util para glicógeno y grasa.

Mezcla de Zenker (1894). Tiene bicloruro de mercurio, bicromato de potasio, sulfato de sodio y ácido acético. Por tener bicloruro de mercurio, es necesario que -

las piezas sometidas a él deben ser lavadas con alcohol y yodado para que el yodo arrastre el exceso de mercurio al formar yoduro de mercurio.

Buen fijador general.

Mezcla de Helly (1904) o Zenker/formol. Excelente para tejido hematopoyético y discos intercalares.

Mezcla de Regand (Bicromato-formol-acético), bueno para mitocondrias y gránulos citoplasmáticos.

b) Mezclas fijadoras a base de ácido ósmico

Mezcla de Flemming (cromo-acético-ósmico) bueno para figuras mitóticas.

Mezcla de Champy (1909). Bueno para detalles citológicos.

Mezcla de Altman. Fijador general.

c) Mezclas fijadoras a base de sublimados corrosivos.

Sublimado alcohólico de Shaudinn (1889). Bueno para protozoarios.

Mezcla de Gilson (1897). Bueno para invertebrados.

d) Mezclas fijadoras a base de ácido pícrico.

Picroformol de Bouin (1897). Para uso común, excelente para conservar glucógeno.

Mezcla de Duboscq-Brasil. Fijador general.

e) Mezclas fijadoras a base de formol.

Formol biomuro de Cajal. Excelente para tejido conectivo.

Formol amonio de Cajal, alcohol-amonio, se utilizan en el estudio histológico de sistema nervioso.

f) Mezclas fijadoras a base de alcohol.

Fijador de Carnoy. Bueno para ácidos nucleicos, glicógeno y gránulos de Nissl.

Alcohol-formol. Bueno para tejido Nervioso.

2. Fijadores generales y específicos

Cuando un fijador actúa sobre todo el material, lo llamamos fijador general. Pero hay algunos que sólo permiten la posterior coloración de una parte, como por ejemplo el aparato de Golgi. A éstos se les llaman específicos.

Sin embargo esto no es absoluto, pues un material fijado con formol puede ser sometido a coloraciones específicas para ver elementos selectivamente.

3. Fijadores físicos y químicos.

El uso de fijadores físicos está actualmente restringido en histología, ya que el uso de soluciones fijadoras es más fácil y rápido.

Los fijadores físicos son: el frío, el calor y la desecación.

El frío se usa en casos en que hay que detener los

procesos de autólisis en muy breve plazo.

El calor tiene poder fijador, ya que coagula las proteínas. En histología no es muy usado.

La desecación tiene importancia, puesto que todo el material sólido que se halla en la célula sufre fenómenos de precipitación.

FIJADORES QUIMICOS

Son de gran importancia.

Va se mencionaron antes en fijadores simples y compuestos.

FENOMENOS INTIMOS DE LA FIJACION

Son de dos categorías: físicos y químicos. Los más notorios son:

- 1.- Fenómenos de coagulación y precipitación.
- 2.- Fenómenos de neutralización de sustancias ácidas y básicas.
- 3.- Fenómenos de óxido-reducción.

1.- Fenómenos de coagulación y precipitación

La materia viviente se caracteriza por su configuración físico-química coloidal. Los coloides vivientes, cuando la pieza es fijada, se solidifican; vale decir que dejan de ser coloides.

La coagulación se debe a una causa física que es -

la neutralización de las cargas eléctricas que integran - la capa de Helmholtz de las micelas y que son las que man tienen la suspensión. Sin estas cargas eléctricas las mi celas precipitan.

2.- Fenómenos de neutralización de ácidos y bases.

Ciencia relativamente nueva, la histoquímica, ha - probado que en toda célula se encuentran partes de natura leza química ácida y la básica.

Las sustancias fijadoras deben poseer una determi - nada configuración química que de acuerdo con la teoría - de Brønsted y Lowry, ha de tener una característica ácida o básica.

3. Fenómenos de oxidación reducción.

El oxígeno, de acuerdo con los basamentos del meta bolismo, puede ser cedido o tomado por ciertas sustancias, lo cual crea dentro de la química la división entre oxi - dantes y reductores.

Hay tejidos en el organismo que poseen una escasa cantidad de oxígeno, y además, tienen tendencia a perder el hidrógeno que poseen en cantidad mayor. Por eso decimos que son reductores.

El núcleo tiene una gran capacidad para tomar el - hidrógeno sobre todo al nivel del tejido cartilaginoso. - Esto le da el carácter de oxidante.

Hemos hablado ya de los elementos que atacan al - fijador, o sea del carácter oxidante o reductor que pre-

sentan los tejidos. Sin embargo, no debemos olvidar que también el fijador que actúa debe tener una capacidad oxidante o reductora según su naturaleza o razón química.

Cuando los colorantes actúan, se plantea el problema de que se corre el riesgo de que un tejido con capacidad oxidante más o menos marcada ataque al colorante y forme lo que se conoce con el nombre de leucocompuesto. Como lo que al parecer ataca al colorante es el exceso de tejido oxigenado, se utiliza en la fijación una sustancia fijadora reductora que elimine tal exceso.

Es importantísimo decir que en este caso particular la naturaleza química del fijador es fundamental, ya que un fijador reductor potente puede destruir la zona oxidante del tejido sometido a la técnica que estamos describiendo.

SELECCION DE UN FIJADOR

Se puede seleccionar por ejemplo: formol al 10% simple o salino, Bouin, Zenker-formol, Orth, etc.

Esto es en un carácter general, pero es necesario para cada caso particular escoger un fijador lo más apropiado posible, tomando en cuenta el tejido, los detalles que se quieran resaltar y la coloración que se va a utilizar.

MODO DE EMPLEO DEL FIJADOR

Después de haber elegido el fijador se debe determinar la manera de emplearlo. Se propone seguir las siguientes indicaciones:

- Para extraer los tejidos que se van a fijar, se recomienda que el animal sea descerebrado en el momento de hacer la disección. Extraer los órganos sin que sufran traumatismos.

- Una vez extraídos los órganos, se obtienen las piezas que van a ser fijadas. Se toma en cuenta la forma y consistencia del órgano.

- Es esencial que la composición del fijador permanezca lo más constante posible; es necesario por tanto emplear un volumen de la pieza a fijar.

- La duración de la fijación depende de cada fijador y de cada tejido.

- El lavado después de la fijación es de gran importancia, ya que es necesario eliminar lo más posible - las sustancias fijadoras. El disolvente empleado para el lavado, así como su tiempo de acción depende del fijador y la técnica que se vaya a seguir.

TECNICA DE FIJACION

No hay uniformidad de método ya que variará si se trata de un tejido contráctil o no contráctil.

En tejidos contráctiles.

Son aquellos que post mortem tienen la particularidad de contraerse; por ejemplo, la vejiga, el pulmón - y ciertas porciones de tubo digestivo. Se opera tomando una delgada lámina de un derivado de alcornoque (corcho)

que posea una perforación circular sobre la cual se extiende el trozo de tejido como lo estaqueara. El líquido fijador es colocado en un recipiente apto. La flotación impedirá que se fijara la superficie que mira hacia arriba, pero este inconveniente se elimina colocando sobre ella un algodón embebido con fijador.

En tejidos no contráctiles

Es la técnica clásica de fijación. Primeramente se corta la pieza hasta que nos queden cubitos de unos dos centímetros de lado. Se coloca un cubo de material en una vasija con fijador durante un lapso de una o dos horas y media ya que de este modo se endurece. Hecho esto, se saca de allí, y con una navaja de afeitarse o una navaja de barbero de hoja fina bien afilada se reduce a trozos de 6 mm. de diámetro.

Tenemos ya nuestra pieza fijada.

LA FIJACION EN LA PRACTICA

1. Preparar líquidos fijadores, teniendo en cuenta que el volumen sea 60 veces el de la pieza.

Los fijadores se emplean sólo una vez.

2. Preparar recipientes; pueden ser tubos con tapón de corcho, pomos, etc.

3. Preparar etiquetas.

4. Sumergir la pieza directamente en el fijador.

5. Tener en cuenta el volumen de la pieza, si la pieza es delgada.

6. Los tejidos no deben sufrir ninguna lesión mecánica, ni ser aplastados con las pinzas.

7. Las piezas serán depositadas en el fijador con ayuda de un escalpelo.

PROCEDIMIENTOS PARTICULARES DE FIJACION

FIJACION POR CRIODESECACION.- Consiste en someter los tejidos a bajas temperaturas y congelarlos, deshidratarlos, en frío y en el vacío, para después calentarlos - infiltrándoles parafina.

No se recomienda en materiales ricos en agua, ya que la formación de cristales de hielo podría provocar la formación de artefactos.

Método recomendable para el estudio de sustancias difusibles. Puede aplicarse a M.E. después de la inclusión de la pieza deshidratada, en una resina.

FIJACION POR CONGELACION-DISOLUCION.- Fijación histológica excelente. Componentes celulares inmóviles por congelación en la 1a. etapa. Después se someten de 15 a 19°C en que el hielo es sustituido por alcohol etílico, butano, propilen-glicol o incluso por un fijador alcoholico (Genore, 16).

El paso siguiente es la Inclusión.

= INCLUSION =

Está destinado a darle consistencia a la pieza, además de mantener su estructura. La inclusión puede hacerse en diferentes sustancias, denominadas masas de inclusión.

Las masas de inclusión se dividen en anhidras y acuosas.

Las primeras, de mejores resultados, muchas deben ser reemplazadas por las segundas ya que hay tejidos que no pueden ser deshidratados sin alterarse, condición necesaria para hacer inclusiones anhidras.

La inclusión puede hacerse en:

Masas de inclusión acuosas:

- a- jabón: en tejidos vegetales
- b- gelatina: en tejidos embrionarios

Masas de inclusión, anhidras:

- a- parafina,
- b- celoidina

Para las masas de inclusión anhidras (parafina y celoidina) la pieza debe ser previamente deshidratada.

La inclusión en parafina o celoidina consta entonces de dos pasos:

- 1- deshidratación de la pieza.
- 2- inclusión propiamente dicha.

DESHIDRATACION

Se hace utilizando alcoholes. Su procedimiento es el siguiente: Una vez sacada la pieza del fijador y a su vez lavada se introduce en alcohol de baja graduación - - (50°). Luego se pasa a alcoholes de graduación creciente: 60°, 70°, 80°, 90°, 96°, 100°. El último alcohol (100°) debe ser repetido para obtener una deshidratación mejor.

El tiempo que ha de estar la pieza en cada alcohol varía según su tamaño y la calidad o rango tisular que la forma.

Una vez que la pieza ha estado en alcohol de 100° no podemos colocarla directamente en parafina o celoidina, pues el alcohol no es miscible con ninguna de ellas, por lo que debemos usar un líquido intermediario que sea soluble en ambos.

Para la parafina, podemos usar: xilol, benzol, clo-roformo, etc. Para la celoidina usaremos alcohol-éter.

Va con la pieza en el intermediario debemos proceder a su inclusión.

Inclusión es también una impregnación de tejido a nivel celular; el medio de inclusión debe ser lo más neutro posible.

La técnica de inclusión consiste en someter las -- piezas a la acción de diversos disolventes para conseguir que una sustancia frecuentemente hidrófoba, penetre en un tejido que en un principio está hidratado, para mantener en su posición original los elementos que la integran al

efectuar los cortes. La pieza debe someterse a una serie de tratamientos sucesivos.

Las impregnaciones se hacen en forma de baños que se hacen en recipientes idénticos o parecidos a los empleados para la fijación. Para cada disolvente se renueva el baño dos veces, cambiando la pieza de recipiente o sustituyendo el líquido empleado por otro nuevo, en el mismo recipiente.

Existen varios medios, siendo uno de los más corrientes la parafina; las inclusiones en celoidina o en gelatina se emplean menos.

LIQUIDOS DE CONSERVACION

Líquidos que actúan como conservadores.-

+ FORMOL DILUIDO: Para piezas que todavía no se han deshidratado y que luego se incluirán en parafina o en gelatina, o para cortes de congelación, sin previa inclusión.

+ BUTANOL	}	Para piezas deshidratadas más o menos cuidadosamente, para incluir en parafina.
+ ESENCIA DE CEDRO:		
+ SOLUCIONES DE:		
COLOIDON:		

+ ALCOHOL ABSOLUTO: Piezas cuidadosamente deshidratadas, para incluir en celoidina.

FORMOL DILUIDO.- Las piezas destinadas a incluirse en parafina y cuya deshidratación aun no se ha iniciado.

BUTANOL O ALCOHOL BUTILICO NORMAL.- Líquido conservador. Las piezas pueden mantenerse mucho tiempo en él. Se emplea para completar la deshidratación.

ESENCIA DE CEDRO.- Excelente medio de conservación. Actúa de intermediario entre el alcohol y la parafina y reblandece determinados tejidos, que tras la fijación se habían endurecido.

MEZCLAS DE COLOIDON (O CELOIDINA).- También se le llama inclusión mixta. Antes de la inclusión en parafina se impregna en el coloidón.

Las piezas deben ser cuidadosamente deshidratadas antes de sumergirse en la solución de coloidón.

Antes de la inclusión en parafina se eliminará del material todo vestigio del disolvente, tratándolo con ben ceno. (1H aprox.).

La impregnación en celoidina puede efectuarse cual quiera que haya sido el método de fijación.

Se usa para aprovechar las ventajas de la parafina como de la celoidina y evitar los inconvenientes que cual quiera de ellas presenta. La parafina permite obtener cortes muy delgado (2 Micras) pero no sirve para los tejidos descalcificados. En cambio, la celoidina, que sirve para esto, difícilmente permite cortes de menos de 6 micras, por lo que recurrimos a la inclusión mixta.

Esta consiste en realizar una inclusión en celoidi na hasta la del 10% del taco en parafina. Dicha inclu-

sión se consigue utilizando un intermediario, que solubilice la coloidina y la parafina al mismo tiempo, pues ambas no son miscibles entre sí.

El intermediario usado es la esencia o aceite de cedro, que puede ser reemplazada por la fórmula de Apathy.

=INCLUSION EN PARAFINA=

Es la más usual, debido a que ofrece mayor número de ventajas prácticas.

La "parafina" histológicamente hablando, es una mezcla de hidrocarburos saturados y a veces de ceras. -- Son químicamente neutros, solubles en numerosos disolventes y fáciles de cortar en cuchilla. El carácter físico que se tiene que considerar es su punto de fusión: cuanto más elevado sea el punto de fusión de una parafina mayor es su dureza.

El punto de fusión de la parafina varía según que los hidrocarburos que la forman sean de cadena larga o corta. La ventaja de los diferentes puntos de fusión estriba en su uso en verano o invierno.

La de alto punto de fusión la usaremos en verano (58°C); de usarla en invierno el bloque sería excesivamente duro para la navaja del microtomo, sucediendo lo contrario (bloque demasiado blando) si usamos la de 36-46°C en verano. El procedimiento de fusión se realiza colocando la parafina en estufa de doble pared con termostato (regulador de temperatura) para mantener la temperatura fija en dos grados centígrados por encima de la temperatú

na de fusión. Una vez que se ha fundido la parafina, tomamos la pieza del intermediario en que la habíamos colocado, la ponemos en ella y la ubicamos nuevamente en la estufa. El tiempo que ha de estar varía según el tamaño de la pieza y la naturaleza del tejido.

Las parafinas de 56° - 58° convienen para la mayor parte de los casos. Hay que tener en cuenta la dureza del objeto a incluir y la del medio de inclusión.

La impregnación y confección del bloque se harán siempre con parafinas duras o de calidad equivalente.

Las piezas fijadas en parafina, deberán deshidratarse con alcohol etílico, ya que la parafina no es miscible en agua, pero como la parafina tampoco es miscible con el alcohol etílico, hay que emplear, tras la deshidratación un líquido intermediario. Este intermediario, es aclarante, por lo que se puede ver el grado de penetración del intermediario en la pieza.

El intermediario debe ser miscible con el alcohol y con la parafina, por ejemplo tenemos el benceno, toluol, xilol, esencia de cedro, cloroformo, óxido de propileno, etc.

El benceno, el toluol y xilol, presentan el inconveniente de que endurecen mucho los tejidos, por lo que deben permanecer en el líquido intermediario, lo menos posible. El benceno es el más volátil por lo que se elimina rápidamente; por consiguiente, es el más adecuado para emplear.

El óxido de propileno empleado para la inclusión -

de piezas destinadas a la "ultramicrotomía", es para la inclusión en parafina un líquido intermediario excelente. No es aclarante, no endurece. El dioxano tiene las mismas ventajas que el óxido de propileno y además puede actuar como deshidratante, a la vez de líquido intermediario.

Tras pasar el material por el líquido intermediario, se procede a una cuidadosa impregnación del material por la parafina líquida. Esta impregnación se efectúa en caliente (1° ó 2°). Es conveniente pasar por tres baños sucesivos de parafina. La parafina puede servir varias veces, a diferencia de los alcoholes usados en la deshidratación, y los líquidos intermediarios, que sólo pueden emplearse una vez.

La duración de la inclusión en parafina depende del líquido intermediario utilizado, así como del tamaño de la pieza.

Una vez que consideramos que la parafina ha penetrado debemos hacer lo que se conoce con el nombre de "taco". Para esto contamos con los llamados moldes de Leukard, que constan de una planchuela y dos piezas en forma de L opuestas, de manera que las dos ramas cortas de la "L" se enfrentan y sucede lo mismo con las ramas largas.

Se llena el espacio comprendido entre ambas L con parafina fundida, se toma la pieza de su baño previo de parafina y se la coloca en el molde Leukard, cuidando su orientación.

Va colocada la pieza soplamos suavemente en la superficie de la parafina para formar una tenue capa solidi-

ficada; se espera el endurecimiento de todo el bloque, - que se puede acelerar por medio de agua fría. Una vez -- conseguido esto se cortan los excesos, dando al taco una - forma de paralelepípedo para pegarlo con parafina fundida sobre el trocito de madera que servirá para afirmararlo a - la platina del microtomo.

En la inclusión en parafina otro intermediario pue de ser la estufa (calor).

PROCESO DE INCLUSION

1o. Deshidratación (mencionado anteriormente).

2o. Es aconsejable hacer tres baños en el líquido intermediario, uno sería insuficiente.

3o. Una vez que se sacan las piezas del líquido -- intermediario, se escurren rápidamente en papel filtro, - evitando que se sequen. En seguida se introducen en potillos con parafina.

4o. Las piezas se trasladan de un baño a otro de - parafina, mediante una espátula metálica tibia.

5o. La confección del bloque puede hacerse con - - unos moldes especiales denominados "pinzas de Luckart". - De esta manera se pueden obtener bloques de diferentes di mensiones.

6o. Hay que prever la retracción que presentará la parafina, cuando se enfríe. Es conveniente dejar detrás - de la pieza la suficiente cantidad de parafina para pegar el bloque sobre el portabloques del microtomo.

70. Después de algunos minutos, los bloques todavía tibios se sumergen con sus respectivos moldes en un cristalizador lleno de agua fría. Las piezas se abren instantáneamente cuando se han enfriado totalmente. Después de 24 horas de haber confeccionado el bloque, puede contarse. La formación del bloque es reversible.

80. El poner etiquetas en los bloques ha planteado varios problemas. Por lo tanto, cuando la pieza lleva solamente un número de referencia, es preferible enganchar en el bloque una cinta de plástico (tipo Dymo); es inalterable. Cuando las indicaciones son más numerosas, puede emplearse etiquetas autoadhesivas, que se mantienen bien sobre la parafina, siempre que la superficie sea plana.

90. La confección de un bloque con piezas pequeñas e incoloras es bastante minuciosa. Pueden someterse las piezas a una precoloración con eosina en solución acuosa al 1% o en solución alcohólica si han sido fijadas en una mezcla alcohólica. También pueden teñirse con verde luz al 0,5%. Las mezclas a base de ácido pícrico tiñen suficientemente las piezas, por lo que una pretinción con eosina, no es necesaria.

INCLUSION EN CELOIDINA

Los trinitratos y tetrinitratos de celulosa, se conocen con el nombre de celoidina. El término de colodion se reserva para la solución de celoidina. Es muy inflamable y explosiva ya que está químicamente emparentada con la nitroglicerina. Tiene aspecto córneo.

La inclusión en celoidina es menos frecuente que -

la de parafina. Es recomendable para materiales de grandes dimensiones o excepcionalmente duros, tejido óseo, - por ejemplo, también es aconsejable cuando se desean obtener cortes muy gruesos.

El principio de esta inclusión consiste en impregnar piezas totalmente deshidratadas, en soluciones cada vez más concentradas de colodión. Por evaporación del disolvente del colodión y su endurecimiento con la acción de un curtiente adecuado, se obtiene el bloque. Después del curtimiento es preferible "aclarar" el bloque y conservarlo en un medio líquido.

Los tiempos para la inclusión son más largos. Todas las operaciones se efectúan a la temperatura del laboratorio.

Se hace una solución de celoidina al 12% en alcohol-éter que es llamada solución madre. A partir de esta, se hacen soluciones de menor concentración, también en alcohol-éter: 2, 4, 8 y 10%. Una vez que sacamos la pieza del intermedio, alcohol-éter, la colocamos en celoidina 1, que es al 2%, en donde permanecerá mucho tiempo, aun para piezas pequeñas (8-10 días).

En celoidina 2 (al 4%) debe estar algo menos de tiempo y así hasta que llegamos a la celoidina de 10%. La celoidina madre sobre un taco de madera balsa. Aquí se orienta correctamente la pieza dejando gotear más celoidina madre, hasta cubrir la pieza por completo. Debemos acelerar el endurecimiento de la celoidina; esto se hace con desecadores a base de cloroformo.

Los tacos ya endurecidos, se conservan en alcohol

de 70° mientras que los de parafina no necesitan tal conservación.

PROCESO DE INCLUSION

1o. La pieza fijada se deshidrata.

2o. Se introduce en una mezcla formada con alcohol absoluto y Éter, a partes iguales, hasta la completa imbibición (aprox. 1 día).

3o. Se impregna la pieza en soluciones al 2%, 4% y después al 8% de celoidina en una mezcla de alcohol absoluto-éter, en partes iguales.

Los tiempos de impregnación son largos: por término medio dos días en la solución del 2%; 1 semana, en la solución del 4%, y de una a cuatro semanas, en la de 8%. Durante todo este tiempo, las piezas se mantienen en frascos herméticamente cerrados y protegidos de la humedad.

4o. Cuando las piezas están suficientemente impregnadas, la solución se evapora parcialmente, hasta la obtención final de 16 al 20%. La evaporación se hace en un desecador que contenga ácido sulfúrico anhídrido fosfórico.

Antes de poner la pieza en el desecador, es cómodo empezar la confección del bloque vertiendo la solución del 8% y la pieza en un molde de papel.

5o. El endurecimiento es acelerado exponiendo el bloque a vapores de alcohol de 70° o a vapores de cloroformo.

60. El bloque se corta con la lámina de un escalpe lo; en el gel solidificado obtenido de esta manera, la hoja de papel del molde se saca fácilmente de la cara inferior.

70. El bloque terminado se deja 24 horas en clorofomo para que acabe de endurecerse.

80. El aclaramiento se consigue por inmersión en la mezcla de Apathy (36) ó de Bolles (37). Hay que renovar dos veces estos baños.

90. Los bloques completamente transparentes se conservan en un medio líquido, alcohol o esencia de trementina.

DOBLE INCLUSION CELOIDINA-PARAFINA

El sistema más sencillo consiste en tratar el bloque de colodión como si fuese una pieza de material biológico corriente e incluirlo en parafina.

El procedimiento es recomendado para las piezas que sean pequeñas, duras o muy esponjosas.

MODO DE EMPLEO.- 10. Incluir la pieza en celoidina hasta el aclaramiento de la mezcla de Apathy.

20. Someter el bloque a 3 baños sucesivos de benceno.

30. Impregnar durante varios días con parafina, en la estufa.

40. Incluir el bloque de colodión en la parafina.

DIFERENCIAS ENTRE INCLUSION EN PARAFINA Y CELOIDINA

La parafina se usa como masa de inclusión de tejidos blandos, o de dureza homogénea; no es muy conveniente usarla en una pieza que presenta elementos de distinta naturaleza en cuanto a dureza pues no es una masa elástica.

La celoidina en cambio, es muy elástica; por lo tanto se utiliza para materiales que contengan en su seno tejidos de diferente dureza, como por ejemplo un maxilar que contiene piel, músculos, mucosa, huesos, cartílago y dientes.

La celoidina, por otra parte, es conveniente porque a posteriori en la coloración, no es coloreada, lo que no impide la perfecta coloración del resto de la pieza.

La parafina tiene un inconveniente bastante serio: no permite la acción de los colorantes, mientras ella se halla como masa de inclusión.

Por eso, antes de la coloración, se hace imprescindible quitarla.

La celoidina tiene la ventaja de mantener la cohesión estructural del material, conservando en su sitio to dos los elementos.

En síntesis:

CELOIDINA

Es elástica

Permite que haya coloración

PARAFINA

No es elástica

Debe ser quitada antes de la coloración.

INCLUSIÓN EN GELATINA

Se emplea como método previo, o en casos muy especiales.

Es necesario cuando hay que mantener unidos los diferentes elementos de objetos heterogéneos que deben cortarse por congelación. Puede igualmente hacerse antes de incluir en parafina piezas muy pequeñas; ofrece la ventaja de aumentar el volumen del material.

El principio de esta inclusión es bastante parecido al de la inclusión en celoidina; hay que impregnar una pieza con una solución concentrada y después provocar su solidificación.

Esta inclusión se lleva a cabo en piezas no deshidratadas, ya que la gelatina es miscible con el agua.

Debido a la viscosidad de las soluciones de gelatina, la impregnación se efectúa en caliente y la confección del bloque se consigue por enfriamiento.

Según los casos, los bloques pueden conservarse en medio líquido, o bien deshidratarse e incluirse en parafina.

MODO DE EMPLEO.- a) Para piezas destinadas a ser cortadas por congelación (para piezas fijadas en solución formolada).

1o. Lavar cuidadosamente las piezas con agua corriente y después con agua destilada, para eliminar el formol.

2o. Impregnar con una solución de gelatina al 10%

durante 24 horas en una estufa regulada a unos 37°C.

30. Verter la solución tibia en un molde de papel; después incluir la pieza.

40. Dejar enfriar en la nevera, de 30 minutos a una hora.

50. Sacar el molde, recortando sus paredes laterales y despegando el fondo; endurecer y conservar el bloque en líquido de Baker (5) o en una solución de formol - al 10% (minutos a 12 horas).

b) Para piezas muy pequeñas y destinadas a ser cor-
tadas en parafina.

10. Como en el caso anterior.

20. Verter sobre un portaobjetos una gota de solución de gelatina caliente, al 15%, orientar la pieza, ver-
ter nuevamente una poca de solución de gelatina.

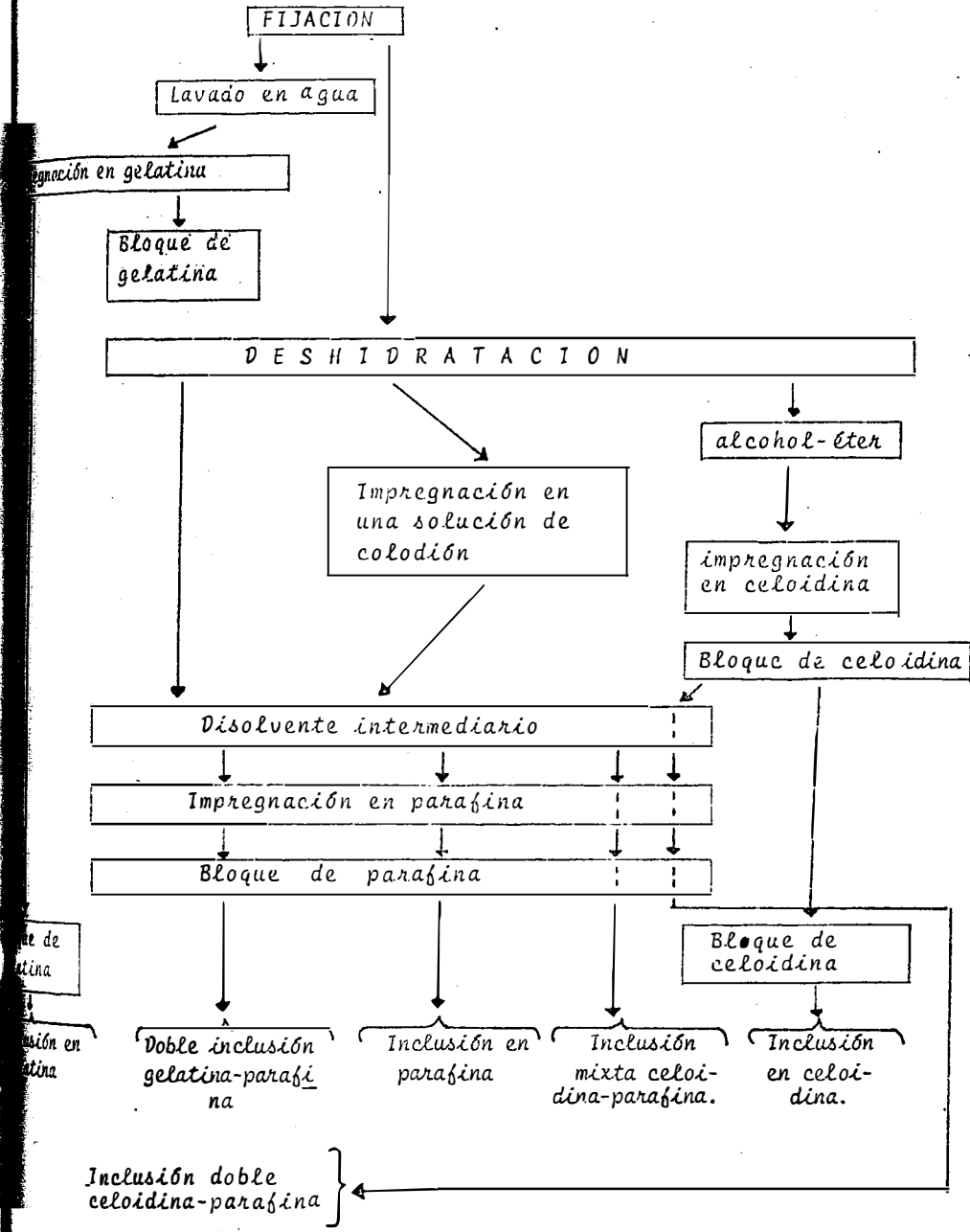
30. Después de enfriar, endurecer con alcohol de -
70°.

40. Cortar el cubo de gelatina alrededor de la pie-
za.

50. Incluir el cubo de gelatina como si fuera una pieza corriente, sometiénolo a baños intermediarios de - alcohol-toluol (1/1), toluol-parafina (1/1), para evitar la
retracción del bloque.

60. Cortar el bloque de manera que la gelatina sobresalga lateralmente, para facilitar la extensión - de los cortes.

CUADRO DE RESUMEN DE LOS PRINCIPALES TIPOS DE INCLUSIÓN



c) Para piezas destinadas a ser cortadas con el --
microtomo de deslizamiento.

1o. Como en el caso anterior.

2o. Impregnar con una solución de gelatina al 12%
durante 5 a 24 horas, en una estufa a 37°C.

3o. Impregnar en las mismas condiciones de tempera-
tura y tiempo, pero en una solución de gelatina del 25%.

4o. Incluir en gelatina del 25%.

5o. Dejar enfriar en el frigorífico durante 30 mi-
nutos a una hora.

6o. Retirar el molde, cortar el bloque.

7o. Pegar el bloque mediante una solución espesa -
de gelatina sobre el portabloques del microtomo.

8o. Endurecer con una solución de formol al 10%, -
minutos durante 12 horas.

9o. Cortar como el caso de los bloques en celoidi-
na, mojando constantemente la cuchilla con alcohol de 30°.

= CORTES =

Las tinciones de los tejidos se realizan normalmen-
te en los cortes. Estos cortes se manipulan individual-
mente, o se fijan en una lámina de vidrio.

MICROTOMOS Y CUCHILLAS

Los cortes se hacen mediante los microtomos. Hay_

diferentes modelos según el medio de inclusión. Por ejemplo:

- el microtomo de parafina (Tipo Minot);
- el microtomo de congelación;
- el microtomo de celoidina.

El criostato no es ningún tipo especial de microtomo, sino una combinación del microtomo de Minot y del de congelación.

Los microtomos en general, están formados por tres partes fundamentales:

Portabloques:

- un soporte para la cuchilla
- sistema de avance mecánico.

El objeto se desplaza en dirección a la cuchilla; ésta es fija (microtomo de Minot) o bien describe un movimiento de rotación parcial alrededor de un eje (M. de congelación) o un movimiento de traslación en dirección del bloque (M. de celoidina).

El bloque está fijo al soporte mediante un portabloques. El portabloques puede orientarse con respecto a la cuchilla, mediante una rótula. En el microtomo de congelación, el portabloques no es orientable; es una pieza hueca, cuya ranura está en relación con la llegada de gas carbónico destinado a enfriar la pieza.

La cuchilla está fija en el microtomo, sujeta en sus extremos por dos tornillos.

Las cuchillas tienen perfiles distintos, según el vaciamiento de la hoja, se designan con las letras a, b, c, ó d. Las cuchillas de hoja muy vaciada permiten hacer - los cortes muy delgados. Las hojas de cara plana (c), - más robustas, se reservan para cortar materiales duros. - Las cuchillas con bisel (d) sólo se emplean en casos espe- ciales (cortes de hueso, cuero, etc.).

Se procede a cortar el taco, con la pieza incluida en delgadísimas láminas que luego se montarán sobre el -- portaobjetos.

Casi todos los tejidos son más o menos blandos, pe- ro existen ciertos tejidos excesivamente duros; debido a esto es necesario distinguir las maniobras indispensables para cada uno de los casos.

El corte es el proceso mediante el cual se reduce - el taco de inclusión a delgadas láminas que luego serán - colocadas sobre el portaobjetos.

Los cortes tienen un espesor variable, según la ma- sa de inclusión usada. Si se incluyó en celoidina, el - espesor debe de ser de 6 micras. En el caso de la parafi- na, el espesor de 2 micras es suficiente.

CASO 1 CORTES EN TEJIDOS BLANDOS

Como ya se dijo, el proceso de fijación endurece - los tejidos blandos. Pero no les proporciona la consis- tencia adecuada para ser seccionados; esto se consigue - sólo con los procedimientos de congelación y de la - inclusión en parafina.

CORTES EN PARAFINA

Procedimiento útil para tejidos no excesivamente duros, no se debe usar en piezas que hayan sufrido la acción de endurecedores energéticos, ni en tejidos que tengan estructura muy laxa.

Ofrece la posibilidad de hacer cortes finos que se unen entre sí, formando una cinta.

Antes de la tinción, los cortes se pegan sobre portaobjetos y después se elimina el medio de inclusión.

a) CORTE DEL BLOQUE

Se debe quitar el exceso de parafina mediante cortes sucesivos con la cuchilla de un escalpelo, de manera que nos quede un prisma que contenga la pieza. Si se desea montar en serie, es conveniente reducir el volumen del prisma, a fin de poder pegar el mayor número de cortes sobre el portaobjetos.

Debe cortarse en forma de trapecio rectangular, donde dos lados del mismo deben ser rigurosamente paralelos. Los cortes se pegan unos a otros; si no hay paralelismo, las cintas se corvarán y deberán enderezarse en la extensión.

Al cortar el bloque es preferible dejar intacta la parte que se enganchará al portabloques, y sólo cortar la parafina que hay alrededor del objeto. La base del bloque debe ser menor que la superficie del portabloques.

b) FIJACION DEL BLOQUE Y ORIENTACION

El bloque cortado se fija sobre el portabloques. - La superficie a enganchar se ablanda mediante una lámina metálica calentada moderadamente en la llama de un mechero; después se coloca sobre el portabloques, donde la adhesión se logra fácilmente ejerciendo una ligera presión sobre el bloque.

Los portabloques metálicos pueden calentarse en la llama; el bloque se aplica sobre el portaobjetos y la adherencia se consigue mediante una pequeña presión. Cuidar que la temperatura del metal no sobrepase la temperatura de fusión de la parafina; si el bloque empezara a fundirse con rapidez, éste se sumergirá en un cristalizador con agua fría.

La orientación del bloque se obtiene mediante un sistema de rótula. El plano de corte está determinado por la cuchilla.

c) ORIENTACION DE LA CUCHILLA

Se denomina inclinación de la cuchilla a la inclinación que está con relación a la superficie del corte; es indispensable una correcta inclinación para obtener buenos cortes. Cuando se trata de la inclinación de una cuchilla, no debe considerarse la pieza en sí, sino el bisel obtenido después de su afilado. Este bisel determina, junto con el plano de cortar, un ángulo, denominado a veces ángulo de inclinación. Aun más eficaz es determinar experimentalmente la óptima posición de la cuchilla.

En el momento de efectuar el corte se produce cier

to aplastamiento, por lo que la superficie a cortar es -- siempre inferior a la del bloque.

d) CORTE Y EXTENSION

- El material debe estar en perfecto estado.
- Temperatura ambiente estable. Cuando se sobrepasan los 25°C , puede ser conveniente enfriar el bloque.
- El 80% de los fracasos obtenidos al cortar se debe a la deshidratación y a la inclusión.
- Cuando un objeto bien incluido se corta mal con una buena cuchilla frecuentemente se puede remediar.
- Para verificar la calidad de los cortes, puede sacarse uno de la serie, extenderlo y observarlo a pocos aumentos en campo oscuro.

En todos los modelos, el volante del microtomo se acciona con la mano derecha, mientras la cinta se recoge con la mano izquierda, sujetándola por su extremo con el mango de un escalpelo, por ejemplo.

Las cintas a medida que se hagan se fragmentan en segmentos de unos 30 centímetros y después se depositan ordenadamente sobre unas planchas de cartón, cuyo fondo puede recubrirse con papel negro, para facilitar la visualización de los cortes.

Tras la operación de cortar, los cortes se extienden y se pegan sobre el portaobjetos. El principio de la extensión de los cortes se basa en la dilatación de los cortes al calor.

Para que ésta se efectúe, se hace flotar el corte sobre un líquido y luego se somete a una temperatura ligeramente inferior al punto de fusión de la parafina. Si el líquido de extensión contiene a su vez una sustancia adhesiva, los cortes se pegan, a la vez que se extienden.

EN LA PRACTICA

1o. Limpiar cuidadosamente los portaobjetos, incluso si son nuevos. Dejar los portaobjetos en remojo en la mezcla:

- alcohol de 95° 9 vol.
- ácido clorhídrico 1 vol.

Durante cierto tiempo y después aclarado en agua corriente, da excelentes resultados.

2o. Preparar uno de los siguientes líquidos de extensión.

- a) Agua con albúmina.
- b) agua gelatinada de Marrison.
- c) mezcla para los cortes con celoidina-parafina.

3o. Marcar los portaobjetos en un ángulo con una punta de diamante. Asegura un marcaje duradero.

Procurar no recubrir la señal con bálsamo ni con el cubre al montar la preparación.

4o. El principio de extensión es siempre el mismo.

- a) Extensión de cortes aislados.- Depositar en el centro del portaobjetos, seco y ya señalado, una gota de líquido de extensión; situar un corte sobre la gota y --

trasladar el portaobjetos a una platina caliente. Cuando el corte y la parafina están bien extendidos, escurrir el líquido y mantener el corte en su sitio, bien centrado, - con ayuda de una aguja enmangada.

b) Extensión de series completas.- Procedimiento idéntico al anterior: fragmentos de cintas se depositan - sucesivamente sobre el portaobjetos provisto de líquido - de extensión.

c) Extensión de series alternadas.- Presenta ca-- racterísticas de la extensión de cortes aislados y de la - de cortes seriados. Método empleado en histoquímica.

Se prepara cierto número de portaobjetos y la ex- tensión se hace simultáneamente en todos los cortes; se - trasladan uno por uno sobre cada preparado.

DESPARAFINADO Y TINCION

El desparafinado precede a la tinción y consiste - en eliminar la parafina. Permite rehidratar el tejido. - Al principio se trata el corte con un disolvente de la pa- rafina, que puede ser el xilol y a cambios de alcohol, en concentración descendente y después sustituido por agua.

Las manipulaciones a seguir se hacen en recipien-- tes especiales o sobre los mismos portaobjetos, y son las siguientes:

a) Colocar en tres cambios sucesivos de xilol, de 5 a 10 minutos cada uno. El xilol que se emplea, puede - volverse a usar, siempre y cuando se filtre.

b) Colocar en alcoholes de 100° , 96° , 80° , 70° y 50° , por 5 minutos en cada uno.

c) Colocar en agua destilada; en este punto los cortes están listos para ser teñidos.

Los recipientes están provistos de una tapadera y pueden ser de varios modelos:

- Frascos de Borrel
- Tubos de Jolly
- Cubetas con ranuras, de vidrio o de porcelana
- Cubetas de vidrio, provistas de cestillas móviles. Las tinciones deben hacerse sobre recipientes cerrados cuando:

- Para el equilibrio de la reacción se requiere una gran cantidad de reactivo.

- Cuando el reactivo es volátil.

- Cuando la reacción se hace en caliente.

- Cuando el tratamiento en el reactivo es prolongado.

Otro sistema consiste en situar el portaobjetos horizontalmente en una cubeta y verter sucesivamente los diferentes reactivos sobre los cortes. Permite gastar menos cantidad de reactivos. Son suficientes unas gotas.

PROCEDIMIENTO POR CONGELACION

Esta maniobra se efectúa por medio del microtomo de congelación, y la congelación se logra por la evaporación de anhídrido carbónico líquido dispuesto en el aparato.

Es conveniente el lavado acuoso abundante para quitar el exceso de fijador.

CORTES POR CONGELACION

Las manipulaciones con los cortes obtenidos por -- congelamiento, ofrecen más dificultades que en el caso de los cortes en parafina. La obtención de los cortes seria dos es casi imposible. La temperatura óptima de enfriamiento se consigue por tanteo. La recogida de los cortes y el pegado es más difícil. Otro inconveniente es que, cuando las piezas han sido incluidas, no puede eliminarse el medio de inclusión.

El procedimiento es el siguiente:

1o. Se coloca una pequeña porción de organo, de aproximadamente 0.5cc, en la platina del microtomo de congelación, sobre un trozo de papel filtro humedecido.

2o. Se enfría con anhídrido carbónico, hasta que el tejido quede congelado.

3o. Logrado esto, la pieza ha adquirido suficiente dureza para poder seccionarse. Es indispensable vigilar el grado de congelación de cada organo, ya que si el bloque no está suficientemente congelado, o la congelación ha sido excesiva, los cortes se destruyen.

4o. Las secciones se recogen con un pincel y se colocan en un recipiente con agua destilada.

En algunos casos es imprescindible emplear este método:

- Permite cortar piezas sin necesidad de deshidratarlas, ni tratarlas con "disolventes", no hay que someterlas a altas temperaturas;
- Permite cortar tejidos no fijados;
- No necesita incluirse la pieza.

CORTES EN CELOIDINA

Poco empleado en histología normal, permite efectuar estudios topográficos de órganos cuyas dimensiones o consistencia hacen que no puedan emplearse otros métodos.

El aparato que se emplea es el microtomo de deslizamiento. Las operaciones se efectúan en alcohol de 70°, según el grado de perfeccionamiento del aparato, el conjunto bloque-cuchilla se humedece constantemente y los cortes se recogen uno a uno y se colocan enseguida en una cápsula de Petri.

El bloque, confeccionado en el momento del endurecimiento, se pega sobre el portaobjetos mediante una solución de coloidón al 8% en alcohol-éter.

Los cortes se tratan individualmente; su extensión se hace espontáneamente en alcohol de 70°. Se colocan sobre el portaobjetos después de efectuada la tinción.

El medio de inclusión se elimina con alcohol absoluto en el momento de la deshidratación que precede al montaje. El bálsamo de Canadá y las resinas sintéticas pueden emplearse para el montaje de las preparaciones.

TRATAMIENTOS ESPECIALES

La presencia de determinados materiales minerales, o de ciertos compuestos orgánicos en el organismo o tejido a estudiar, dificulta a veces la extensión de cortes, un tratamiento que elimina estos compuestos indeseables, sin lesionar o deformar las estructuras.

CASO 2 CORTES EN TEJIDOS DUROS

Cuando se quieren seccionar cortes excesivamente duros, tales como hueso, diente o cartílago en vías de osificación, se puede recurrir a dos procedimientos: uno en estado natural, mediante tallado, y otro mediante el auxilio de reactivos ablandantes o descalcificadores, empleados antes de cortar por congelación o por inclusión en parafina o celoidina.

PROCEDIMIENTO DE TALLADO.

- 1o. Hacer con una sierra de diente fino, un corte grueso, transversal • longitudinal de la pieza.
- 2o. Sobre una lija de grano medio se desbasta el corte por ambas caras, hasta alcanzar aproximadamente medio milímetro de espesor.
- 3o. El corte se lleva a una piedra de asentar de agua, humedecida en alcohol o agua, y se adelgaza y pule lo más transparente posible.
- 4o. La sección obtenida se lava con alcohol o xilol, para eliminar el polvillo que queda en los conductos.

Estas secciones pueden ser teñidas con anilinas.

50. Ya sean aclaradas o no, teñidas o no, se montan en bálsamo de Canadá, o resina.

TECNICAS DE ESTUDIO DE LOS MATERIALES CALCIFICADOS Y SU OBSERVACION

Los tejidos calcificados que requieren procedimientos especiales son el diente y el hueso.

PROCEDIMIENTO DE DESCALCIFICACION

Cuando se quieren efectuar cortes de huesos o dientes es necesario efectuar un previo reblandecimiento de las piezas mediante reactivos descalcificantes, por ejemplo, ácido nítrico al 5%, ácido clorhídrico al 10%, ácido pícrico a saturación, etc. en frío o en caliente, controlando la descalcificación con una aguja.

Estos métodos son lentos y los tiempos varían entre 15 y 72 horas, según los reactivos y el tamaño de la pieza.

DESCALCIFICACION

Es una técnica de suma importancia para la observación de tejidos calcificados, o sea aquellos que poseen sales de calcio en su estructura.

Uno de los compuestos más molestos es el calcio, que puede presentarse en cantidades masivas, por ejemplo, huesos, conchas, tegumentos, etc.

Cuando la cantidad de calcio sea escasa, será sufi

ciente escoger un fijador que contenga un agente descalcificante, tal como el Bouin.

Se realiza mediante ácidos que pueden ser orgánicos o inorgánicos. Por este método se puede observar partes que en desgaste desaparecerían por su bajo grado de dureza. Por ejemplo la pulpa dentaria, que jamás podría ser observada por desgaste, pues al rozar con la piedra, se destruye totalmente.

La descalcificación puede aplicarse a las piezas fijadas, antes o después de la inclusión. La descalcificación no debe hacerse nunca antes de la fijación. Si el tejido calcificado ocupa un pequeño volumen del conjunto de la pieza, se descalcificará sin previa inclusión. Si por el contrario, el ablandamiento de este tejido puede dislocar el conjunto, se aconseja una previa inclusión; también es aconsejada cuando es la estructura calcificada el objeto de estudio y contenga cantidades masivas de cal.

En estos dos últimos casos se incluirán las piezas en celoidina, que mantendrá los componentes in situ y la descalcificación se efectuará en el bloque de celoidina.

MÉTODOS PARA DESCALCIFICACION DE HUESOS Y DIENTES.

- 1o. Se fija el material en formol al 10%, por 24 horas.
- 2o. Se lava en agua corriente, por 10 minutos.
- 3o. Se toman 60 cc de solución acuosa, de ácido nítrico al 5% por sección de hueso o pieza dentaria, y se dejan de 3 a 24 horas a la temperatura ambiente.

40. Se calienta la solución de ácido nítrico en la estufa a 56°C y se coloca el material a descalcificar. Se renueva la solución en caliente, dos o tres veces, en un plazo de dos horas. En caso de piezas pequeñas, se controla cada media hora con una aguja de acero, clavándola ligeramente.

50. Se saca el material, una vez descalcificado, y se lava abundantemente en agua corriente.

60. Se corta con el microtomo de congelación, o bien se incluye en parafina o celoidina.

70. Se tiñen los cortes con hematoxilina-eosina, hematoxilina-sudán, Van-Gieson, etc.

NOTA: Si se quieren obtener mejores resultados, en lo relativo a tejidos blandos del interior del hueso (médula ósea, órgano de Corti, etc.), se recomienda hacer una descalcificación lenta a temperatura ambiente.

ACIDOS INORGANICOS EN DESCALCIFICACION

Se utilizan el nítrico y el clorhídrico. Este último respeta mucho las partes orgánicas, cosa que no sucede con el primero. El ácido clorhídrico presenta el inconveniente de ser más lento que el nítrico, por lo que se emplea en concentraciones más elevadas. Todos los ácidos que se usan para la descalcificación no se utilizan puros sino diluidos (del 4 al 8%). Los trozos con que se trabaja son pequeños. Se colocan en frascos grandes con abundante ácido. El tiempo que debe durar la descalcificación varía según la pieza y se considera suficiente -

cuando una fina aguja de histología puede penetrar sin dificultad, a través del tejido. Si esto sucede, ya podemos llevar el corte a los microtomos de congelación o hacer la inclusión en celoidina.

TECNICA DE DESGASTE

Se realiza para poder observar hueso y diente. Es de una realización muy difícil y incómoda.

La dificultad surge del hecho de que a pesar de que la técnica corriente no se usa (no hay fijación, ni inclusión, ni coloración) hay que desgastar el diente o hueso hasta llevarlo al espesor de unas micras. Se hace aproximadamente lisa una de las superficies del diente y se le pega a un portaobjeto. Luego se lo acerca a una máquina de afilar con piedras de distinta granulación. También puede desgastarse contra piezas fijas, pero el movimiento que debe hacer la mano es muy cansado.

Actualmente se están usando inclusiones del material en acrílico. Luego, con una rueda de carborundo, se cortan estos tacos en un torno.

El logro de un buen preparado es cuestión de experiencia y buena fortuna.

EXTENSIONES Y APOSICIONES

La técnica de los cortes es el método empleado en histología; sin embargo citaremos dos métodos que se aplican a tejidos particulares:

- La extensión (denominada *frotis*)
- La aposición.

Las extensiones son preparaciones obtenidas por la extensión de un líquido biológico. En este caso puede ser sangre.

Las aposiciones representan la huella de un tejido calcado sobre un portaobjetos. Se puede usar en el estudio de algunos tejidos blandos.

= COLORACIONES =

La coloración es la propiedad que poseen ciertos cuerpos de ejercer sobre la luz una absorción selectiva; dicho de otra forma, un cuerpo aparece coloreado porque transmite, por transparencia o difusión, las radiaciones complementarias de aquellos que absorbe.

Un colorante es un cuerpo coloreado que puede comunicar su coloración a otros cuerpos.

Cualquier configuración de la molécula que produce absorción de la luz se denomina badocrómica, y al grupo en general se denomina cromóforo.

Son grupos cromóforos los que contienen en su molécula dobles ligaduras conjugadas; esto hace aparecer el color.

Las sustancias que encierran en su molécula grupos cromóforos se denominan cromógenos. Para que un colorante se considere apto para la tinción debe contener, además del grupo cromóforo, otro que le imparta propiedades de electrolito, es decir, que tenga propiedades de ionizarse; a estos grupos auxiliares se les denomina genéricamente auxóchromos.

Los auxóchromos son agrupamientos no saturados, - - exaltan la coloración y confieren el poder tintóreo. Pueden ser ácidos, es decir, electronegativos caracterizados por la presencia de oxígeno, o pueden ser básicos o electropositivos, caracterizados por la presencia de nitrógeno.

Así la clasificación de los colorantes desde el - punto de vista químico estará dada por los grupos cromóforos, los cuales se dividen en dos grandes grupos: los ácidos y los básicos.

NATURALEZA DE LOS COLORANTES

En la práctica existen dos tipos de colorantes: - los que unen directamente a los tejidos, y otros que necesitan intermediarios, se unen indirectamente.

Las coloraciones directas son aquellas que se producen por inmersión en el baño colorante y se denominan - también coloraciones sustantivas. En las coloraciones indirectas es necesario que el objeto a colorear sea tratado previamente con otra sustancia intermedia, se le llama mordente; también se le llama coloración adjetiva o por mordencia. La combinación que el mordente forma con el colorante se denomina laca.

Se admite que la penetración del colorante es por ósmosis, y el problema se presenta en explicar cómo se fija el colorante a los tejidos.

La teoría física de A. Fisher, ve a las coloraciones como una fijación mecánica de las materias colorantes, seguida del fenómeno de adsorción o atracción hacia el -

tejido.

La teoría química apoyada por Ehrlich, Meyer, Flemming, Giemsa, etc. establece que la fijación de los colorantes en los tejidos tiene lugar mediante una unión química entre el colorante y los elementos constituyentes del tejido.

PROPIEDADES DE LOS COLORANTES

a- Difusos: Son aquellos que colorean todos los elementos de un órgano de una manera semejante, dando imágenes difusas. Ejemplo: azul de metileno.

b- Electivos: Nos permite distinguir las diferentes partes de un órgano y reconocer su afinidad tintoreal. Ejemplo: la hematoxilina y la eosina.

c- Específicos: Destinados a teñir un elemento determinado de un órgano o tejido. La orceína, por ejemplo, tiñe los elementos elásticos, aunque algunos afirman que tiñe las fibras colágenas. El ácido ósmico y el Sudán III para los lípidos, el muco-carmin para los elementos mucosos, etc.

d- Directos: Colorean directamente los tejidos. Ejemplo: la eosina.

e- Indirectos: Son los que necesitan de un mordente que ponga los tejidos en condiciones de tomar el colorante.

CLASIFICACION DE LOS COLORANTES

Se clasifican en dos grupos: los naturales y los -

artificiales.

. El primer grupo tiene poca importancia, porque la mayor parte son reparados sintéticamente. El segundo grupo corresponde a casi la totalidad de colorantes usados en la técnica histológica.

Colorantes naturales: Extraídos de productos animales y vegetales como el carmín, la hematoxilina, la orceína, el tornasol, etc.

Colorantes artificiales. Conocidos con el nombre de colorantes de anilina, de carbón o sintéticos. De acuerdo a la naturaleza de un cromóforo pueden ser: colorantes nitrados, colorantes azoicos, oxiquinonas, quinonoxinas, quinona-imidas, fenilmetanos, quinoleínas, acridinas, tiazoles, oxicetonas, xantonas y flavonas.

Los colorantes artificiales que se emplean son casi sales. Los colorantes básicos son sales en las cuales la base es coloreada, y el ácido es incoloro, por ejemplo el azul de metileno, que es una sal formada por la combinación de la tetrametilitionina coloreada, y el ácido clorhídrico, incoloro. Los colorantes ácidos son sales en las cuales el ácido es coloreado y la base es incolora, por ejemplo, la eosina que es una sal en la que el ácido eosínico es coloreado, en tanto que la potasa o sosa son incoloras.

Ehrlich distingue también a los colorantes neutros, en los cuales la base y el ácido son coloreados, como el píricato de azul de metileno.

Michels ha creado la categoría de los colorantes -

indiferente para aquellos que no son ni ácidos - ni básicos y no poseen agrupamientos capaces de formar -- sales, son por ejemplo el sudán III y el rojo escarlata.

MÉTODOS DE COLORACION

Los métodos de coloración se dividen de acuerdo a las relaciones entre el colorante y los tejidos:

Hay un punto de toda coloración que es el óptimo y que debemos obtener para que el tejido esté bien colorea-- do. Al punto óptimo se le puede llegar directamente o -- bien volver a él, después de habernos pasado.

i) COLORACIONES GENERALES Y ESPECIFICAS.

Las primeras se basan en el teñido intenso de los núcleos y débil del protoplasma, o en la fuente colora-- ción de ambas partes con colores distintos. Los segundos se aplican para estudiar particularidades histológicas.

ii) COLORACIONES DIRECTAS E INDIRECTAS.

Anteriormente ya se trataron estos dos métodos de coloración; sólo añadiremos el papel y la naturaleza de -- los mordentes, en el caso de coloraciones indirectas. El mordente actúa formando en el tejido una combinación colo-- reada muy estable e insoluble en el agua, que resiste a -- los agentes decolorantes, aumentando la selectividad del tejido por el colorante.

iii) COLORACIONES PROGRESIVAS Y REGRESIVAS.

Cuando el tejido adquiere, lenta y progresivamen--

te, el grado de color necesario, sin exigir una operación posterior de desteñido, tiene lugar la coloración progresiva; se usa con los colorantes que dan coloraciones muy sólidas o difíciles de diferenciar, por ejemplo, el azul de metileno, azul de algodón, carmín y hematoxilina. La coloración regresiva es aquella en el objeto sobrecolorado, por la excesiva concentración del colorante, debe sufrir la acción de un disolvente, cumple con dos fines - esenciales: elimina el exceso de colorante y respeta al teñido.

iv) COLORACIONES SIMPLES Y COMBINADAS.

Las coloraciones simples son aquellas que se obtienen con un solo colorante, ácido o básico. Según su naturaleza son monocromáticos o metacromáticos. En el primer caso, todos los elementos son teñidos en el tono del baño colorante; en el segundo ciertos elementos tisulares viran el color a un tono diferente; a este efecto se le conoce con el nombre de metacromasia.

El término metacromasia se aplica cuando un colorante primario puro, es capaz de colorear varios constituyentes tisulares con marcadas diferencias. Los elementos que hacen virar el color son llamados cromótrofos. Los tejidos que se tiñen de diferente manera con el colorante se denominan cromotrópicos, y los tejidos que se tiñen siempre del mismo color son llamados ortocromáticos. Hay que diferenciar el cambio de coloración que puede dar un colorante con impurezas; a este efecto se le llama alochromasia.

Las coloraciones combinadas pueden ser practicadas haciendo actuar diversos colorantes, ya sea sucesiva o simultáneamente. En las coloraciones sucesivas cada colo-

rante simple puede actuar independientemente y fijarse -- sobre un elemento dado, como en las coloraciones con hema toxilina-eosina. En las coloraciones simultáneas cada elemento actúa generalmente por su cuenta.

v) COLORACIONES PANOPTICAS.

No hay que confundir estas coloraciones con las -- combinadas, en las que actúan colorantes ácidos y bási- -- cos, en tanto que los agentes de coloración panóptica son colorantes neutros. Método importante en el estudio de -- la sangre. El fenómeno de metacromasia juega un papel -- muy importante en las coloraciones panópticas.

vi) COLORACIONES EN BLOQUE.

Los tejidos pueden ser coloreados en bloque; este método es usado muy poco, y sirve para estudiar animales enteros. Las coloraciones en bloque son directas, simples y progresivas, y deben ser aplicadas con colorantes muy penetrantes. Este procedimiento es muy económico y -- permite montar los cortes inmediatamente, pero no se obtienen coloraciones tan delicadas como la tinción sobre -- los cortes.

vii) IMPREGNACIONES METALICAS.

La impregnación a base de sales metálicas, principalmente de plata, ha sido indispensable para el estudio del sistema nervioso.

Algunas sales metálicas poseen la propiedad de precipitar selectivamente, sufriendo una descomposición en -- presencia del tejido.

Las impregnaciones metálicas se utilizan para estudiar los elementos existentes en el medio. Se valen de las sales de metales, sobre todo el nitrato de plata y del cloruro de oro pardo y amarillo.

Las impregnaciones metálicas consisten en una precipitación física de ínfimas partículas metálicas sobre determinados elementos histológicos. En cambio la coloración se acepta como una combinación química del colorante con los elementos histológicos.

COLORANTES INTRAVITALES, SUPRAVITALES Y POSTFIJACION.

INTRAVITALES

Son los que se utilizan cuando el organismo está vivo. Se inyectan por vía sanguínea o peritoneal.

Ejemplos: la tinta china, el azul pirrol, el litio-carmín y la plata coloidal.

SUPRAVITAL

Coloración realizada sobre la pieza extraída inmediatamente luego de la muerte del animal. Ejemplo: el rojo neutro, el verde de Jano, etc.

POSTFIJACION

Es la técnica usada, o sea colorear luego de la fijación.

COLORANTES NEUTROS

Son aquellos que poseen ambos grupos, ácido y bási

co, coloreados. Coloreando por tanto elementos ácidos y básicos (basófilos y acidófilos).

Hay ciertos colorantes que no atienden a estas reglas. Por lo que se les denomina indiferentes.

COLORANTES NATURALES

HEMATOXILINA

Es muy usada. Se obtiene del palo de Campeche. - Recién extraída no colorea. Debe ser oxidada, pero no muy intensamente, para evitar envejecimientos prematuros pues pierde su propiedad colorante. La hematoxilina necesita de un mordiente para colorear, por lo que se clasifica como colorante indirecto. Se usa en asociación con el mordiente constituyendo lo que se llaman masas hematoxilínicas o lacas hematoxilínicas.

Las lacas son los mordientes más usados. Son colorantes básicos.

Se las utiliza en la fórmula del hemalumbre ácido de Mayer, que contiene, además de hematoxilina, alumbre de potasio (mordiente), ácido nítrico, que conserva la solución, yodato de sodio, que oxida a la hematoxilina, hidrato de cloral y agua destilada.

Es un colorante de los llamados indicadores pues su coloración varía según el pH del medio; pH es el grado de alcalinidad y acidez de un medio generalmente acuoso. En realidad es la inversa del logaritmo de la concentración de hidrogeniones (o protones) y en condiciones de neutralidad tiene un valor de 7. Los pH menores son áci-

dos y los mayores alcalinos.

En el medio ácido, como lo obtenemos en el hemalum bre, la hematoxilina tiene color rosado. En medio básico su coloración vira a violeta. Si usamos la hematoxilina en una coloración combinada como la hematoxilina-eosina, y dado que la eosina colorea en rosado, nos conviene que la hematoxilina coloree en violeta. Esto lo conseguimos haciendo virar en un medio básico el color de la hematoxilina. El medio usado es agua de la canilla, la que contiene sales de metales alcalino-térreos, los que llevan a cabo la alcalinización requerida.

Esto lo podemos acelerar alcalinizando el agua que usamos con bicromatos de sodio y potasio.

También podemos usar gotas de amoniaco, las que -- nos darán un viraje de la hemotoxilina no hacia el violeta, sino hacia el azul.

CARMIN

Uno de los primeros colorantes conocidos. No sirve para teñir material incluido en parafina, se usa para colorante en masa. Es un colorante nuclear.

Otro colorante es la orceína, específico para elementos fibrosos del tejido conectivo.

COLORANTES ARTIFICIALES O SINTETICOS.

Son los obtenidos por una vía sintética y constituyen la gran mayoría de los colorantes. Son los más usados. Se dividen en ácidos, básicos y neutros.

COLORANTES SINTETICOS ACIDOS

Ya vimos el ácido pícrico, que actúa como fijador colorante. Junto con la fucsina constituye la picrofucsina, segundo paso en el método de coloración de Mallory.

EOSINA

Es un eosinato de potasio que se caracteriza por teñir los protoplasmas celulares, a diferencia de la hematoxilina, que tiñe núcleos. Ya veremos que con el azul de metileno constituye el colorante de May-Grünwald. Tiñe los gránulos de los granulocitos acidófilos (elementos figurados de la sangre), por lo cual son llamados también eosinófilos.

COLORANTES SINTETICOS BASICOS

Podemos citar en este grupo el azul de metileno, - muy usado en hematología, como también en el método de Cajal como colorante vital de neurofibrillas. Por oxidación en medio ácido, el azul de metileno se transforma en azul de metileno, el que actúa como un catalizador del azul; es decir, refuerza su acción. El azul de metileno es colorante específico de ciertas granulaciones que poseen algunos elementos de la serie linfática de la sangre. Su unión con el azul de metileno se llama azul II, para diferenciarlo del azul I, que es el puro.

VERDE DE METILO

Actúa sobre elementos ricos en oxígeno. Puede usarse en coloraciones combinadas.

TIONINA

Es de color rojo, pero tiñe algunos elementos como los gránulos de las células cebadas o matzcellen (células conjuntivas) de un color azul violáceo. Otro colorante básico es el azul de toluidina.

COLORANTES COMBINADOS

Son aquellos en los que se usan dos o más colorantes sobre un mismo corte. Citaremos la hematoxilina-eosina, el May Grünwald-Giemsa, etc.

TECNICA DE LA COLORACION CON HEMATOXILINA-EOSINA

Nuestra conducta variará en la técnica si hemos obtenido nuestras cortes por congelación o de tacos de celoidina o parafina.

Si es congelación, los cortes que hemos recogido del agua destilada debemos llevarlos directamente al colorante.

Si son tacos de celoidina, podemos hacer lo mismo, ya que ésta no impide la penetración del colorante, manteniendo además los diferentes elementos del corte en su lugar correspondiente.

Si se procede con un corte obtenido de un taco de parafina, y además lo hemos pegado al portaobjeto con albúmina glicerizada, no podemos llevarlo a la coloración porque la parafina impide la penetración de la hematoxilina. Para que la coloración sea viable debemos desparafinar primero e hidratar después el corte, o sea recorrer -

el camino inverso al de inclusión.

Además, debemos usar las ya nombradas conservas de Koplík, que poseen ranuras laterales en las que encajan los portaobjetos.

Debemos poseer varias conservas de Koplík: en la primera colocaremos xilol y luego ubicaremos los portaobjetos a los que hemos pegado a los cortes. El xilol actúa como desparafinante, pues es un solvente de la parafina. Esta desparafinación dura de tres a cuatro minutos.

Todavía nos falta hidratar el corte, para lo cual procederemos en forma inversa a la que utilizamos cuando las deshidratamos; es decir, nos valdremos de los alcoholes descendentes. Los sacamos del xilol y los colocamos en una conserva de Koplík con alcohol a 96°, 90° y 70°.

De éste, ya podemos colocarlo en agua destilada, de la cual irá el colorante. Toda hidratación debe ser paulatina y realizarse utilizando la mayor cantidad de alcoholes posible, pues uno de estos procesos, realizado en forma brusca, causaría alteraciones morfológicas y tincionales en los tejidos por examinar.

Realizada la hidratación, tenemos el corte en condiciones de sostenerlo a la hematoxilina. Utilizaremos para ello el hemalumbre ácido de Meyer, en el cual el corte deberá permanecer de 10 a 15 minutos. Cuando lo retiramos del hemalumbre veremos que tiene una coloración rosada y como la eosina que también usaremos es rosada, nos conviene realizar el viraje de la hematoxilina, que se hace con agua corriente. Luego del viraje, el corte se pre

sentará violáceo.

Ahora debemos colorear con eosina, para lo cual -- usaremos una solución alcohólica de este colorante. En la eosina el corte debe permanecer de 30 a 45 segundos. -- luego lo sacamos de ella y lo pasamos por agua destilada -- para quitar los excesos del colorante. Posteriormente lo deshidratamos y estamos en condiciones de realizar el -- montaje final.

El pasaje por los alcoholes para realizar la deshidratación previa al montaje debe ser rápido, pues los alcoholes diferencian a la eosina, es decir decoloran.

Para teñir los cortes de celoidina o por congelación no se usan las conservas de Koplík ya que estos cortes los tenemos sueltos en diferentes líquidos dentro de pequeñas cápsulas de Petri. Para pasar los cortes de una cápsula a otra, debemos "pescar" los cortes, operación -- que se realiza con una varilla de vidrio afinada en su extremo y doblada en ángulo recto.

COLORACION DE MAY-GRUNWALD-GIEMSA.

El May-Grünwald es, como ya vimos, una solución de eosinato de azul de metileno en alcohol etílico. Esta coloración se realiza sobre frotis, generalmente. Una vez -- realizado vertemos sobre él tantas gotas de May-Grünwald -- como sean necesarias para cubrir por completo el frotis. Tres minutos después y sin volcar la solución agregamos -- igual número de gotas de agua destilada; debe permanecer -- durante un minuto sobre el frotis. En el primer tiempo -- el alcohol metílico de May-Grünwald actúa sólo como fija-

dor, vale decir no colorea. La coloración se produce - - cuando entra a actuar el agua destilada, pues esta solubiliza al eosinato de azul de metileno y favorece así la coloración.

Va realizado el May-Grünwald, debemos efectuar la coloración Giemsa. Esta solución se deriva de los líquidos de Romanousky y contiene Azur II-eosina, Azul II puro, glicerina y alcohol metílico. Para usarlo debemos realizar una dilución del Giemsa en agua destilada.

La proporción de la dilución es de tres gotas de - Giemsa por cada dos de agua destilada. El Giemsa debe - actuar de 15 a 20 minutos. Por último tomamos el preparado, así como un trozo de papel de fieltro, lo doblamos sobre sí mismo varias veces, lo colocamos sobre el frotis - coloreado y presionamos suavemente cuidado de no deslizar lo.

= MONTAJE FINAL =

Tenemos ya nuestros cortes deshidratados hasta alcohol 100%; aun necesitamos de sustancias aclarantes que - tienen por finalidad hacer el campo más nítido. Para es- to tenemos el xilol, que se usa puro, pues debemos adicionarle una pequeña cantidad de ácido fénico. Esto es ávi- do de agua, lo que completa la deshidratación si esta no ha sido total por efecto de los alcoholes. Además tiene poder antiséptico.

Una vez que actúa la mezcla, que se llama carboxi- lol, debemos hacer actual xilol puro.

La protección de los cortes teñidos se consigue me diante láminas de vidrio llamadas cubreobjetos. Los cor-

tes teñidos no aguantan la desecación y es preciso interponer entre el portaobjetos y el cubreobjetos un medio de montaje. El medio de montaje debe:

- Ser transparente;
- Asegurar la mejor conservación posible de las preparaciones;
- Asegurar la adherencia del cubreobjetos y del portaobjetos.

Hay dos clases principales de montaje: los que se hacen en un medio anhidro y los que se hacen en un medio acuoso.

1o. METODO EMPLEADO CUANDO ES POSIBLE LA DESHIDRACION

Se monta la preparación en una resina, siendo la más empleada el Bálsamo de Canadá. El bálsamo presenta el inconveniente de alterar a la larga, algunas tinciones debido a su carácter reductor. La técnica de Montaje en Bálsamo oxidado es para remediar este inconveniente.

Las resinas sintéticas presentan ventajas sobre el bálsamo. El bálsamo se vende en estado natural o disuelto en benceno, en xilol o en esencia de orégano.

2o. METODO EMPLEADO CUANDO NO ES POSIBLE LA DESHIDRACION

El medio de montaje ya no puede ser una resina, si no una mezcla hidrosoluble. Dos de los medios de montaje más empleados son: la glicerina gelatinada (39) y el Jara be de Apathy (40).

El sorbitol es un medio de montaje muy estimado.

CAPITULO VI

TECNICAS HISTOLOGICAS

TEJIDOS CONJUNTIVOS.- Los tejidos conjuntivos son frecuentemente muy complejos y están constituidos por células, fibras y sustancia fundamental.

FIBRAS.- Las fibras conjuntivas son los elementos de este tejido que se ponen de manifiesto con mayor facilidad. Hay que distinguir tres categorías:

- Fibras de colágena;
- Fibras reticulares;
- Fibras elásticas.

Algunos métodos tiñen simultáneamente los tres tipos de fibras, mientras que otros métodos son selectivos de uno u otro tipo.

FIJACION.- Todos los fijadores usados en histología general conservan las fibras conjuntivas, pero algunos métodos de tinción son incompatibles con el empleo de determinados fijadores. Hay que evitar el empleo de fijadores que contengan tetróxido de osmio.

MÉTODOS DEMOSTRATIVOS DE LAS FIBRAS COLAGENAS Y RETICULARES.

Los métodos generales comprenden un colorante de la familia de los trifenilmetanos, que tiñen globalmente las fibras colágenas y las reticulares sin poder apreciar ninguna diferenciación entre los dos tipos.

Son interesantes:

- El Picrocarmín de índigo, que tiñe las fibras de azul; puede estar precedido por una tinción con hemalum-bre o rojo nuclear sólido con la fucsina de Ziehl o también con la tinción nuclear de Feulgen.

- El verde-luz tiñe las fibras de verde. Se emplea en el tricrómico de Prenant, variante de Gabe o en el método de Masson-Goldner.

- El verde sólido, que tiñe igualmente las fibras de verde, es uno de los componentes del tricrómico en un tiempo.

- El azul de anilina, tiñe las fibras de azul, ya que es de gran interés que el número de fibras sea poco numeroso. Este colorante forma parte del azan o del método tetracrómico de Herlant.

- La Fucsina ácida, que tiñe las fibras de rojo, se emplea en la tinción de Van Gieson. En ciertos casos, las fibras elásticas adquieren una tonalidad ligeramente rosada.

DIFERENCIA ENTRE LAS FIBRAS COLAGENAS Y LAS RETICULARES.

Un número muy reducido de métodos de tinción permiten diferenciar las fibras de colágena de las reticulares. La mayor cantidad de polisacáridos que contienen las fibras reticulares determina que con ciertas reacciones (PAS) adquieran una coloración difícil de apreciar. La colagenasa digiere los dos tipos de fibras.

El mejor método es el de impregnación argéntica de

Gomori que se basa en la argirofilia, más acusada de las fibras reticulares.

FIBRAS RETICULARES

- Método de Impregnación Argéntica de Gomori
- Método de Río-Hortega.
- Método de Humason y Lushbaugh (1960) (Tinción diferencial).
- Método de Doble Impregnación en caliente de Río-Hortega para armazones fibrilares.
- Método de Doble Impregnación con Permanganato para armazones fibrilares.
- Método de Oxido de Plata amoniacal para reticulina.

+ METODO DE IMPREGNACION ARGENTINA DE GOMORI.- Fijación.- Formol o Carnoy (15 u 8).

CORTES.- En parafina, en congelación o en celoidina, pegados al portaobjetos con albúmina o con agua destilada.

REACTIVOS:

- Solución acuosa de permanganato potásico al 1%;
- Solución acuosa de metabisulfito potásico al 2%;
- Solución acuosa de alumbre férrico al 2% prepara da antes de usar;
- Complejo de plata amoniacal (52) diluido, por tiempo limitado, en un volumen igual de agua destilada.
- Formol al 10%;
- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 2%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar.
2. Oxidar durante uno o 2 minutos con el permanganato.
3. Lavar con agua corriente.
4. Blanquear con metabisulfito.
5. Lavar con abundante agua corriente.
6. Tratar con una solución de alumbre férrico durante un minuto.
7. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
8. Pasar dos veces por agua destilada.
9. Tratar durante un minuto con el complejo argéntico.
10. Lavar con agua destilada, como máximo 10 segundos -
(frecuentemente menos tiempo).
11. Reducir con formol.
12. Lavar con agua corriente.
13. Pasar rápidamente por el hiposulfito.
14. Lavar con abundante agua corriente.
15. Deshidratar.
16. Montar.

RESULTADOS.- Las fibras reticulares se colorean en negro y las fibras colágenas en naranja (o en púrpura, en caso de un viraje con el oro, como en el método de Ramón y Cajal).

ADVERTENCIA IMPORTANTE.- El resultado óptimo de este método depende del lavado que precede a la reducción por el formol. La duración del mismo debe determinarse empíricamente.

+ METODO DE RIO-HORTEGA PARA LAS FIBRAS RETICULARES.- FIJACION.- Formol.

CORTES.- Por congelación (10 a 15)

REACTIVOS:

- Tanino al 1% en alcohol de 95°;
- Complejo de Río-Hortega (53), diluido antes de usar al 1/10 en agua destilada;
- Formol neutro al 20%.

MODO DE EMPLEO:

1. Tratar los cortes con tanino-alcohólico, durante 5 minutos, a 50°C.
2. Lavar rápidamente con agua destilada.
3. Impregnación con la mezcla de Río-Hortega; someter el material a tres baños sucesivos, cuya duración se calculará empíricamente.
4. Lavar rápidamente con agua destilada.
5. Reducir con formol neutro durante 30 segundos.
6. Lavar con agua corriente.
7. Deshidratar.
8. Montar.

RESULTADOS.- Las fibras reticulares se impregnan de negro.

TINCIÓN DIFERENCIAL DE LAS FIBRAS COLAGENAS, RETICULARES Y ELASTICAS.

+ METODO DE HUMASON Y LUSHBAUGH (1960).- Este método puede parecer largo, ya que deben hacerse una serie de baños sucesivos; pero tiene la ventaja de poder distinguir en la misma preparación los tres tipos de fibras conjuntivas, a la vez que proporciona imágenes muy nítidas.

das; este método puede ser de gran utilidad en anatomopatología.

REACTIVOS:

- Piridina alcohólica:
 - Piridina 1 volumen
 - Alcohol de 95° 1 volumen
- Solución acuosa de ácido periódico al 0,5%;
- Complejo de Plata amoniacal: a 10 ml. de una solución acuosa de Nitrato de Plata al 10,2%, añadir amoníaco hasta la redisolución casi completa del precipitado de hidróxido de plata. Añadir 10 ml. de una solución acuosa de Carbonato Sódico al 3,1%; completar con agua destilada hasta los 100 ml. y filtrar.
- Solución de formol tamponado:
 - Formol al 5% 50 ml.
 - Solución acuosa de carbonato sódico al 1% 1 ml.
- Baño de Viraje:
 - Cloruro de Oro 0,5 gramos
 - Agua destilada 100 ml.
 - Acido Acético 1 gota
- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%;
- Solución de Orceína:
 - Orceína 1 g
 - Alcohol de 70° 100 ml.
 - Acido clorhídrico puro 0,6 a 1 ml.
- Solución acuosa de ácido fosfomolibdico al 5%;
- Solución de azul de anilina:

- Azul de anilina hidrosoluble ... 0,1 gramo
- Acido oxálico 2 g
- Acido fosfomolibdico 15 g
- Agua destilada 100 ml.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, y someter los cortes a la acción del alcohol de 95°.
2. Pasar por la piridina alcohólica durante 15 minutos.
3. Lavado rápido con alcohol de 95°.
4. Lavar durante 5 minutos en agua corriente.
5. Tratar con ácido peryódico de 10 a 15 minutos.
6. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
7. Pasar con agua destilada calentada a una temperatura de 37°C.
8. Tratar con el complejo de plata amoniacal, a 37°C, de una hora 30 minutos a 2 horas.
9. Lavado rápido en agua amoniacal (1 gota de amoniaco - por 100 ml. de agua).
10. Tratar en formol tamponado durante 5 minutos.
11. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
12. Tratar el material durante algunos minutos con el líquido de viraje.
13. Lavar con agua destilada.
14. Pasar rápidamente por el hiposulfito sódico.
15. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
16. Tratar con una solución de orceína durante 15 minutos a 17°C durante 1 hora a la temperatura ambiente.
17. Lavado rápido con alcohol de 70° y después con agua destilada.
18. Tratar con ácido fosfomolibdico de 10 a 15 minutos.
19. Lavado rápido con agua destilada.
20. Teñir con azul de anilina, de 2 a 3 minutos.

21. Lavado rápido en agua destilada.
22. Pasar por agua acética durante 5 minutos.
23. Deshidratar, empezando por el alcohol de 95°.
24. Montar.

i RESULTADOS.- Las fibras de colágena quedan teñidas de azul; las fibras reticulares, de negro, y las fibras elásticas, de pardo-rojizo; los núcleos quedan pardonegruzcos; los eritrocitos quedan frecuentemente anaranjados.

+ METODO DE DOBLE IMPREGNACION EN CALIENTE DE RIO-HORTEGA PARA ARMAZONES FIBRILARES Y CELULAS.

1. Fijar en formol al 10%.
2. Hacer cortes por congelación.
3. Lavar en agua amoniacal, de 15 minutos a 24 horas.
4. Lavar en agua destilada.
5. Hacer la impregnación en nitrato de plata al 2%, calentando hasta que los cortes tomen un color tabaco rubio.
6. Lavar rápidamente en agua destilada.
7. Hacer una segunda impregnación en carbonato de plata amoniacal con tres gotas de piridina, calentando hasta que los cortes tomen un color tabaco oscuro.
8. Lavar rápidamente en agua destilada
9. Reducir en formol al 10%, de 1 a 2 minutos
10. Lavar en agua destilada
11. Virar en cloruro de oro, 15 minutos en frío (gris), reforzando la coloración en caliente de 10 a 40 minutos (violeta intenso).
12. Fijar en hiposulfito de sodio al 5%, por 5 minutos.
13. Lavar en agua destilada.
14. Deshidratar en alcohol de 96°.

15. Aclarar en creosota
 16. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Fibras nerviosas	Negro intenso
Núcleos	Negro granuloso
Soma celular	Gris violáceo muy tenue
Colágena	Gris violáceo
Precolágena	Pardo
Fibras musculares	Negro
Músculo estriado	Gris

+ METODO DE DOBLE IMPREGNACION CON PERMANGANATO PARA
 ARMAZONES FIBRILARES.

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes delgados por congelación
3. Lavar en agua amoniacal, de 5 minutos a 24 horas
4. Lavar en agua destilada
5. Introducir los cortes en una solución reciente de permanganato de potasio (L) a 15 cristales de permanganato de potasio en 40 cc de agua destilada. Todos los cortes se meten al mismo tiempo, el primero se saca en 30 segundos, el segundo al minuto, el tercero a los 2, el cuarto a los 4, el quinto a los 8 y el sexto a los 16.
6. Sumergir los cortes directamente en una solución de ácido oxálico (10 a 15 cristales de ácido oxálico en 40 cc de agua destilada); aquí permanecen los cortes hasta que adquieren un color blanco transparente.
7. Lavar en agua destilada
8. Lavar en agua amoniacal para quitar el exceso de ácido.
9. Lavar en agua destilada

10. Impregnar los cortes de nitrato de plata al 2%, calentando hasta que los cortes tomen un color amarillento.
11. Lavar rápidamente en agua destilada
12. Hacer una segunda impregnación en carbonato de plata con 3 gotas de piridina, calentando hasta que los cortes tomen un color tabaco oscuro.
13. Reducir en formol al 1%, por 1 ó 2 minutos
14. Lavar rápidamente en agua destilada
15. Virar en cloruro de oro al 1 x 500, 15 minutos en frío y 15 en caliente.
16. Fijar la impregnación en hiposulfito de sodio al 5% por 5 minutos
17. Lavar en agua destilada
18. Deshidratar en alcohol de 96°
19. Aclarar con creosota
20. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

RESULTADOS:

Colágena	Gris violáceo
Fibras reticulares	Negro

+ METODO DE OXIDO DE PLATA AMONIACAL PARA RETICULINA (segunda variante de Río-Hortega al método Achúcarro).

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación de 10 a 15 micras
3. Sumergir los cortes en una solución alcohólica de tanino al 1%, de 15 a 30 minutos, a 40-45°C
4. Lavar rápidamente en agua destilada antes de que el tanino se enfríe.
5. Pasar los cortes por tres pocillos que contengan cada uno 10 cc de agua destilada y 1cc de óxido de plata amoniacal. Agitar los cortes y cuando empiecen a ama

rillear pasarlos al segundo y tercer baño, hasta que adquirieran un tono amarillento irregular.

6. Lavar en agua destilada sin mover, hasta que el color se intensifique y regularice.
7. Reducir en formol neutro al 20%, durante 30 segundos.
8. Lavar en agua destilada
9. Deshidratar en alcohol de 96°
10. Aclarar con creosota
11. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

RESULTADOS:

Reticulina	Pardo oscuro o negro
Colágena	Gris rojizo

NOTA: El formol puede neutralizarse con un poco de carbonato de magnesio que cubra el fondo de una botella ámbar, agregando el formol y agitando.

FIBRAS COLAGENAS

- Método de Humason y Lushbaugh (1960) (tinción diferencial) (anteriormente mencionado)
- Hemalumbre-picrocarmin de Indigo
- Método de Doble impregnación en caliente de Río-Hortega para armazones fibrilares y células (ya mencionado anteriormente)
- Método de Doble impregnación con permanganato para armazones fibrilares (ya mencionado anteriormente).

+ HEMALUMBRE PICROCARMIN DE INDIGO

REACTIVOS: Hemalumbre de Masson (65).
Picrocarmin de Indigo de Calleja (78)

MODO DE EMPLEO: de *Las fibras elásticas*

1. Desparañar (colodionar), hidratar.
2. Teñir con hemalumbre de 2 a 5 minutos
3. Lavar con agua corriente hasta que vire adquiriendo una tonalidad azul negruzca (de 2 a 5 minutos)
4. Teñir durante 30 segundos con picrocarmín de índigo.
5. Deshidratar directamente con alcohol absoluto.
6. Montar.

ADVERTENCIA.- El hemalumbre se emplea en este caso como tinción progresiva.

El progreso es regresivo cuando los cortes permanecen en el colorante 30 minutos y sigue una diferenciación en alcohol-clorhídrico (ácido clorhídrico al 0,25% en alcohol absoluto).

RESULTADOS

Núcleos y citoplasmas basófilos	Pardo
Citoplasmas acidófilos y nucleolos	Amarillo o verde
Fibras colágenas	Azul
Eritrocitos	Amarillo
Algunas secreciones	Pardo, amarillo o verde.

MÉTODOS DEMOSTRATIVOS DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS, SIN PONER DE MANIFIESTO LAS FIBRAS COLÁGENAS Y RETICULARES.

Los métodos clásicos de tinción de las fibras elásticas contienen orceína. Actualmente se usa también el método de Fucsina-Paraldehído, que efectuado sin oxidación, tiñe las fibras elásticas de violeta y algunas basa

les, sin poner de manifiesto las demás categorías de fibras conjuntivas.

FIBRAS ELASTICAS

- Método de Unna con orceína-azul policromo
- Fucsina-Paraldehído
- Método de Gallego
- Método de Unna-Tanzer
- Método de Humason y Lushbaugh (Tinción Diferencial) (ya mencionado anteriormente).
- Método de impregnación con carbonato simple en caliente.
- Método de óxido de plata amoniacal para fibras elásticas
- Método de Gallego, modificación de Reyes Mota.

+ METODO DE UNNA CON ORCEINA-AZUL POLICROMO.- REACTIVOS:

- Azul policromo (47);
- Solución de orceína al 0,25% en alcohol de 70°.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar (colodionar, hidratar)
2. Teñir con azul policromo de 5 a 15 minutos
3. Lavar con agua corriente
4. Diferenciar con la solución de orceína
5. Deshidratar
6. Montar

RESULTADOS:

Fibras elásticas

Pardo

Otros métodos pueden proporcionar imágenes de las fibras elásticas, pero carecen de especificidad y solamente pueden emplearse como métodos complementarios; tal es el caso de la reacción nuclear de Feulgen y Rossenbeck, - la de Bauer, la de Hothkiss-Mac-Manus, la reacción plasmal, que puede teñir las fibras elásticas de ciertos órganos de rojo-violeta; el mismo resultado se obtiene usando el método de las reacciones de aldehídos libres (Método - D.D.D.).

Los métodos de impregnación argéntica, después de someter el material a la acción de un mordiente, son interesantes para la localización de las fibras reticulares - en cortes obtenidos por congelación.

Segunda variante del método de Río-Hortega.

La Fucsina-Paraldehído seguida de una tinción de contraste que puede ser el picrocarmín de Índigo (78), -- permite poner de manifiesto las fibras elásticas (de violeta) y las colágenas-reticulares (de azul). Las membranas basales también se tiñen de violeta.

+ METODO DE FUCSINA-PARALDEHIDO

Perfeccionada para la tinción de fibras elásticas (Gomori, 1950), según su grado de oxidación varía el método en su fase inicial.

- Para la tinción selectiva de las fibras elásticas: sin oxidación.

- Para la tinción de productos de secreción: previa oxidación.

FIJACION.- Pueden utilizarse todos los fijadores utilizados en histología general. Evitar las fijaciones prolongadas en los líquidos que contengan bicromatos.

REACTIVOS:

- oxidante de Gomori (76);
- fucsina-paraldehído (62);
- solución acuosa al 2% de bisulfito o metasulfito de sodio;
- solución de ácido clorhídrico al 0,5% con alcohol absoluto

MODO DE EMPLEO:

a) SIN OXIDACION

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar.
2. Teñir con Fucsina-Paraldehído durante 5 minutos.
3. Lavar con agua.
4. Deshidratar con alcohol absoluto.
5. Diferenciar con alcohol clorhídrico hasta que - no haya eliminación de colorante (desde algunos segundos hasta varios minutos).
6. Lavar con agua.
7. Aplicar uno de los métodos descritos anteriormente.

RESULTADOS:

Fibras elásticas

violeta

+ METODO DE GALLEGO +

Basado en la afinidad de las fibras elásticas para

la fucsina básica, puede ser muy ventajoso si va seguido de una tinción con picrocarmin de índigo.

REACTIVOS:

- Formol Ferro-nítrico:

- Agua destilada.....10 ml
- formol comercial11 gotas
- ácido nítrico puro 1 gota
- percloruro de hierro al 10% 1 gota

- Reactivo de Gallego (FUCSINA DE ZIEHL ACETICA):

- Agua destilada10 ml
- fucsina de Ziehl (63) ..15 gotas
- ácido acético 1 gota

- Picrocarmin de Indigo (78).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar (colodionar), hidratar.
2. Emplear como mordiente el formol ferro-nítrico durante 5 minutos.
3. Lavar con agua destilada.
4. Teñir con el reactivo de Gallego durante 5 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Pasar por el formol ferro-nítrico, de 5 a 10 minutos.
7. Lavar con agua corriente.
8. Teñir con picrocarmin de índigo, de 10 a 20 segundos.
9. Deshidratar.
10. Montar.

RESULTADOS:

Núcleos	Violeta-negro
Fibras elásticas	Violeta-negro
Fibras de Colágena	Azul
Fibras Reticulares	Azul
Citoplasmas	Amarillos o verdes

+ METODO DE UNNA-TANZER

Combina la orceína con el picrocarmín de Índigo: - primero se tiñe la colágena mediante el picrocarmín de Índigo y a continuación se tiñen las fibras elásticas por la orceína.

REACTIVOS:

- Solución de orceína al 1% en alcohol absoluto, - acidificada por un 0,7% de ácido clorhídrico;
- Picrocarmín de Índigo (78).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar (colodionar), hidratar.
2. Teñir con orceína de 15 a 30 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Teñir durante 20 segundos con picrocarmín de Índigo.
5. Diferenciar el exceso de orceína mediante una - deshidratación prolongada en el alcohol absoluto.
6. Montar.

RESULTADOS:

Fibras elásticas
Colágena

Pardo
Azul-verdoso

METODO DE HUMASON Y LUSHBAUGH (Anteriormente mencionado en la Hoja No. 158).

+ METODO DE IMPREGNACION CON CARBONATO SIMPLE EN CALIENTE

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10% fragmentos de no más de 0.5 cc, de 1 a 3 meses
2. Hacer cortes por congelación, de 10 a 12 micras
3. Lavar en agua amoniacal, de 10 a 30 minutos, para eliminar totalmente el formol
4. Lavar en agua destilada
5. Hacer la impregnación en carbonato de plata amoniacal con 3 gotas de piridina, calentando a 60°C, hasta que los cortes tomen color café tabaco, agitando constantemente.
6. Lavar en agua destilada, en donde los cortes deben tomar un color amarillo dorado.
7. Reducir en formol al 1% durante 30 segundos.
8. Lavar en agua destilada. Si se desea, virar en cloruro de oro al 1 x 1500, durante 15 minutos en frío y 15 minutos en caliente; los cortes deben tomar un color gris. Pasar los cortes a hiposulfito de sodio al 5%, durante 5 minutos, moviendo los cortes hasta que tomen un color púrpura.
9. Lavar en agua destilada
10. Deshidratar en alcohol de 96%.

11. Aclarar en creosota. Los cortes pueden dejarse aquí de un día para otro.
12. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

RESULTADOS:

Núcleos	Café (sin virar) o púrpura (virando en cloruro de oro)
Fondo	Tonalidades de café o púrpura

+ METODO DE OXIDO DE PLATA AMONIACAL PARA FIBRAS ELASTICAS.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%, por 10 días como mínimo.
2. Hacer cortes delgados por congelación
3. Sumergir los cortes en una solución acuosa de tanino - al 3% por 5 minutos a temperatura de 50 a 55°C
4. Sumergir los cortes en agua amoniacal (20 cc de agua - destilada con 4 gotas de amoniaco), hasta que recobren la flexibilidad y transparencia perdidas.
5. Sumergir los cortes en óxido de plata amoniacal, conteniendo en tres pocillos sucesivos, con 10 cc de agua - destilada y 1 cc de óxido de plata amoniacal. El tiempo de la inmersión será de 30 minutos, debiendo estar 15 minutos en el último, al final del cual la solución debe quedar transparente; los cortes deben tener un color amarillo tostado.
6. Lavar abundantemente en agua destilada
7. Virar en cloruro de oro a 1 x 500, durante 10 minutos a 40-45°C, o en frío durante 20 ó 30 minutos
8. Fijar en hiposulfito de sodio al 5%, durante 5 minutos
9. Lavar abundantemente en agua destilada.
10. Deshidratar en alcohol de 96°

PREPARACION DE SOLUCIONES:

- Solución A

Formol al 1%	50 cc
Acido acético	2 gotas
Carbol fucsina	25 gotas

- Solución B

Formol al 1%	50 cc
Acido acético	20 a 30 gotas

+METODOS DEMOSTRATIVOS DE LAS FIBRAS CONJUNTIVAS EN GENERAL.

Los métodos de detección simultánea de la colágena, reticulina y fibras elásticas son interesantes cuando permiten distinguir unas categorías de otras; por ello describiremos una técnica que tiñe todas las fibras de idéntica manera: método con azul luxol.

En general, los métodos más usuales combinan un colorante para la colágena-reticulina (picrocarmin-índigo) con un método específico de tinción de fibras elásticas.

METODOS DE FIBRAS CONJUNTIVAS

- Método de Salthouse (1965) con azul luxol.

METODO DE SALTHOUSE (1965) CON AZUL LUXOL

Cuando el azul luxol (Luxol Fast Blue G) está disuelto en metanol, tiñe de manera selectiva el conjunto de fibras conjuntivas.

REACTIVOS:

Solución saturada (un 0,9% aproximadamente) de - - azul luxol en metanol absoluto.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, pasar los cortes en alcohol absoluto y - luego a metanol.
2. Teñir durante 3 minutos con azul luxol.
3. Lavado rápido en dos baños de metanol.
4. Pasar con toluol y montar, o bien lavar con agua y teñir con el rojo nuclear sólido (80) para dar contraste.
5. Lavar, deshidratar y montar.

RESULTADOS

Fibras conjuntivas

Azul

= CELULAS =

Las diversas clases de células conjuntivas se distinguen morfológicamente entre sí, así como sus afinidades tintóreas o por sus productos de reserva.

Los métodos que exponemos a continuación son aplicables tanto para las células conjuntivas como para las - células sanguíneas.

FIJACION:

Los mejores resultados se obtienen tras fijación a base de bicromato potásico y de sublimado (Tipo Helly), - sin poscromización.

Cuando conviene conservar las inclusiones lipídicas habrá que añadir al helyy un 5% de la solución de tetraxido de osmio al 2%; el tiempo de fijación será de 24 horas.

+ CELULAS CONJUNTIVAS

- Método de verde de metilo-pironina.

+ METODO DEL VERDE DE METILO-PIRONINA

De gran utilidad para el estudio de las células conjuntivas, tiñe muy bien los plasmocitos.

TINCIÓN CON VERDE DE METILO-PIRONINA

FIJACION:

Puede emplearse la mayor parte de los fijadores. - El empleo de fijadores a base de bicromatos puede hacerse si el tiempo de fijación ha sido corto, pero de todas maneras no es aconsejable.

REACTIVOS:

Mezcla de Pappenheim-Unna (89).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafrinar, no colodionar, hidratar.
2. Teñir durante 5 minutos con la mezcla de Pappenheim-Unna.
3. Deshidratar directamente con alcohol absoluto, hasta que el núcleo quede verde (10 a 30 segundos).
4. Montar en una resina neutra.

RESULTADOS:

Cromatina	Verde
Nucleolo, ergastoplasma y los grumos de Nissl	Rojo
Algunas mucinas	Amarillo-anaranjado

+ OTROS METODOS

Ponen de manifiesto determinados elementos conjuntivos; algunos son muy empleados en anatomía patológica, por lo que ya se escapan del enfoque de este manual.

Debido a su gran importancia mencionaremos un método que permite localizar los labrocitos.

+ METODO DE ARVY Y GABE (1950)

FIJACION

Bouin o Helly (7 ó 19).

REACTIVOS:

- Solución acuosa de cresil violeta al 1%;
- Picrofucsina de Van Gieson (79)

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar (colodionar), hidratar.
2. Teñir con cresil violeta durante 5 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Pasar por picrofucsina durante 5 segundos.
5. Deshidratar con alcohol absoluto, aclarar y montar en bálamo.

RESULTADOS:

Labrocitos	Púrpura
Núcleos	Azul-negruzco
Citoplasmas	Amarillo o gris

Estos elementos también pueden ponerse de manifiesto empleando la reacción metacromática o tiñendo con el Alcian azul.

+ ADIPOCITOS +

+ METODO DE ROJO ESCARLATA (SUDAN IV) PARA GRASA.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación
3. Teñir con hematoxilina de Harris, durante 15 minutos
4. Lavar con agua destilada
5. Virar con agua de la llave
6. Lavar en agua destilada, por 5 minutos
7. Sumergir los cortes en rojo escarlata o Sudan IV durante 5 minutos
8. Lavar en agua destilada
9. Cubrir con gelatina glicerinada

NOTA: Para grasa en panalículo usar Sudan IV, y para grasa en gotitas intracelulares usar de preferencia rojo escarlata.

RESULTADOS

Grasa	Rojo brillante
Núcleos	Morado

PREPARACION DEL COLORANTE:

- Rojo escarlata o Sudan IV	
Alcohol de 70°	50 cc
Acetona	50 cc
Rojo escarlata o Sudan IV	A saturación

+ CELULAS CEBADAS +

- Métodos combinados dobles y triples.
- Método de azul de toluidina para metacromasia
- Método de azul de toluidina de Lillie para metacromasia
- Método de tionina para células cebadas de Levine
- Método de rojo neutro para células cebadas.

METODOS COMBINADOS DOBLES

- + METODO DE HEMATOXILINA-EOSINA (Hematoxilina de Harris-eosina alcohólica).

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelacion o por parafina
3. Lavar los cortes en agua destilada
4. Teñir con Hematoxilina de Harris, de 1 a 3 minutos
5. Virar en agua de la llave
6. Lavar con agua destilada para detener el viraje
7. Deshidratar con alcoholes de 50% y 70%, por 3 minutos en cada uno
8. Teñir con eosina alcohólica, de 1 a 3 minutos
9. Deshidratar con alcoholes de 96° (dos cambios) y absoluto, durante 5 minutos en cada alcohol (sólo si los cortes son por parafina pasar al absoluto)

10. Aclarar con creosota, si los cortes fueron por congelación, o en xilol si fueron por parafina, durante 5 minutos.
11. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

RESULTADOS:

Núcleos y cartílago	Azul morado
Protoplasma y sustancias intercelulares	De naranja a rojo

PREPARACION DE COLORANTES:

- Hematoxilina de Harris:

Hematoxilina (Merck)	1.0 gramos
Oxido rojo de mercurio	0,5 gramos
Sulfato de aluminio y amonio o potasio (alumbre)	20 gramos
Alcohol etílico absoluto	10 cc
Agua destilada	200 cc

Disolver la hematoxilina en el alcohol absoluto, calentando a baño María y tapando; en otro recipiente disolver el alumbre en 100 cc de agua destilada; se mezclan las dos soluciones y se añaden los 100 cc del agua restante. Se hierve la mezcla lo más rápido posible, y se agrega cuidadosamente el óxido de mercurio (puede explotar) - hasta que tome un color rojo púrpura; enseguida se enfría con hielo a baño María y se filtra 10 veces. Se le agregan de 3 a 5 gotas de ácido acético por cada 10 cc de solución.

NOTA: Debe filtrarse cada vez que se vaya a usar y debe guardarse en frasco ámbar.

- Eosina alcohólica:

Eosina azulosa	1.0 gramos
Orange G	1.0 gramos
Alcohol de 70°	100 cc

Se mezcla todo frío y se filtra. No debe prepararse demasiado, porque las soluciones de mucho tiempo se alteran. Filtrar cada vez que se use.

NOTA: El método combinado de Hematoxilina-eosina - puede hacerse también utilizando otros tipos de hematoxilina, como la de Ehrlich, de Delafield, etc., variando el tiempo de teñido o la dilución del colorante para que el teñido sea más lento y controlable, mediante pruebas. Si la coloración de la hematoxilina es excesiva puede rebajarse con alcohol o agua acidulada (unas gotas de ácido clorhídrico en 100 cc de agua destilada o alcohol de 96°) y enjuagar abundantemente en agua una vez obtenida la coloración deseada.

La eosina puede ser alcohólica o acuosa (se prepara de la misma manera, sustituyendo el alcohol por agua destilada). Cuando se utiliza la eosina acuosa se elimina el paso 7 y en el paso 9 se deshidrata desde alcoholes 50, 70°.

+ TRIPLES: +

+ METODO TRICROMICO DE GALLEGO

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación

3. Lavar en agua destilada
4. Teñir con la solución de fucsina, durante 5 minutos. -
Conviene teñir el mismo día que se hicieron los cortes.
5. Pasar los cortes al viro fijador, durante 5 minutos. -
Aquí se dejan todos los cortes y uno por uno se montan
en el portaobjetos y se van pasando por:
6. Lavar en agua destilada
7. Hacer una coloración de fondo con picrocarmín de índigo,
durante 1 minuto.
8. Deshidratar en tres cambios con alcohol de 96°, de 1 a
3 minutos en cada uno.
9. Aclarar en dos cambios de xilol, de 1 a 3 minutos cada
uno.
10. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

NOTA: Para aclarar no debe usarse carbol-xilol.

RESULTADOS:

Núcleos	Rojo violáceo
Haces colágenos	Azul verdoso
Fibras musculares	Verde amarillento
Queratina y eritrocitos	Amarillo.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES:

- Solución de fucsina

Formol al 1%	10 cc
Fucsina fenicada de Ziehl	5 gotas
Acido acético	1 gota

- Viro fijador

Formol al 1%	10 cc
Acido acético	2 a 4 gotas

- *Picrocarmin de indigo*

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	100 cc
Carmín de indigo	0.25 gramos
Agua destilada	15 cc

METACROMATICOS

+ METODO DE AZUL DE TOLUIDINA para metacromasia

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar el tejido en una parte de ácido acético y 3 partes de alcohol etílico, durante 10 minutos.
2. Lavar abundantemente en agua destilada
3. Teñir con azul de toluidina, de 1-5 minutos.
4. Lavar con agua destilada.
5. Deshidratar rápidamente en alcohol de 96°.
6. Pasar los cortes por acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, de 1 a 3 minutos en cada uno.
7. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Núcleos	Azul intenso
Mucina	Rosa intenso
Células cebadas	Azul púrpura o rojo

NOTA: Los gránulos metacromáticos de las células cebadas pueden disolverse en el agua, por lo cual se recomienda un fijador no acuoso; el agua destilada puede provocar también estallamiento de las células. Para evidenciar otros elementos metacromáticos puede usarse como fijador el formol al 10%.

PREPARACION DEL COLORANTE:

- Azul de toluidina

Azul de toluidina	1.0 gramos
Alcohol de 96°	200 cc
Agua destilada	80 cc
Suero o plasma humano	20 cc
Acido acético	1.0 cc

Se disuelve en el alcohol el azul de toluidina, se le agrega el agua, y lentamente se le agrega el ácido glacial; a 10 cc de esta solución se le agregan los 20 cc de suero y se centrifuga lentamente durante 10 minutos. El sobrenadante se utiliza para colorear. Esta solución se debe guardar en el refrigerador, para que no pierda sus propiedades tintóreas. Es recomendable teñir el mismo día que se prepara el colorante.

+ METODO DE AZUL DE TOLUIDINA DE LILLIE PARA METACROMASIA

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación
3. Lavar en agua destilada
4. Poner los cortes en la solución colorante, durante 30 minutos.
5. Lavar en agua destilada
6. Deshidratar en alcohol de 96°
7. Pasar a acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, de 3 a 5 minutos en cada uno.
8. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS

Núcleos	Azul
Mucinas	Rosa intenso
Células cebadas	Azul púrpura o rojo

PREPARACION DEL COLORANTE:

- Azul de toluidina de Lillie

Azul de toluidina o tionina 0,5 gramos

Solución amortiguadora 100 cc

Para preparar la solución amortiguadora se disuelven 9.5 cc de acetato de sodio (en concentración de 16 mg por cada 20 cc de agua destilada).

El azul de toluidina se disuelve en 100 cc de solución amortiguadora.

+ METODO DE TIONINA PARA CELULAS CEBADAS DE LEVINE

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación o parafina.
3. Teñir con teonina, de 2 a 3 minutos para una coloración poco intensa, y de 10 a 15 minutos para una coloración intensa.
4. Lavar rápidamente en agua destilada.
5. Deshidratar en alcohol de 96°
6. Teñir con aceite de clavo y orange G, de 1 a 2 minutos. Repetir esta tinción hasta que la teonina desaparezca del citoplasma y quede sólo orange G, controlando microscópicamente.

7. Aclarar en xilol por 5 minutos.
8. Cubrir con bálsamo de Canadá.

RESULTADOS

Células cebadas	Azul intenso o púrpura
Citoplasma	Naranja oro brillante
Núcleos	Azul

PREPARACION DE LOS COLORANTES:

- Tionina

Tionina	1.0 gramos
Agua destilada	100 cc

Se disuelve el colorante en el agua, se filtra y - se usa.

- Orange G

Solución saturada de orange G en aceite de clavo; - se disuelve agitando frecuentemente y se deja reposar durante 24 horas.

+ METODO DE ROJO NEUTRO PARA CELULAS CEBADAS

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Hacer cortes por congelación o parafina
3. Teñir con hematoxilina de Harris, por 3 minutos
4. Virar en agua de la llave
5. Enjuagar en agua destilada
6. Teñir con rojo neutro, por 10 minutos
7. Diferenciar en alcohol de 70°, de 2 a 10 minutos
8. Deshidratar en alcohol de 96° por 5 minutos.

9. Deshidratar en dos cambios de alcohol absoluto, de 5 a 10 minutos cada uno.
10. Aclarar en xilol.
11. Cubrir con bálsamo de Canadá.

RESULTADOS:

Células cebadas	Rojo
Núcleos	Azul
Fondo	Rojo Pálido

PREPARACION DEL COLORANTE:

- Rojo neutro	
Rojo neutro	0.5 gramos
Alcohol etílico	100 cc

NOTA: Para ver preparación de Hematoxilina de Harris ver hoja No. 179 .

CELULAS PLASMATICAS

- Métodos combinados dobles y triples (Mencionado ya anteriormente).

FIBROBLASTOS

- Métodos combinados dobles y triples. (Mencionado ya anteriormente en la hoja No. 179)

MACROFAGOS

- Métodos combinados dobles y triples (Mencionados ya anteriormente)
- Método de impregnación argéntica para macrófagos de Costero.
- Método para macrófagos, variante de Polak.

+ METODO DE IMPREGNACION ARGENTICA PARA MACROFAGOS DE RIO-
HORTEGA, VARIANTE DE COSTERO.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%, no más de 8 días.
2. Hacer cortes por congelación.
3. Recibir los cortes en agua destilada.
4. Poner los cortes en mezcla explosiva (piridina, alcohol de 96° y amoniaco a partes iguales), de 10 minutos a 3 días.
5. Lavar 2 veces en agua destilada.
6. Colocar los cortes en carbonato de plata amoniacal, de 30 segundos a 30 minutos. Sacar un corte al minuto, otro al 2, al 4, al 6, etc. hasta 30 minutos o más.
7. Pasar los cortes por formol al 1% ó 10% soplando a intervalos durante 5 minutos.
8. Hacer lavados (2) con agua destilada
9. Pasar la mitad de los cortes a cloruro de oro al 1 x 500, por 15 minutos. La otra mitad de los cortes se saltan este paso.
10. Pasar los cortes a hiposulfito de sodio al 5% durante 5 minutos.
11. Lavar en agua destilada.
12. Deshidratar rápidamente en alcohol de 96°.
13. Aclarar con creosota.
14. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Macrófagos

Café, gris o negro.

+ METODO DE IMPREGNACION ARGENTICA PARA MACROFAGOS, VARIANTE DE POLAK.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%
2. Lavar abundantemente en agua corriente.
3. Hacer cortes por congelación
4. Lavar en agua destilada
5. Poner los cortes en la mezcla de carbonato y alcohol
6. Lavar rápidamente los cortes en alcohol de 96°
7. Poner los cortes en carbonato de plata durante 15 minutos.
8. Pasar de 5 a 10 cortes en formol al 1%.
9. Lavar en agua destilada.
10. Deshidratar con alcohol de 96°
11. Aclarar en creosota
12. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina

RESULTADOS:

Macrófagos

Café pardusco o negro

PREPARACION DE SOLUCIONES:

- Mezcla de carbonato y alcohol

Carbonato de sodio al 2% una parte

Carbonato de potasio al 5% una parte

Alcohol de 96° una parte

- Carbonato de Plata

Nitrato de Plata al 10% 30 cc

Carbonato de sodio al 5% 90 cc

MEZCLAR LAS DOS SUSTANCIAS Y EL PRECIPITADO QUE SE

forma disolverlo con amoniaco gota a gota, y luego completar con agua hasta 380 cc.

SUSTANCIA FUNDAMENTAL Y MEMBRANA BASAL

La siderofilia de la sustancia fundamental permite que se estudie fácilmente tiñéndola con la hematoxilina - ferrica.

Proporciona resultados óptimos la aplicación de las reacciones, propias para la tinción de polisacáridos de los ácidos mucoítin-sulfúrico o del condroitin-sulfúrico y principalmente la reacción metacromática.

METODO DE MANN-DOMINICI.- Este método permite poner de manifiesto particularidades nucleares, a la vez que inclusiones citoplasmáticas, sobre todo si son metacromáticas.

+ TINCION DE MANN-DOMINICI

De fácil realización e interesante.

FIJACION:

Pueden emplearse todos los fijadores habituales, alcohólicos o acuosos. Evitar fijadores con tetróxido de osmio, o fijadores oxidantes a base de bicromato.

REACTIVOS:

- Eritosina-naranja G (59)
- Azul de toluidina (48)
- Solución acuosa de permanganato potásico al 0,25%; preparada en el momento de usar, a partir de una solución ma-

dre del 2,5%.

- Solución acuosa de bisulfito sódico al 2% o de metasulfito sódico.
- Solución acuosa de ácido acético al 0,5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, (colodionar), hidratar.
2. Oxidar con una solución de permanganato hasta que los cortes adquirieran una tonalidad amarilla oscura (unos - 30 segundos).
3. Lavado rápido
4. Desteñir con una solución de bisulfito (1 minuto aproximadamente)
5. Lavar cuidadosamente con agua para eliminar totalmente el bisulfito.
6. Teñir con eritrosina-naranja G, de 5 a 10 minutos.
7. Lavado rápido con agua destilada.
8. Teñir con azul de toluidina, hasta que los cortes queden azulados, durante 1/2 a 2 minutos.
9. Lavar con agua destilada.
10. Tratar con la solución acética hasta que el material - adquiriera una tonalidad purpúrea.
11. Proseguir la diferenciación con alcohol de 95°, vigilando con el microscopio si es necesario.
12. Detener la diferenciación con alcohol absoluto.
13. Proseguir la deshidratación.
14. Montar.

RESULTADOS:

Núcleos, citoplasmas basófilos y algunas secreciones

Azul violeta

Citoplasmas acidófilos, nu--

cleolos y otras secreciones

Rosados

Algunas secreciones protei-
cas, pigmentos amarillos o
pardos

Azul-verdosos

Mucinas metacromáticas

Púrpura

Algunas estructuras

Anaranjadas.

ADVERTENCIA: La etapa más importante de este método es la oxidación.

TINCIONES MONOCROMATICAS.

+ HEMATOXILINA FERRICA

Método de tinción de los más antiguos. Ofrece - -
ciertas dificultades. Sus resultados dependen de su fi
ja
ci
ón y modo de empleo.

FIJACION:

Puede emplearse la mayor parte de los fijadores.

REACTIVOS:

Hematoxilina de Regaud (69)

- Solución acuosa de alumbre férrico al:

5% para mordiente;

0,5% al 3% para diferenciación (hacer la dilu- -
ción en el momento de emplear, a partir de la so
lu
ci
ón del 5%).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, no colodionar, hidratar.
2. Someter los cortes durante 24 horas a la solución de -

alumbre ferrico, que actúa de mordiente.

3. Teñir con hematoxilina durante 24 horas.
4. Pasar rápidamente por agua destilada.
5. Diferenciar con alumbre ferrico en el microscopio. Es te proceso es tanto más lento cuanto más diluida sea - la solución diferenciadora.
6. Lavar como mínimo durante 1 hora con agua corriente, - para eliminar todo vestigio de alumbre.
7. Deshidratar
8. Montar.

ADVERTENCIA: Las tinciones de contraste no son aconsejables.

RESULTADOS: Dependen fundamentalmente de la fijación empleada. Se ponen de manifiesto en color negro.

= SUSTANCIA AMORFA =

- Método de azul alciano para mucopolisacáridos
- Método de azul alciano-Schiff para mucopolisacáridos.
- Hemalumbre-picrocarmin de índigo.

REACCION METACROMATICA.- "Ciertos tintes colorean determinados elementos histológicos con un matiz distinto al de la solución colorante". De ello resulta que una preparación tratada con un solo colorante será, sin embargo, policroma. Este fenómeno se conoce con el nombre de Metacromasia.

Son cromatropos o metacromáticos, aquellos compuestos o estructuras que se colorean de modo distinto del -

tinte de origen del colorante; los demás son ortocromáticos.

La reacción metacromática indica la presencia de mucopolisacáridos ácidos carboxilados, sulfatados o fosfatados.

+ METODO DE AZUL ALCIANO PARA MUCOPOLISACARIDOS.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en acetato básico de plomo al 4%. Para mucopolisacáridos ácidos se puede usar combinado con formol al 10%, a partes iguales; el líquido de Carnoy se usa para estudios de ácido hialurónico.

2. Lavar abundantemente y cortar por congelación.

3. Teñir en una solución acuosa reciente al 1% de azul alciano, por 10 a 40 segundos. Si se deja más tiempo otros tejidos se teñirán también.

4. Lavar rápidamente con agua corriente.

5. Teñir con hematoxilina de Ehrlich, de 5 a 10 minutos, o bien teñir con rojo neutro al 1% durante 30 segundos, si se quieren demostrar mucinas como el ácido hialurónico o condroitin sulfato.

6. Lavar rápidamente en agua corriente.

7. Escurrir la laminilla y dejarla secar al aire completamente si se usó rojo neutro, o bien deshidratar en alcohol de 96° si se usó hematoxilina.

8. Aclarar con xilol durante 5 minutos.

9. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Mucopolisacáridos ácidos	Azul-verde claro
Núcleos	Azul intenso o rojo oscuro

NOTA: Con la variación de rojo neutro el azul alciano tiñe el tejido conectivo débilmente, y a los mucopolisacáridos ácidos de un color verde-azuloso.

- Hematoxilina de Ehrlich

Hematoxilina	4.0 gramos
Alcohol de 95°	200 cc
Agua destilada	200 cc
Alumbre de amonio o potasio	6,0 gramos
Glicerina	200 cc
Acido acético glacial	20 cc

Disolver la hematoxilina en el alcohol y el alumbre en agua destilada y mezclar. Cuando se disuelvan perfectamente, agregar la glicerina y el ácido acético.

NOTA: El sulfato de aluminio y amonio son conocidos como alumbre de amonio, y el sulfato de aluminio y potasio son conocidos con el nombre de alumbre de potasio.

+ METODO DE AZUL ALCIANO-SCHIFF PARA MUCPOLISACARIDOS.

MODO DE EMPLEO:

1. Lavar los cortes en agua destilada
2. Teñir con azul alciano, durante 3 minutos
3. Lavar en agua destilada durante 2 minutos
4. Pasar los cortes a ácido preyódico al 0.5%, durante 10

minutos.

5. Lavar en agua corriente durante 5 minutos y enjuagar - con agua destilada.
6. Pasar los cortes al reactivo de Schiff, durante 10 minutos.
7. Pasar los cortes a la solución limpiadora, haciendo -- tres cambios. de dos minutos cada uno.
8. Lavar con agua corriente durante 5 minutos.
9. Teñir con hematoxilina férrica de Weigert, por 5 minutos.
10. Lavar con agua destilada, por dos minutos
11. Pasar los cortes a ácido pícrico, por 1 minuto
12. Deshidratar con alcohol de 96° y absoluto, por 5 minutos en cada uno.
13. Aclarar con xilol durante 5 minutos.
14. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Mucopolisacáridos ácidos	Azul
Mucopolisacáridos neutros	Magenta
Sustancia cartilaginosa y musina epitelial	Tonalidades de <u>pú</u> pura a azul oscuro.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES

- Solución limpiadora

A. Solución madre

Sulfito ácido de Sodio	10.4 gramos
Agua destilada	100 cc

B. Solución de trabajo

Solución madre	1 parte
Agua destilada	20 partes

- Azul alciano	
Azul alciano	1.0 gramos
Agua destilada	100 cc
Acido acético glacial	30 cc

Filtrar y agregar cristales de timol para evitar -
que se forme moho.

- Hematoxilina férrica de Weigert	
Solución A	
Hematoxilina	1.0 gramos
Alcohol de 96°	100 cc
Solución B	
Agua destilada	95 cc
Cloruro férrico acuoso	4.0 cc
Acido clorhídrico en solución acuosa al 66%	1.0 cc

Para usar el colorante, mezclar partes iguales de
las soluciones A y B. Puede usarse hasta una semana des-
pués de hecha la mezcla.

- Acido Peryódico	
Acido Peryódico	0.8 gramos
Agua destilada	30 cc
Acetato de sodio hidratado	0.27 gramos.
Alcohol absoluto	70 cc

-- Reactivo de Schiff	
Fucsina básica	0.5 a 1.0 gramos
Agua destilada	85 cc
Metabisulfito de sodio	1.9 gramos
Acido clorhídrico 1 N	1.5 cc

Hervir el agua destilada y agregar la fucsina agitando, enfriar hasta 50°C y filtrar; añadir el ácido clorhídrico, enfriar hasta 25°C, y agregar el metabisulfito de sodio. Utilizando una botella de tamaño adecuado, que no deje espacio para aire, agitar a intervalos durante 2 horas y dejar toda la noche; agregar 200 mg de carbón arquímico, agitar y filtrar. La solución debe quedar blanca y guardarse en el refrigerador.

+ HEMALUMBRE-PICROCARMIN DE INDIGO

REACTIVOS:

Hemalumbre de Masson (65)

Picrocarmin de Indigo de Calleja (78)

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar (colodionar), hidratar.
2. Teñir con hemalumbre de 2 a 5 minutos.
3. Lavar con agua corriente hasta que vire adquiriendo una tonalidad azul negruzca (de 2 a 5 minutos).
4. Teñir durante 30 segundos con picrocarmin de indigo.
5. Deshidratar directamente con alcohol absoluto.
6. Montar

ADVERTENCIA.- El hemalumbre se emplea en este caso como tinción progresiva.

El proceso es regresivo cuando los cortes permanecen en el colorante 30 minutos y sigue una diferenciación el alcohol-clorhídrico (ac. clorhídrico al 0.25% en alcohol absoluto).

RESULTADOS:

Núcleos y citoplasmas basófilos	Pardo
Citoplasmas acidófilos y nucleolos	Amarillo o verde
Fibras colágenas	Azul
Eritrocitos	Amarillo
Algunas secreciones (principalmente gluco- proteínas)	Pardo
Otras	Amarillo o verde

Cuando los fijadores contienen tetraóxido de osmio, es preferible teñir en caliente (60°C) con fucsina de Ziehl.

VARIANTE.- La fucsina de Ziehl puede ser sustituida por el magenta (72). El modo de empleo y los resultados son idénticos.

METODOS DE DEMOSTRACION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS

La demostración de los ácidos nucleicos no produce ningún problema. Las reacciones histoquímicas de detección de ADN se cuentan entre las más satisfactorias. Al contrario, la detección de ARN exige coloraciones de señalización, que controladas por extracciones selectivas, adquieren un gran valor.

Los mejores fijadores son los que contienen ácido acético. Tales como la mezcla cromo-osmica de Flemming (13) para el ADN la mezcla bicromada de Zenker (30) o el

Carnoy (8). El susa (28).

Evitar fijadores que despolimerizan parcialmente - los ácidos nucleicos tales como el Bouin.

Los mejores métodos de detección son las reacciones nucleares; entre estos métodos señalamos al de Feulgen y Rossen Beck.

Con la reacción nuclear de Feulgen y Rossen Beck : el ADN se colorea de rojo.

+ TRIPLE COLORACION DE A. PRENANT

Este método es para poner de manifiesto los núcleos, citoplasmas, tejido conjuntivo y sus derivados. El modo de empleo original es el derivado del método de tinción por hematoxilina férrica; un previo tratamiento con eosina elimina la siderofilia del tejido conjuntivo y permite que se tiña posteriormente con el verde luz. Su inconveniente es de ser largo.

FIJACION:

Pueden emplearse todos los fijadores más usuales, evitando que contengan tetraóxido de osmio.

a) METODO ORIGINAL. - REACTIVOS:

- Solución acuosa de eosina al 1%;
- Solución acuosa de alumbre férrico al 5%;
- Hematoxilina de Regaud (69);
- Solución acuosa de verde luz al 0,2 - 0,5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, no colodionar, hidratar.
2. Teñir durante 10 minutos con eosina.
3. Empleo del alumbre férrico, como mordiente, durante 24 horas.
4. Teñir con la hematoxilina de Regaud durante 24 horas.
5. Diferenciación con alumbre férrico.
6. Teñir sobre el portaobjetos, con verde luz hasta la obtención de una coloración grisácea general (20 a 30 - segundos)
7. Deshidratar directamente con alcohol absoluto
8. Montar.

b) VARIANTE DE GABE.- Gabe (1954) método cuyos resultados son comparables a los obtenidos con el método de Prenant y que, en principio se parece al trichómico de Gomori.

REACTIVOS:

- Hematoxilina de Groat (68)
- Eosina-verde luz (57)
- Solución acuosa de ácido acético al 0,5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con hematoxilina de 2 a 5 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Teñir con la mezcla eosina-verde luz, de 5 a 10 minutos.
5. Lavar rápidamente o parar la tinción en agua acética.
6. Deshidratar.
7. Montar.

RESULTADOS:

Núcleos y citoplasmas

basófilos	Pardo-negruzco
Colágena	Verde
Citoplasmas, nucleolos y secreciones eritrófilas	Rosa
Citoplasmas y secreciones cianófilas	Verde

+ TRICROMICO DE MASSON VARIANTE DE GOLDNER

Resultados de este método comparables con los que se obtienen en el método de Prenant.

FIJACION:

Pueden emplearse todos los fijadores habituales y evitar los que contengan tetróxido de osmio.

REACTIVOS:

- Hematoxilina de Groat (68)
- Fucsina-Ponceau (60)
- Naranja G-Molibdico (74)
- Verde Luz (solución acética) (86).
- Solución acuosa de ácido acético al 1%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con hematoxilina de Groat, de 2 a 5 minutos.
3. Lavado de 5 minutos con agua corriente.
4. Teñir con la mezcla fucsina-ponceau, durante 5 minutos.

5. Lavado rápido con agua acética.
6. Teñir con naranja G-molibdico durante 5 minutos.
7. Lavado rápido con agua acética.
8. Teñir con verde-luz unos 5 minutos.
9. Lavar con agua acética.
10. Deshidratar. Montar.

ADVERTENCIA IMPORTANTE.- En la mayor parte de las tinciones, la hematoxilina de Groat y el hemalumbre de - Masson pueden emplearse indistintamente; en este caso sólo puede usarse la hemalumbre.

RESULTADOS:

Núcleos	Negro
Ergastoplasmas	Gris
Citoplasmas acidófilos y nucleolos	Rosa
Secreciones	Rojo o verde
Fibras musculares	Rojas
Fibras colágenas	Verdes

+ TRICROMICO EN UN TIEMPO (Gabe y Martoja-Pierson, 1957)

Este método presenta como ventaja su gran rapidez; requiere excelentes fijaciones. El mordiente va incluido en la mezcla colorante.

FIJACION:

Pueden emplearse todos los fijadores, evitando las mezclas a base de bicromato y tetraóxido de osmio.

REACTIVOS:

Tricrómico en un tiempo (84)

MODO DE EMPLEO:

1. Despara~~ñ~~inar, (colodionar), hidratar.
2. Tratar con la mezcla tintórea durante 10 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Deshidratar.
5. Montar.

ADVERTENCIA:

1a. Los cortes pueden esperar para la tinción en agua acética al 1%: esta fase hay que intercalarla entre las etapas 3a. y 4a.

2a. Cuando los cortes proceden de un material que ha sido fijado a base de tetróxido de osmio, es interesante hacer la tinción durante 45 minutos en la estufa a 60°C.

3a. Si los cortes teñidos muestran un exceso de rojo, por lo que es interesante tratarlos durante algunos segundos con una solución acuosa saturada de amarillo de Mars o con amarillo naftol (70).

4a. Es posible hacer variar el tiempo de acción de la mezcla colorante (etapa 2), con lo que se obtendrá menor rojo y más verde al prolongar el tratamiento.

RESULTADOS:

Núcleos y la mayor parte
de los citoplasmas

Rojo

Fibras conjuntivas
Eritrocitos

Verde
Amarillo

+ TINCIONES CON AZOCARMIN-ANILINA O AZAN

Métodos de gran interés, por la diversidad de estructuras histológicas que ponen de manifiesto. Para la tinción del conjuntivo es excelente, y las imágenes nucleares son muy precisas.

Su inconveniente es que son difíciles para realizarse, modo de empleo muy preciso y debe adaptarse a cada tipo de material.

FIJACION:

Pueden emplearse todos los fijadores habituales. - Hay que evitar una prolongada permanencia del material en fijadores muy oxidantes a base de bicromato, así como los fijadores con tetróxido de osmio.

En general estos métodos requieren una excelente fijación.

10. AZAN DE HEIDENHAIM.- REACTIVOS:

- Azocarmín G (42)
- Azul de Heidenhain diluido (45)
- Solución de anilina al 1% en alcohol de 70°
- Solución de ácido acético al 1% en alcohol de 95°
- Solución acuosa de ácido fosfotungstico, de buena calidad, al 5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafrinar, colodionar, hidratar.
2. Cuando los cortes provienen de un material que ha sido fijado con una mezcla que contenga ácido pícrico, hay que eliminar todo vestigio de ácido mediante una permanencia de 30 minutos en alcohol anilado; lavar con -- agua destilada.
3. Teñir con una solución de azocarmín previamente calentada a 60°C , durante 1 hora y a 60°C .
4. Lavar con agua destilada, sin dejar enfriar.
5. Diferenciar bajo el microscopio con alcohol-anilina - hasta conseguir una coloración nuclear casi pura. La velocidad de diferenciación es proporcional a la cantidad de anilina y a la concentración del alcohol. Según el resultado deseado, puede modificarse la composición de la mezcla alcohol-anilina. Desde el alcohol de 70° con 1% de anilina, hasta el alcohol de 95° con un 0,1% de anilina.
6. Detener la diferenciación con un lavado de 30 segundos en alcohol acético. Puede prolongarse considerablemente la permanencia de los cortes en alcohol acético.
7. Lavar con agua destilada.
8. Tratar los cortes con ácido fosfotúngstico de 1/4 de hora a 1 hora. El ácido actúa como mordiente y prepara la tinción con el azul de Heidenhain, a la vez que continúa diferenciando el azocarmín; por lo que la diferenciación en alcohol-anilina, será tanto más corta - cuanto más largo tenga que ser el tiempo de permanencia en el mordiente.
9. Lavar con agua destilada.

10. Teñir con el azul de Heidenhain de 1/2 a 2 horas.
11. Según el resultado deseado, eliminar el exceso de - - azul, tratando los cortes con alcohol de 95° o deshidratar aplicando directamente alcohol absoluto.

+ AZAN DE ROMEIS.- REACTIVOS:

- Azocarmín G (42);
- Azul de anilina (46);
- Naranja-G-Molibdico (73);
- Solución de anilina al 1% en alcohol de 70°
- Solución al 1% de ácido acético en alcohol de 95°.

MODO DE EMPLEO:

- 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7. Como el método de Azan de Heidenhain.
8. Teñir con naranja G-Molibdico, de 5 a 10 minutos.
9. Secar con papel de filtro.
10. Teñir con azul de anilina, de 10 a 20 minutos.
11. Según el resultado deseado hay que lavar o no con agua destilada; este lavado tiene por finalidad eliminar - el azul.
12. Lavado rápido con alcohol de 95°.
13. Deshidratar.
14. Montar.

RESULTADOS:

Los colores que se obtienen son los mismos para - los dos métodos.

Núcleos y citoplasmas	Rojo
Colágena	Azul
Mucopolisacáridos ácidos	Azules

OTRAS VARIANTES.- El Azocarmín G puede sustituirse por el azocarmín B (Schleicher) (42).

TETRACROMICO DE HERLANT (1960)

Ventajas e inconvenientes parecidos a los que presenta el azan.

FIJACION:

Los mejores resultados se obtienen después de la fijación con mezclas que contienen subumado, pero no bicromato potásico (Halmi); también es recomendable el Carnoy.

REACTIVOS:

- Eritrocina (solución acética) (58);
- Azul de Heidenhain diluido (45);
- Azul ácido de alizarina (44);
- Solución acuosa al 5% de ácido fosfomolibdico, - de primera calidad.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir durante 10 minutos con eritrocina.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Teñir durante 5 minutos con azul de Heidenhain.
5. Lavado con agua destilada.
6. Teñir con azul ácido de alizarina durante 10 minutos.
7. Lavado con agua destilada.
8. Tratar durante 10 minutos con ácido fosfomolibdico.
9. Lavado rápido con agua destilada.
10. Según el resultado que se desee, tratar o no con alco-

hol de 70°; este lavado sirve para diferenciar la - -
eritrocina.

11. Deshidratar directamente con alcohol absoluto si se -
desea extraer el exceso de eritrocina.

12. Montar.

RESULTADOS:

Cromatina	Azul
Nucleolo	Rojo
Citoplasmas y secreciones aparecen según los casos	Amarillos, rojos o violetas
Mucinas	Azules
Colágena y cartílago	Azul oscuro.

+ COLORACION DE VAN GIESON

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir durante dos minutos, con hematoxilina de Groat -
(68)
3. Lavar con agua corriente de 2 a 5 minutos.
4. Teñir con picrofucsina durante 5 minutos.
5. Deshidratar
6. Montar en una resina neutra.

RESULTADOS:

Núcleos y ergatoplasmas	Negro
Citoplasmas acidófilos	Amarillo
Fibras elásticas	Rojo

= SANGRE Y ORGANOS HEMATOPOYETICOS =

El método de estudio de la sangre y de los órganos hematopoyéticos está un poco al margen de las técnicas de la histología general; aunque pueden aplicarse con buen resultado las tinciones clásicas. El proceso de hacer la preparación es bastante particular.

ELABORACION DE LAS PREPARACIONES

En general, los estudios de sangre pueden estudiarse ya sea en extensiones. Los órganos hematopoyéticos -- pueden estudiarse ya sea en extensiones de punciones o por aposiciones, que se tratarán como si fuesen extensiones, ya sea haciendo cortes de dichos órganos.

FIJACION DE LAS EXTENSIONES Y DE LAS APOSICIONES

El método de fijación depende de los estudios a realizar:

- Las extensiones secas pueden fijarse sumergiéndolas durante algunos minutos en una mezcla alcohol-ácido acético;

- Las extensiones todavía húmedas pueden igualmente sumergirse en un fijador líquido o exponerlas a los vapores de tetraóxido de osmio, formol o alcohol metílico. Calentados;

- También es posible combinar los dos procedimientos citados; o sea fijar primero la extensión por vapores y después sumergirla en el fijador líquido.

Los principios generales de la fijación son aplica

bles en el caso de las extensiones, teniendo en cuenta -- que el tiempo de fijación es el más corto. Para la observación del condrioma, la poscromización no debe sobrepasar mucho las 2 horas; la fijación con los vapores de osmio hace que esta poscromización no sea indispensable.

TRATAMIENTO DE PIEZAS FIJADAS

Los órganos hematopoyéticos se incluyen según el procedimiento habitual. Cuando se trata de fragmentos de médula ósea, casi siempre es indispensable una decalcificación.

Las extensiones y las aposiciones se tratan como si fuesen cortes histológicos, a excepción del desparafinado.

MÉTODOS DE TINCION

Pueden aplicarse todos los métodos; la elección del mismo dependerá de la naturaleza del órgano y el resultado buscado. Para los estudios estrictamente morfológicos, los métodos indicados a propósito de las células conjuntivas, los ya citados describiremos otros métodos:

- Azul policromo de Unna
- Triácido de Ehrlich
- May Grünwald-Giemsa
- Método Panorámico de Pappenheim
- Tinción pancreómica de Pappenheim
- Tinción con el azur-eosina de Lillie
- Método de Maximow
- Método del azul policromo-Naranja G, variante de Unna.
- Métodos combinados dobles y triples (anteriormente mencionado)

- Método de Jacobson/ para sangre y médula ósea
- Método de Pappenheim (para frotis)
- Método de Wright (para sangre)
- Método de Sudan negro B para grasa
- Método de benzidina para hemoglobina
- Método de alizarina de Okajama con hemoglobina
- Métodos para macrófagos (anteriormente mencionados)
- Métodos para fibras reticulares (anteriormente mencionados)

+ AZUL POLICROMO DE UNNA.

REACTIVOS:

- Azul de Unna (47);
- Diferenciador:
 - Eter glicérico 1 volumen
 - Agua destilada 50 volúmenes

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, (colodionar), hidratar en caso que se trate de cortes).
2. Teñir con azul de Unna durante 10 minutos
3. Lavado rápido con agua destilada
4. Diferenciar en el microscopio hasta conseguir una tinción nuclear pura y que el citoplasma de los plasmocitos quede azul.
5. Lavado rápido con agua
6. Deshidratar con acetona y pasar por toluol.
7. Montar en bálsamo.

+ TRIACIDO DE EHRLICH.- Evitar fijar el material

en fijadores que contengan tetróxido de osmio, bicromato o ácido pícrico.

REACTIVOS:

- Triácido de Ehrlich (83);
- Solución acuosa de ácido acético de 0,2 a 0,5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar (colodionar), hidratar (si se trata de cortes).
2. Teñir con triácido durante 10 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Pasar rápidamente por agua acética.
5. Lavar con alcohol de 70° hasta que no se desprendan -- más corrientes rojizas y el núcleo adquiera una tonalidad verdosa.
6. Deshidratar directamente con alcohol absoluto.
7. Montar.

+ MAY GRUNWALD-GIEMSA (sólo aplicable para extensiones y aposiciones).

REACTIVOS:

- Colorante de May Grünwald (solución comercial).... 3 gotas
- Tampon fosfato 2 ml.
(solución a preparar antes de usar)

MODO DE EMPLEO:

1. Recubrir las extensiones con la solución de May-Grünwald pura y dejarla actuar durante 3 minutos.

2. Añadir un volumen equivalente de tampón fosfato y dejar actuar durante 3 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada
4. Teñir de 15 a 20 minutos, con la solución Giemsa tamponada.
5. Lavado rápido con agua destilada.
6. Secar.

+ METODO PANOPTICO DE PAPPENHEIM (Aplicable a cortes en -
parafina).

La tinción panóptica, frecuentemente aplicable para la tinción de extensiones puede también emplearse para los cortes, por lo que es el método más adecuado para el estudio de los órganos hematopoyéticos.

REACTIVOS:

- | | |
|--|----------------|
| - Colorante de May-Grünwald | : 1 volumen |
| Agua destilada | : 8 volúmenes |
| - Colorante de Giemsa | : 1 volumen |
| Agua destilada | : 75 volúmenes |
| - Solución acuosa de ácido acético al 0,15%. | |

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, (colodiar), hidratar.
2. Teñir con la mezcla de May-Grünwald diluido durante 20 minutos a 35°C
3. Lavado rápido con agua destilada
4. Teñir con la mezcla de Giemsa diluida durante 40 minutos a 35°C.
5. Diferenciar con agua acética.
6. Lavar cuidadosamente con agua destilada.

7. Deshidratar con acetona, aclarar con toluol, no usado con anterioridad; es decir, desprovisto de cualquier resto de alcohol.
8. Montar con una resina neutra.

La diferenciación es, sin duda la etapa fundamental de este método.

+ TINCION PANCROMICA DE PAPPENHEIM

Se trata de uno de los métodos más completos para teñir los elementos conjuntivos y sanguíneos.

REACTIVOS:

- Solución diluída de May-Grünwald (como para el método - panóptico);
- Pancrómico de Pappenheim : 1,5 ml.
- Agua destilada : 100 ml.
- Solución acuosa de ácido pícrico al 0,1%

MODO DE EMPLEO:

1. Desparañar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con la mezcla de Giemsa diluída durante 10 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Teñir con la mezcla de Pappenheim diluída durante 20 minutos.
5. Lavado rápido con agua destilada.
6. Diferenciar con ácido pícrico hasta que los cortes adquieran una tonalidad rojiza.
7. Lavar cuidadosamente con agua destilada.
8. Deshidratar y montar como en el caso anterior.

+ TINCION DE AZUR-EOSINA DE LILLIE.

REACTIVO:

- Solución de azur al 0,1% 4 mililitros
- Solución de eosina amarillenta o azulada al 0,1% 4 mililitros
- Acido cítrico M/10 1,2 ml.
- Fosfato disódico M/10 0,8 ml.
- Agua destilada 25 ml.
(esta mezcla no se conserva).
- Acetona (rigurosamente pura) 5 ml.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparaafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con la mezcla azur-eosina durante 1 hora.
3. Deshidratar con acetona.
4. Después de haber pasado por toluol o xilol, montar en una resina neutra.

ADVERTENCIA:

Estas tinciones no son del todo permanentes, aunque se conservan cierto tiempo, por lo que es preciso - - efectuar el montaje en una resina neutra y no en bálsamo. Examinar los cortes lo más pronto posible.

+ METODO DE MAXIMOW

De realización bastante complicada, debe emplearse después de haber fijado el material con Helly

REACTIVOS:

- Tampon fosfórico de pH 6,98 (94 6 95);

- Solución de eosina al 0,1% en tampon fosfórico de pH 6,98;
- Solución de azur II al 0,1% en tampon fosfórico de pH 6,98.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar.
2. Lavar varias veces con agua destilada hervida y después con el tampón fosfato.
3. Teñir de 6 a 24 horas por la siguiente mezcla antes de usar:
 - Tampón fosfórico 100 mililitros
 - Solución de eosina 10 mililitros
4. Diferenciar con alcohol de 95°, hasta que los hematies adquirieran una coloración rojiza.
5. Deshidratar.
6. Montar con una resina neutra.

+ METODO DEL AZUR POLICROMO-NARANJA G, VARIANTE DE UNNA

Es realizacion más fácil que el anterior.

REACTIVOS:

- Azul policromo (47);
- Tanino-naranja G (solución comercial).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar.
2. Teñir con azul policromo de 5 a 10 minutos.
3. Lavado rápido con agua destilada.
4. Diferenciar con el tanino-naranja G durante 1 a 5 minutos.
5. Deshidratar directamente con alcohol absoluto.

+ METODOS COMBINADOS DOBLES Y TRIPLES
(Anteriormente mencionados)

+ METODO DE JACOBSON PARA SANGRE Y MEDULA OSEA ROJA

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en alcohol metílico, durante 5 minutos.
2. Teñir con May-Grünwald, por 15 minutos.
3. Teñir con Giemsa, durante 10 minutos.
4. Deshidratar en acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, -
haciendo dos cambios cada uno, durante 15 minutos en -
cada cambio.
5. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Núcleos	Azul en diversos tonos
Granulaciones de los neutrófilos	Violeta o rosa
Granulaciones de los basófilos	Azul intenso o morado
Granulaciones de los eosinófilos	Naranja o rojo
Citoplasma de los agranulocitos	Azul claro
Eritrocitos	Rojo pálido

PREPARACION DE LOS COLORANTES:

- May Grünwald

May Grünwald	0.3 gramos
Alcohol metílico	100 cc

Disolver el colorante en el alcohol, filtrar y -
 usar.

- Giemsa

A. Solución Madre

Giemsa	0.8 gramos
Glicerina	50 cc
Alcohol metílico	50 cc

Se disuelve el Giemsa en la glicerina, se agrega -
 alcohol y se filtra.

B. Solución de tinción

Solución madre de Giemsa	1.0 cc
Agua destilada	9.0 cc.

+ METODO DE PAPPENHEIM (para frotis)

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en alcohol metílico durante 2 ó 3 minutos.
2. Teñir con May-Grünwald, poniendo 10 gotas en cada fro-
 tis y tapandolos, para que no se sequen, por 3 minutos.
3. Agregar 10 gotas de agua bidestilada en cada frotis, -
 durante 1 minuto.
4. Dejar escurrir y agregar la solución de Giemsa hasta -
 cubrir cada frotis, durante 10 a 15 minutos.
5. Lavar rápidamente con agua de la llave.
6. Secar al aire.
7. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina, o dejarlo sin -
 cubrir.

Tanto los resultados como la preparación de los co-
 lorantes son como en el método de Jacobson.

+ METODO DE WRIGHT (para sangre)

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar los frotis en alcohol metílico, durante 5 minutos
2. Cubrir los frotis con la solución de Wright, de 1 a 3 minutos.
3. Agregar agua destilada con una solución amortiguadora de fosfato a pH 6.5, durante 10 minutos. Esto se hace para diluir el colorante y es recomendable añadir 2 cc por cada frotis.
4. Lavar con agua destilada o con solución buffer, hasta que los frotis tomen un color rosa. En caso de que los resultados no sean buenos, volver a empezar la tinción con el colorante, o con el colorante diluido, según la intensidad de color que se quiera dar.
5. Secar al aire o deshidratar si se prefiere.
6. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina o dejarlo sin cubrir.

RESULTADOS:

Eritrocitos

Neutrófilos:

Rojo amarillento

Núcleo

Rojo oscuro

Gránulos

Lila

Citoplasma

Rosa pálido

Eosinófilos:

Núcleo

Rojo oscuro

Gránulos

Rojo

Citoplasma

Rosa pálido

Basófilos:

Núcleos

Púrpura o azul oscuro

Gránulos

Púrpura oscuro o negros

Linfocitos:

Núcleo	Púrpura oscuro
Citoplasma	Azul cielo.

Monocitos:

Núcleos	Azul
Citoplasma	Azul cielo
Plaquetas	Violeta o púrpura

PREPARACION DEL COLORANTE:**- Colorante de Wright**

Wright en polvo	0.3 gramos
Fosfato de potasio monobásico	1.2 gramos
Fosfato de sodio	1.8 gramos
Metanol	100 cc

+ METODO DE SUDAN NEGRO B PARA GRASAS**MODO DE EMPLEO:**

1. Fijar en solución que se describe abajo.
2. Lavar los cortes en alcohol de 70°.
3. Teñir con Sudan negro B, durante 30 minutos.
4. Quitar el exceso de colorante con alcohol de 70°.
5. Lavar rápidamente con agua de la llave.
6. Contrateñir con Carmalum de Mayer, por 16 horas, o en rojo neutro en solución acuosa al 1%, durante 1 minuto.
7. Lavar en agua destilada.
8. Cubrir con gelatina glicerizada.

RESULTADOS:

Lípidos	Negro o azul
Nucleolos	Rojo

PREPARACION DE LOS COLORANTES:

- Solución fijadora

Nitrato de cobalto	1.0 gramos
Agua destilada	80 cc
Cloruro de calcio al 10% ó acetato de calcio al 2%	10 cc
Formol químicamente puro	10 cc

- Sudán negro B

Sudán	0.7 gramos
Alcohol propílico al 100%	100 cc

No debe excederse de 110°C porque da un precipitado gelatinoso. Filtrar en papel filtro del No. 2, enfriar y volver a filtrar en algodón de vidrio al vacío o ayudado - por succión.

- Carmalum de Mayer (solución madre)

Alumbre de potasio	10 gramos
Agua destilada	200 cc
Acido carmínico	1.0 gramos
Formol	10 cc

Se disuelve el alumbre en el agua destilada en caliente y se agrega el ácido carmínico; se enfría la solución y se añade 1 cc de formol. La solución de tinción es una dilución de 5 a 6 veces la solución madre.

NOTA: Este método se recomienda para teñir grasa en sangre; la serie granulocítica es la que presenta grasa.

+ METODO DE BENZIDINA PARA HEMOGLOBINA

1. Fijar en formol al 10% (para frotis no es necesario, -

6 2 horas.

6. Lavar en agua destilada.
7. Contrateñir con hematoxilina de Harris, durante 1 minuto.
8. Lavar con agua de la llave de 2 a 5 minutos.
9. Deshidratar en alcoholes en concentración ascendente, - hasta absoluto.
10. Aclarar en xilol.
11. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

RESULTADOS:

Hemoglobina	Naranja o rojo naranja
Núcleos	Azul
Fondo	Café rojizo

PREPARACION DE LOS COLORANTES:

- Solución acuosa de ácido fosfomolibdico
 - Acido fosfomolibdico en solución acuosa al 10%
- Mezcla colorante de alizarina
 - Solución acuosa de alizarina roja S, a. 7.7% 30 cc
 - Acido fosfomolibdico al 10% 10 cc

+ METODOS PARA MACROFAGOS
(mencionados anteriormente.)

+ METODOS PARA FIBRAS RETICULARES
(anteriormente mencionados).

CASO ESPECIAL: LOS CAPILARES

El estudio de los capilares puede ser difícil. Un estudio minucioso del aparato circulatorio requiere téchi

cas especiales destinadas a aumentar el contraste entre los vasos sanguíneos y los demás tejidos; siendo el método más eficaz al llenarlos de un colorante asociado a un gel; esta inyección se efectúa antes de la fijación.

SOLUCION COLORANTE (fórmula de Scharrer).- Preparar una solución de gelatina al 10% y filtrar.

- Añadir algunos mililitros de una solución de azul de Berlín o de carmín-alumbre (50); también puede añadirse unas gotas de tinta china natural en suspensión, que proporciona excelentes imágenes; hay que evitar el empleo de tintas sintéticas.

- Para su conservación añadir un cristal de timol.

MODO DE EMPLEO:

1. Inyectar en caliente al animal recién sacrificado entero o determinados órganos por separado; según Stöhr - el hígado puede inyectarse a través de una vena porta o de la vena cava, según el resultado deseado; el estómago, intestino y bazo se inyectan a través de la aorta, el pulmón, a través de la arteria pulmonar.
2. Colocar el animal o el órgano en un frigorífico durante 15 minutos, para conseguir la solidificación de la gelatina teñida.
3. Fijar en Bouin (7) o con formol salado (15).
4. Incluir en parafina o cortar por congelación.
5. Teñir con un método compatible con la fijación efectuada, evitando el empleo de colorantes de tonalidades próximas a la gelatina inyectada; de lo contrario, --

disminuiría el contraste deseado.

TEJIDO CARTILAGINOSO

- Métodos combinados, dobles y triples
- Métodos para mucopolisacáridos
- Métodos para sustancias intercelulares fibrosas

(Todos anteriormente mencionados).

TEJIDO DENSO

- Métodos combinados, dobles y triples.

(Anteriormente mencionados).

TEJIDOS OSEOS

TRATAMIENTOS DE HUESOS Y OTROS TEJIDOS.

El hueso contiene grandes cantidades de calcio y es duro por naturaleza; requiere de especial tratamiento. Esto hace que las secciones no puedan ser preparadas por medio de técnicas ordinarias. Es lo mismo con otras estructuras calcificadas, incluyendo los dientes y una variedad de tejidos los cuales poseen depósitos de sales de calcio provocadas por enfermedades; esto sucede por ejemplo en arterias degeneradas y algunos tejidos infectados por tuberculosis. Se deben remover las sales cálcicas.

La manera más usual de preparación para las secciones de tejido calcificado es la DESCALCIFICACION, que remueve las sales de calcio y trata la muestra como si fuera una pieza de tejido suave. La deshidratación se lleva a cabo después de que el tejido ha sido fijado y (antes es) deshidratado. La eliminación del calcio es principalmente logrado con ácidos en el cual el carbonato de calcio y sales de fosfato del hueso son solubles.

El tiempo tomado para la descalcificación completa depende de (1) el grosor de la muestra, (2) la densidad del hueso, (3) la fuerza de la solución usada, y (4) la temperatura a la cual es descalcificada. Tan alta como sea la temperatura acelera la descalcificación sobre todo a los 50°C causa desintegración. Algunos investigadores recomiendan en uso de agitadores mecánicos para acelerar la descalcificación. La investigación de Lillie's no confirmó esta hipótesis. No hay un método ideal de descalcificación de secciones de hueso, desde siempre los ácidos

producen distorsión o alteración del tejido, y el diagnóstico es si se necesita retardado completamente para la -- descalcificación.

La muestra de hueso debe cortarse regularmente en piezas pequeñas primero (para hueso muy duro de 2 a 5 mm. de grosor, para tejido suave de 4 a 6 mm de grosor); permite la penetración de la solución descalcificante. Una sierra con hoja delgada, produce menos desgarré en el contorno del tejido. Tan pronto como las secciones pequeñas son obtenidas, el hueso debe estar fijado para preservarlo y endurecerlo, el tejido suave y estructuras celulares para pegarlo.

El buffer de formalina neutral al 10% es recomendado como uso para la fijación para hueso porque penetra -- bien y aclara los tejidos suaves resistentes a los ácidos presentes en los fluidos descalcificantes. Después de la fijación, el tejido debe lavarse continuamente hasta remover el exceso de fijación. Entonces está listo para la -- descalcificación.

Las alte:nativas únicas para las técnicas de hueso son aprovechables, para aplicarlas sólo a casos especia-les.

En enfermedades tales como el raquitismo, por ejemplo, la cantidad de calcio en los huesos es reducida; estos huesos deben ser lo suficientemente suaves para ser -- cortadas las secciones por medio de bloques de parafina -- sin una descalcificación preliminar. Las secciones po -- drían ser cortadas mejor por medio de congelación o por -- inclusión en celoidina, pero el hueso mal calcificado de densidad normal puede ser seccionado sólo cuando es in --

cluida especialmente en densidad media de tal forma que sea usado por el microscopio electrónico. Pequeñas cantidades de sales de calcio pueden ser removidas químicamente de la superficie de los bloques de parafina, aunque -- este sea un sustituto pobre para la descalcificación de la pieza completa.

Muchos métodos de descalcificación han sido usados, incluyendo varios ácidos, agentes penetrantes tales como etileno-diamina, ácido tetracético (EDTA), electrolisis, y cambio de ion de resinas. De éstos, sólo EDTA y algunos de los ácidos son apropiados para el uso de rutina, la elección exacta depende del tipo de muestra que debe ser descalcificada. Este no es un método singular que vaya a servir para todos los propósitos.

Los métodos están apropiados para el estudio histológico de las estructuras de hueso donde no sea muy necesario mostrar la citología fina en detalle de la médula ósea. Los métodos que son apropiados para piezas delgadas de hueso deben ser usadas para muestras grandes. Todas las descalcificaciones fluídas causan pérdidas de los detalles histológicos y calidad de coloración y la pérdida es grande cuando la descalcificación es rápida. La -- deterioración es probable que sea intolerable si el hueso no ha sido adecuadamente fijado.

La deteriorización de algunos detalles histológicos es inevitable; la elección de un descalcificante apropiado para una muestra en particular debe ser un compromiso. La velocidad permitida es esencial, la calidad histológica debe sufrir: si el detalle histológico es esencial la descalcificación debe ser lenta y suave. - - -

En ningún momento el tejido debe ser removido desde la --
 descalcificación fluida tan pronto como la descalcifica--
 ción se complete; abandonar el tejido en el fluido causa__
 prejuicios a los componentes suaves y especialmente a la
 médula ósea. Este prejuicio puede ser fácilmente recono-
 cido en secciones, porque la hematoxilina será pálida, --
 turbia y desagradablemente roja, y no intenta el incremen-
 to de la intensidad de la hematoxilina por alargamiento -
 del tiempo de coloración para ser un buen éxito.

= TECNICAS PARA MEDULA OSEA =

Cuando el interés principal es en las células de -
 la médula ósea más bien que en el hueso calcificado, es -
 posible que obtengamos pura médula de necropsias por com-
 presión en una corta duración de tiempo, en lugar de ir -
 forzando hacia fuera la médula sobre una pieza de papel__
 la cual debe ser suavemente baja dentro de la fijación.

Médula, pala de mano desde la caña (fecha) del fémur (?) es frecuentemente libre de hueso si está procesada sin descalcificación. Esto es mejor que sacar la mues__
 tra hacia afuera si las relaciones de las células con - -
 otras es importante, por ejemplo en el caso de los tumo--
 res de médula.

La médula ósea aspira por un pinchamiento duro a -
 manejarse más fácilmente si es fijada y procesada en agar.

MÉTODO DE LA TAZA DE AGAR

MATERIAL REQUERIDO

Verter una capa (tina) de agar sencillo de 1 centí

metro de espesor en una caja de petri; dejar en fresco; - cortar en cubos de un centímetro de margen. Cortar en el centro cerca de 0.7 centímetros de profundidad y cerca -- de 0.5 centímetros de diámetro con un corcho barrenado. - El centro debe retirarse en la perforadora, sino debe ser extraído con una aguja. Las tazas deben estar indefinidamente en abundante formalina-salina.

METODO

1. Vaciar la muestra de médula aspirada desde la jeringa dentro de una taza y dejar cerca de 30 minutos a coagularse.

2. Transferir al fluido de Helly; fijar de 24 a 36 horas; lavar en agua corriente de 12-18 horas.

3. Después lavar, ajustar los sobrantes de agar - desde los dos lados opuestos, deshidratar; aclarar; impregnar con cera.

4. Meter en uno de los lados ajustados; así las -- secciones deben ser cortadas a lo largo del cilindro de la médula y no a través de ella.

Si es necesario analizar médula ósea de otros huesos como de la cresta del iliaco, vértebra o esternón, será necesario descalcificarlo. En estos casos, cuando sea posible, la corteza dura del hueso deberá removerse y quitarse antes de la descalcificación, desde que no se suma a la histología de la médula y se necesitaría más larga la descalcificación que las piezas faltantes de -- hueso esponjoso.

TECNICAS PARA MUESTRAS DE HUESOS GRANDES

Algunas veces es necesario descalcificar un hueso completo o parte del esqueleto, como una pieza de columna vertebral.

Este es particularmente usado cuando estructuras suaves están cubiertas por hueso, por ejemplo las arterias vertebrales, las cuales pueden ser mejor demostradas por disección de la vértebra cervical después de la descalcificación.

Otra técnica apropiada para muestras consiste en parte de hueso y parte de tejido suave es a congelación; la fijación buena de la muestra a -15°C ó -20°C y entonces cortar con sierra. Después de la fijación los cortes pueden ser descalcificados con mejores resultados histológicos, que los obtenidos de un hueso que fue descalcificado entero. Cortar en sierra una muestra congelada debe ser mejor camino de demostración de un tumor de hueso en un miembro amputado, especialmente son preparados para una muestra de exposición.

TECNICAS PARA TEJIDOS OSEOS

Las preparaciones de secciones para la demostración de tejido óseo presenta problemas especiales.

El tejido óseo no contiene sales de calcio considerando que el hueso sí. Con esta diferencia importante, como sea los dos tejidos son extremadamente similares y no se pueden distinguir en preparaciones histológicas; cada tejido tiene sus propiedades de coloración para colá-

gena y cada uno es demostrable por medio de luz polarizada. Es obvio para esto, que después que las sales de cálcio han sido removidas de una muestra, no es fácil ver -- cuáles son las partes de hueso y cuáles son las partes de tejido óseo. Después de la rutina de descalcificación, - no hay métodos de coloración que los distingan, aunque - hay efectos de coloración diferencial algunas veces visto en secciones teñidas con hematoxilina y eosina, cuando la intensidad de la eosina es grandemente reducida. Por alguna razón el aclaramiento de las secciones tiene que pasar un corto tiempo en eosina (10 segundos en 0.5% de eosina acuosa) no es muy clara si las secciones coloreadas han tomado eosina, siguiendo por la prueba de la diferenciación de teñido. Es mejor método que se mostrará con luz rosa en tejido óseo el cual es más fácil de distinguir de la lista de colores de hueso.

Se han obtenido excelentes resultados por descalcificación en el fluido de Muller. Esto toma un largo tiempo; tanto para hueso esponjoso, debe fallar enteramente - en hueso cortical duro como en cráneo. De otro modo, más métodos para tejido óseo, la descalcificación en el fluido de Müller puede ser seguido por la inclusión en parafina.

El hueso debe ser seccionado sin descalcificar, y cuando es suave presenta pocos problemas. El hueso normal, como sea, requiere mantenerse algo más duro que la parafina o nitrocelulosa y esto necesita de un equipo especial para cortarlo.

Las secciones congeladas deben ser cortadas con el hueso impregnado en gelatina, y debe ser lo suficientemente bueno para el reconocimiento de tejido óseo. Excepto

en prácticas con la mano, como sea, este método es apto para producir no más que una colección esparcida de huesos astillados. Los resultados más satisfactorios son obtenidos de huesos incluidos en media especial cuando son usados en microscopia electrónica (resinas epóxicas y metacrilato). No pueden ser usados rutinariamente en muchos laboratorios histológicos.

Las preparaciones histológicas deben ser obtenidas por pulverización de las superficies de un corte de hueso hasta que es lo suficientemente delgado para el microscopio.

NOTAS SOBRE FIJACION

El hueso debe ser fijado más a lo largo de un tejido ordinario por dos razones: (1) Penetración de la fijación sólo lentamente en hueso denso o médula ósea celular, y (2) la pieza de hueso es transferida directa a la fijación fluída a descalcificación fluída sin el beneficio de la fijación adicional por alcohol que el tejido ordinario toma durante la deshidratación.

Para una muestra grande (por ejemplo una vértebra), formalina salina y solución buffer de formalina neutral son las fijaciones fluídas satisfactorias. Como ya se indicó es mejor usar piezas pequeñas lo más posible. Para piezas pequeñas la elección de la fijación es más extensa aunque a veces no es recomendada. Por ejemplo la matriz colágena del hueso es bastante dura, aun después de la descalcificación, así que los fluídos son para tejidos duros, como la formalina alcohólica y fluído de Carnoy debe ser evitado. Otras fijaciones no satisfactorias son las penetraciones pobres, como el fluído de Zenker o fluídos

que contengan tetróxido de osmio.

En algunos laboratorios, el cloruro de mercurio es insatisfactorio porque las pruebas de rayos X para la descalcificación completa no pueden ser usadas después. Aparte de esto, como sea, no es razón para ser evitado el cloruro de mercurio y, verdaderamente, buenos resultados son obtenidos con fijación de los flúidos que contiene. El flúido de Helly es excelente para médula ósea cuando la pieza es delgada. Cloruro de mercurio-formalina y Susa, son satisfactorios aunque no mejores que la formalina salina y solución buferada neutral con formalina la cual es enteramente satisfactoria para hueso y la cual es superada sólo para el flúido de Helly para detalles citológicos de médula ósea.

Preparaciones histológicas satisfactorias pueden ser obtenidas si la pieza de tejido seleccionado para la fijación y descalcificación es delgada.

El límite más bajo es usualmente escogido por la dificultad de exposición muy delgada, de las piezas del tejido.

PRUEBAS PARA DESCALCIFICACION

Este descenso entra en tres grupos: (1) radiológico, (2) química y (3) pruebas de palpación en que la consistencia alterada del hueso es juzgada por los dedos.

PRUEBA RADIOLOGICA

Cuando las sales de calcio han sido removidas, la muestra cesa y demuestra áreas opacas sobre un filme de -

rayos X. El método es el simple y prevé que las sales de mercurio no han sido usadas en la fijación.

PRUEBA QUIMICA

Método para demostrar iones de calcio y el sobrenadante de la descalcificación. No es apropiado por todas las descalcificaciones fluidas.

REACTIVOS

A. 0.880 amonia

B. Solución saturada acuosa de oxalato de amonio.

METODO

1. Poner cerca de 5 mililitros de sobrenadante de fluido descalcificado en un tubo limpio con un fragmento de papel tornasol.
2. Agregar 0.880 de amonia gota a gota, sacudiendo repetidamente hasta que la reacción sea alcalina.
3. Agregar aproximadamente 0.5 ml. de solución saturada de oxalato de amonio. Sacar y esperar por 30 minutos.

RESULTADOS

Si la adición simple de amonia fuerte produce una nube de hidróxido de calcio, la descalcificación no es completa.

Si el oxalato de amonio produce oscuridad o un precipitado, la descalcificación no es completa.

Si el fluido permanece claro por 30 minutos, la --
descalcificación es completa.

PRUEBA DE PALPACION

Cuando una pieza de hueso es descalcificada pierde su rigidez, tan conveniente como flexible como una pieza de tejido suave o de densidad similar. De este modo, el hueso cortical duro, como el cráneo, es una semejanza con el cartílago: hueso esponjoso como el medio del cuerpo de la vértebra; queda casi como una pieza suave de hueso.

El hueso cortical es propiamente flexible, como --
suave; es de calidad esponjosa como una pieza de cartílago o celuloide grueso. Además, si ha sido descalcificado en ácido da una apariencia translúcida como la del cartílago.

El hueso esponjoso debe ser fijado por congelación suave. La palabra congelar sugiere más violencia de la --
que realmente requiere, que es tan necesaria, si no más --
que una muy suave depresión de la superficie. La descalcificación es completa cuando no hay espigas de estaño; --
puede ser fieltro para el hueso.

Arterias degeneradas son descalcificadas cuando --
las paredes pueden ser comprimidas por presión suave.

Una masa de yeso, como una forma de vieja tubercu-
losis, es de difícil acceso a la palpación. Pruebas químicas o radiológicas podrían ser más apropiadas para este tipo de muestra.

El uso de la aguja como accesorio para completar --

la descalcificación es poco satisfactorio.

ELIMINACION DEL POLVO DEL HUESO.

Ninguna muestra que haya sido cortada tendrá buenos fragmentos de hueso que no contengan polvo dentro de los intersticios cerca de la superficie cortada.

Esta sección histológica dañada así como la superficie cortada estaría guarnecida por la eliminación de unos cortes muy delgados. Una alternativa es meter la muestra sin guarnecerse pero descontando 12-20 secciones antes de coleccionar alguno.

ELIMINACION DEL FLUIDO DE DESCALCIFICACION

Es comúnmente supuesto que el lavado prolongado o tratamiento con un alcalino es necesario después de cada descalcificación. No hemos encontrado esta razón de ser después del fluido de Custer o ácido tricloroacético aunque el lavado es necesario después del fluido de Müller el cual contiene dicromato de potasio. El ácido nítrico formalina es mejor eliminador por cambios repetitivos en alcohol al 70%.

MÉTODOS INDIVIDUALES

Muchos métodos y modificaciones han sido publicadas. Problemas individuales requieren tratamiento especial, pero se encontró que la siguiente selección cumple las varias demandas de un laboratorio de rutina.

FLUIDO DE CUSTER

Es un método de rutina muy usual para piezas de --

hueso delgadas; particularmente apropiadas para médula -- ósea.

REACTIVOS

Fluido de Custer

20% de citrato acuoso de trisodio	50 ml.
Acido fórmico (técnico, 90%)	50 ml.

METODO.

1. Hacer una buena fijación del tejido en líquido de Custer. El volumen deberá ser cerca de 30 veces más que el tejido.

2. Examinar periódicamente. Si no se ha descalcificado, cambiar el líquido.

3. Eliminar bien el polvo del hueso.

4. Transferir a alcohol de 50% sin lavado preliminar.

5. Proceder a incluir en parafina o nitrocelulosa.

ACIDO TRICLORACETICO

Tan bueno como el líquido de Custer; para el uso de rutina se puede usar para hueso cortical duro o diente.

REACTIVO

Acido tricloracético acuoso al 5%.

METODO

1. Hacer una buena fijación de piezas de tejido o diente completo en el líquido. El volumen deberá ser cer

ca de 30 veces mas que el tejido.

2. Examinar una o dos veces al dia. Si no esta descalcificado, cambiar el liquido diario.

3. Eliminar bien el polvo de hueso.

4. Transferir a alcohol de 50% sin lavado preliminar.

5. Proceder a incluir en parafina o nitrocelulosa.

ACIDO NITRICO-FORMALINA.

Es un metodo rapido para piezas delgadas de tejido los resultados de la coloracion son pobres.

REACTIVOS:

Acido Nitrico-formalina	
Formalina	10 ml.
Agua Destilada	80 ml.
Acido Nitrico concentrado	10 ml.

METODO

1. Poner las piezas delgadas de tejido en el liquido. El volumen debera ser cerca de 30 veces mas que el te
jido.

2. Examinar dos veces diariamente. Si no está - - descalcificado, cambiar el fluido diariamente.

3. Eliminar bien el polvo de hueso.

4. Cuando descalcifica, eliminar el ácido con alcohol al 70% por varias horas.

5. Proceder a incluir en parafina o nitrocelulosa.

ACIDO NITRICO PARA MUESTRAS GRANDES

Apropiado para suavizar huesos completos, así estos pueden ser diseccionados. La apariencia histológica es poco satisfactoria.

REACTIVOS

Acido nítrico acuoso al 6%.

METODO

1. Fijar en Formalina-salina. Dependiendo del tamaño de la muestra necesitará 1/2 - 3 semanas.

2. Transferir a la solución con ácido nítrico. El volumen deberá ser cerca de 20 veces más que el tejido.

3. Cambiar el líquido descalcificante cada dos - - días hasta una descalcificación completa.

4. Lavar en agua corriente antes de la disección.

EDTA

Es un método lento el cual es apropiado para la investigación que para el laboratorio de rutina.

REACTIVOS

Formalina	10 ml.
Agua destilada	90 ml.
Etileno-diamina	
ácido tetracético	5.5 g.
sales disodio	

METODO

1. Hacer una buena fijación de la muestra en el fluido. El volumen deberá ser 30 veces mayor que el tejido.

2. Cambiar el líquido una vez a la semana. Al mismo tiempo examinar la muestra para su completa descalcificación. Las muestras más chicas deben ser examinadas más frecuentemente.

3. Eliminar los residuos de hueso.

4. Transferir a alcohol de 70%, proceder a incluir en parafina o nitrocelulosa.

LIQUIDO DE MULLER

Es el único método de descalcificación que permite una distinción consolable hecha entre tejido óseo y hueso mineralizado en secciones histológicas. El método es muy lento para ser usado para otro propósito.

REACTIVOS

Líquido de Müller

Dicromato potásico	5 g
Sulfato de sodio	1 g
Agua destilada	100 ml.

METODO

1. Hacer una buena fijación de las piezas del tejido en 30 volúmenes del líquido. Las piezas deben ser muy delgadas (no más de 2 mm. de grosor).

2. Examinar cada dos semanas. Si no se ha descalcificado, cambiar el líquido.

3. Eliminar los residuos de hueso.

4. Quitar el líquido descalcificante por prolongación y lavar en agua corriente (36-48 hrs.).

5. Transferir a alcohol de 50%, procesar e incluir en nitrocelulosa o parafina.

BAJAS DESCALCIFICACIONES POR CONGELACION

Para cortar secciones congeladas de inclusiones en gelatina del hueso, es posible evitar los fuertes efectos del alcohol. De cualquier manera la gelatina congelada provee más soporte para el hueso durante el corte que la parafina.

REACTIVOS

A. 12 1/2% de solución de gelatina acuosa

- B. 25% de solución de gelatina acuosa
 C. 15% de formalina acuosa.

METODO

1. Fijar bien en formalina salina
2. Lavar en agua corriente cada noche
3. Transferir a gelatina al 12 1/2% a 37°C por 48 horas.
4. Transferir a gelatina al 25% a 37°C por 48 horas
5. Incluir en gelatina al 25%, dejar que se enfríe hasta solidificarse.
6. Transferir el bloque a formalina al 15% para que se endurezca más por 3 días.
7. Cortar las secciones congeladas con un grosor de 15 micras y ponerlas en agua destilada.
8. Teñir por el método de Von Kossa con sales de calcio o por hematoxilina-eosina.

VON KOSSA PARA SALES DE CALCIO

Aunque no es muy observable como apropiado por las demostraciones de calcio, este método es realmente para demostrar fosfatos insolubles, carbonatos, oxalatos y uratos. Para precisar en histoquímica las coloraciones de calcio, ácido cloranílico debe ser usado. En tejidos animales, fosfatos insolubles, carbonatos y oxalatos son virtualmente siempre sales de calcio, así que la práctica del método de Von Kossa es apropiado para la demostración de calcio.

REACTIVOS

- A. Nitrato de plata al 5% [la concentración no ne-

cesita ser exacta).

B. Tiosulfato de sodio acuoso al 3% (la concentración necesita ser exacta).

C. Rojo neutral acuoso al 1%.

METODO

1. Poner las secciones en agua
2. Lavar bien en agua destilada
3. Tratar con solución de nitrato de plata en luz brillante por 20-30 minutos.
4. Lavar bien en agua destilada
5. Poner en tiosulfato de sodio por 5 minutos
6. Lavar bien en agua corriente
7. Poner en rojo neutral por un minuto
8. Lavar en agua corriente
9. Deshidratar, aclarar y montar.

RESULTADOS

Sales de calcio insolubles: café o negro
 Otras estructuras: matiz rosa.

GRANDES PREPARACIONES

Para preparaciones de baja descalcificación de hueso cortical o de diente debe ser obtenido por pulverización de cortes que sea lo suficientemente delgado para la microscopía.

METODO

1. Hacer los cortes lo más delgados posible. La -

muestra debe ser bien fijada, esto debe hacerse antes o después del corte.

2. a) Pulverizar el corte por frotación de cara - contra un fino carborundo (carburo de silicio) usando - - agua como lubricante y manteniendo la presión alta con el dedo, 6

b. Pulverizar el corte por frotación entre dos platos de vidrio usando agua como lubricante.

3. Cuando esté lo suficientemente delgado lavar en agua tibia.

4. Transferir a alcohol de 50%, deshidratar, aclarar en xilol.

5. Transferir a Dpx; sacar cada noche e impregnar; montar en Dpx.

OTROS METODOS DE DESCALCIFICACION

1. Método ácido
2. Cambio de ion resinas
3. Ionización eléctrica
4. Método de agentes penetrantes.

METODO ACIDO

El método ácido es quizás el más ampliamente usado para la rutina de procesamiento a lo largo del montaje de tejidos de hueso. Descalcificación de la fijación, lavar los tejidos, deben ser llevados al cuarto de temperatura en vasos con solución descalcificante agregada generosamente.

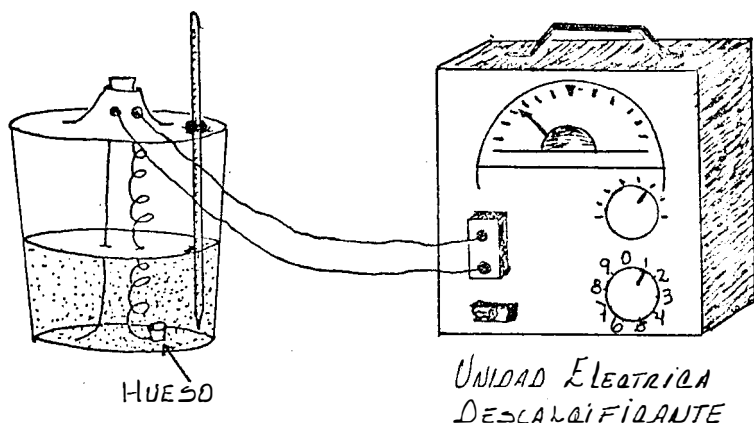
Los agentes más usados para la descalcificación son soluciones acuosas de ácido nítrico, ácido fórmico y ácido tricloroacético, ya mencionados anteriormente. Estos deben ser usados en combinación con un neutralizador para prevenir el exceso de inflamación del tejido. Las soluciones acuosas para la descalcificación son usadas cuando el glicogeno está preservado pero su uso es infrecuente de otra manera, desde que se ha dicho que el alcohol suprime la ionización.

Una histología y citología detalla pero no puede esperar si el tejido es desechado en la solución descalcificadora muy larga. La duración ideal del tiempo para la descalcificación de un tejido es de 24 a 48 horas. En lo posible no debe prolongarse más de 4 días. Como sea, algunos bloques de hueso gruesos tomarán 14 días o más para completar la descalcificación. Mallory recomendó que el tejido fuera suspendido en una pieza de gasa en la parte alta de un vaso para poder disolver sales de zinc en el fondo. Las soluciones ácidas deben cambiarse diariamente o dos veces por día para mejor descalcificación.

SOLUCIONES ACIDAS DESCALCIFICANTES

Ambos ácidos, nítrico y fórmico, producen una mínima distorsión y actúan rápidamente, pero el ácido nítrico tiene una desventaja de inhibir una buena tinción nuclear.

COMBINACION DE ACIDO FORMICO-ACIDO HIDROCLORICO



METODO

Secciones pequeñas de hueso son fijadas, lavadas y entonces descalcificadas en un aparato electrolítico, - usando ácido fórmico-ácido hidroc্লórico en un baño por 1 a 4 horas. NOTA: Esta forma es un descalcificante efectivo sin el uso de un aparato electrolítico pero la descalcificación será prolongada.

SOLUCIONES PARA DESCALCIFICACIONES ELECTROLITICAS

88% ácido fórmico	100 ml.
Acido hidroc্লórico	80 ml.
Agua destilada a hacer	1000 ml.

Descartar las soluciones después de 8 horas de uso máximo para acelerar la descalcificación. Las soluciones no deben ser usadas por más de 12 horas, porque pierden su efectividad.

Lavar en agua corriente por 3 a 6 horas. Deshidratar, aclarar y fijar de la manera usual.

AGENTES PENETRANTES

Agentes penetrantes orgánicos absorben iones metálicos. La palabra chēlē proviene de la palabra griega -- gancho, la cual significa agarrar. EDTA (Disodio etileno-diamina ácido tetracético) se combina con calcio y forma un complejo soluble nonionizado. EDTA es agente penetrante y se obtiene comercialmente bajo el nombre de Versene, Secuestrene y Questrex. Muchos investigadores reportan - descalcificaciones óptimas con solución saturada (10%) de EDTA. Es recomendado que para mejores resultados el pH - debe ser ajustado de 6.5 a 7.5 desde soluciones alcalinas que tienen tendencia a hidrolizar proteínas y degradarlas. EDTA descalcifica mejor huesos cancerosos y no es muy - - efectivo para huesos corticales densos como otros agentes. Tomará de 2 a 4 días para descalcificar el espécimen de - 3 a 4 mm de grueso, aunque en un tiempo más grande la solución descalcificadora no es nociva.

VENTAJAS

1. Preservación de los detalles histológicos y una calidad de teñido excelente.

2. Es innecesario un lavado cuidadoso seguido de - la descalcificación.

3. Esta técnica puede ser usada con la ventaja de que la médula ósea queda intacta.

4. El glicogeno en hueso o cartilago está mejor --

preservado por el uso de EDTA como agente descalcificante, seguido de una fijación con alcohol acético-formalina.

DESVENTAJAS

1. Este método es más lento en comparación con otras soluciones descalcificantes.

2. Para óptimos resultados el hueso debe tener un grosor máximo de 3 a 4 mm.

METODO VERSENE

1. Fijar el tejido en formalina bufferada al 10%. - Lavar el tejido.

2. Ponerlo en solución acuosa saturada (10% de Versene bufferado, 20 veces el volumen del tejido). Cambiar la solución diariamente.

3. Cuando la descalcificación es completa, lavar en agua brevemente y transferir a alcohol de 70%.

4. Tejido listo para ser procesado en la técnica como es usual.

MEDULA OSEA Y CELULAS RELATIVAS

El método de coloración escogido dependerá del material. Para muchos propósitos, los mejores resultados son obtenidos con manchar en aire en seco, para lo cual la coloración de Romanowsky será el tipo usado. Las secciones histológicas deben ser teñidas por uno o más de los siguientes métodos:

Una cuidadosa diferenciación con hematoxilina-eosina, da una buena vista general de la médula. Los varios tipos de células de la médula son más fáciles de reconocer en las secciones teñidas por el método de Barret o el método de Giemsa. Algunas veces todos son requeridos en un método para la identificación de un tipo particular de célula. Desafortunadamente, esto no es siempre posible, y hay muchas células para las cuales no hay métodos específicos. De cualquier manera, es comparativamente simple demostrar los leucocitos eosinófilos, reticulocitos y células del plasma.

METODO DE BARRET PARA MEDULA OSEA

ALCANCE

Apropiado para seccionar en parafina, preferentemente de 2 a 3 micras de delgada. El líquido de Helly da mejores resultados pero otras rutinas de fijación deben ser usadas. Si la descalcificación es necesaria, deberá ser suave: el Líquido de Custer es satisfactorio.

REACTIVOS

A. Hematoxilina de Carazzi

Hematoxilina

0.5 g

Glicerol	100 ml
Aluminio potásico	25 g
Agua destilada	400 ml
Iodo potásico	0.1 g

B. Acido Hidroclorídrico al 1% de alcohol.

C. Mixtura naranja

1% eritrosina acuosa	3 ml
1% naranja G acuosa	9 ml
Agua destilada	6 ml

D. Mixtura azul

1% metileno azul acuoso	2 ml.
1% de toluidina azul acuosa	1 ml.
Agua destilada	17 ml

Filtrar antes de usar.

E. Solución Buffer A.

13.6 de fosfato dihidrógeno potásico	4 ml.
Agua destilada	250 ml

Esta solución deberá conservarse en el refrigerador.

F. Solución Buffer B.

13.6% de fosfato dihidrógeno potásico	1 ml
4% de hidróxido de sodio	1 ml
Agua destilada	250 ml

Esta solución debe conservarse en el refrigerador.

G. Solución Buffer para trabajar

Buffer solución A	2 partes
Buffer solución B	1-4 partes

Esta solución deberá prepararse en fresco sólo la cantidad necesaria.

H. Coloración mixta fuerte

Mixtura naranja	0.5 ml
Solución Buffer p/trabajar	0.5 ml
Acetona	1.0 ml

Deberá ser preparada en fresco

I. Solución colorante débil

Mixtura naranja	0.1 ml
Mixtura azul	0.1 ml
Solución Buffer p/trabajar	10 ml
Agua destilada	30 ml

Deberá ser preparada en fresco

METODO

1. Poner los cortes en agua
2. Poner en hematoxilina de Carazzi; de 10-20 minutos.
3. Lavar en agua corriente por 2-3 minutos.
4. Poner en ácido alcohol 5-10 segundos
5. Lavar en agua corriente de 5-10 minutos
6. Poner en coloración mixta fuerte por 20 ó 30 minutos en un vaso cerrado.
7. Lavar en agua destilada
8. Poner en solución colorante débil cada noche en un vaso cerrado.
9. Deshidratar, aclarar y montar.

RESULTADOS

Gránulos eosinófilos

Naranja a escarlata

Gránulos neutrófilos	Rojo carmesí
Gránulos basófilos	Púrpura-azul
Corpúsculos de glóbulos rojos	Rosa o rosa-naranja
Otras estructuras	más o menos azuladas.

CROMATROPO 2 R

Esta coloración es para leucocitos eosinófilos. -
Apropiados para secciones en parafina, secciones por congelación y manchados.

REACTIVOS

- A. Hematoxilina de Carazzi
- B. Acido hidrociorídrico al 1% en alcohol al 70%
- C. Carbol- chromotropo

Fenol	1 g
Cromotropo 2R	0.5 g
Agua destilada	100 ml

Tibiar los cristales de Fenol hasta derretir. -
Agregar el colorante y mezclar bien. Disolver la mezcla en agua. La solución se mantiene por tres meses.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- AFIP (Armed Forces Institute of Pathology). Libro de Técnicas Histológicas, CMO.
- 2.- Disbrey/Rach. 1970. *Histological Laboratory Methods*. - Edinburgh London, E.S. Livigstone.
- 3.- Elvira Estrada Flores-Leonor Peralta Zamora-Patricia Rivas Manzano. *Manual de Técnicas Histológicas*. 1a. Edición. AGT Editor, S. A.
- 4.- *Enciclopedia Autodidáctica Quillet*. Morfología, Anatomía y Fisiología. Tomo III. Ed. Cumbre S.A. México.
- 5.- *Enciclopedia de la Ciencia y de la Técnica*. Tejido - Conectivo. Tomos 2 y 5. Ed. Océano.
- 6.- Gaviño/Gonzalo/Juárez/Figueroa. 1982. *Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo*. 6a. Edición. Limusa. México.
- 7.- *Gran Enciclopedia Médica SARPE*. Tejido conectivo. Tomo 2.
- 8.- Gretchen L. Humason. 1979. *Animal Tissue Techniques*. - Fourth edition. W.H. Freedman and Company, San Francisco.
- 9.- Ham Arthur W. 1975. *Tratado de Histología*. 7a. Edición Interamericana. México.

- 10.- Harmon M. Bickley, DDS, PhD; Gunther Von Hagers, Dr. Med Frank M. Townsend, MD. Dec. 1981. An improved -- method for the preservation of teaching specimens. - Arch Pathol. Lab Med-Vol 105
- 11.- Jeffrey J.W. Baker, Gerland E. Allen. 1965. *Biología e Investigación Científica*. Fondo Educativo Interamericano.
- 12.- L.C. Junqueira/J. Carneiro. 1981. *Histología Básica* 2a. Edición Salvat S.A. México.
- 13.- R. Martoja y M. Martoja-Pierzon. 1970. *Técnicas de Histología animal*. 1a. edición. Toray-Masson, S.A. - Barcelona.
- 14.- Rebollo María Antonieta. 1966. *Histología* 2a. Edición. Editorial Interamericana.
- 15.- Robbins-Angell. 1973. *Patología Básica*. 1a. Edición Edit. Interamericana. México.
- 16.- S. Ramón y Cajal/J.F. Tello y Muñoz. 1955. *Elementos de Histología normal y de Técnica Micrográfica*. Duo décima Edición. Editora Nacional. México, D.F.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 666/86

Srita. Ma. de Lourdes Ramírez Aguilar
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis "Manual de Técnicas Histológicas para Tejido Conectivo" -
para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Biomédica.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -
Director de dicha Tesis el M.V.Z. Miguel Carbajal Soria.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 3 de 1986

El Director,

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

José Manuel Copelánd Gurdíel
Dr. José Manuel Copelánd Gurdíel.

c.c.p. El M.V.Z. Miguel Carbajal Soria, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna

'mjsd

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FAC. DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E. _

Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la SRITA. MA. DE LOURDES RAMIREZ AGUILAR, Pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el - proyecto de tesis titulado:

"MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA TEJIDO CONECTIVO"

Asi mismo le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero - que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Guadalajara, Jal. 27 Abril de 1988

A T E N T A M E N T E

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA.