

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE CIENCIAS



Manual de técnicas histológicas para
tejido epitelial

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Lic. en Biología

P R E S E N T A :

Esther Rodríguez González

GUADALAJARA, JAL., 1988

DEDICATORIAS

A mis Padres, Francisco y Natalia lo más grande ypreciado en mi vida, les debo haber finalizado el camino con su gran sacrificio aliento y amor.

A mis hermanos Francisco, Justo y Elfas, los cuales contribuyeron alentándome a llegar a la meta.

A mi hermana María de los Angeles la cual con su ayuda y cariño incondicional he logrado continuar el camino.

A mi pequeño hijo Francisco Isafas al cual sacrificué sus sueños para llegar al final.

Y a tí más que a na-
die Gracias Señor '
por darme Fe y Espe-
ranza para seguir
adelante.

A mis maestros a los
que agradezcó el lo-
gro de mi objetivo
ya que con su gran
labor y dedicación '
llegué a la cima.

A mi Universidad a la cual
estaré eternamente agrade-
cida, ya que en sus aulas,
logré realizar uno de mis
más preciados sueños, el '
ser profesionista.

Con respeto y agradecimiento
a mi Director y Asesor de
Tesis;

M.V.Z. Miguel Carbajal Soria
A quien debo la realización
de mi tesis.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION.	1
OBJETIVOS.	3
CAPITULO I	
GENERALIDADES	4
1.1 La Célula	
1.2 Tejidos.	
CAPITULO II	
APARATOS DE OBSERVACION	11
2.1 Microscopio de polarización	
2.2 Microscopio de Fluorescencia	
2.3 Microscopio de contraste de fases	
2.4 Microscopio de interferencia.	
CAPITULO III	
APARATOS DE CORTE (MICROTOMOS)	17
3.1 Microtomos para corte por parafina	
3.2 Microtomos para corte por congelación.	
CAPITULO IV	
MATERIAL DE LABORATORIO	20
Cristalería.	

CAPITULO V

REACTIVOS

27

- 5.1 Reactivos fijadores
- 5.2 Reactivos aclaradores
- 5.3 Reactivos opacantes
- 5.4 Reactivos aisladores
- 5.5 Reactivos ablandantes
- 5.6 Reactivos inofensivos
- 5.7 Reactivos colorantes
- 5.8 Reactivos conservadores.

CAPITULO VI

METODOS HISTOLOGICOS

33

FIJACION

- 6.1 Cualidades de los fijadores
- 6.2 Características de los fijadores
- 6.3 Acción del fijador sobre los tejidos
- 6.4 Desventajas de los métodos de fijación
- 6.5 Agentes fijadores
- 6.6 Mezclas fijadoras
- 6.7 Selección del fijador
- 6.8 Modo de empleo del fijador.

CAPITULO VII	pág.
CORTES	50
7.1 Cortes en tejido blando	
7.2 Procedimiento de congelación	
7.3 Cortes por congelación.	
CAPITULO VIII	
INCLUSION	54
8.1 Inclusión en parafina.	
CAPITULO IX	
METODOS GENERALES DE TINCIÓN	61
9.1 Coloraciones	
9.2 Naturaleza de las coloraciones	
9.3 Clasificación de los colorantes	
9.4 Métodos de coloración	
9.5 Coloraciones generales y específicas	
9.6 Coloraciones directas e indirectas	
9.7 Coloraciones progresivas y regresivas	
9.8 Coloraciones simples y combinadas	
9.9 Coloraciones panópticas	
9.10 Coloraciones en bloque	
9.11 Impregnaciones metálicas.	
CAPITULO X	
ANTECEDENTES HISTORICOS	77
TEJIDO EPITELIAL.	

CAPITULO XI

TECNICAS PARA TEJIDO EPITELIAL

102

11.1 METODOS COMBINADOS DOBLES.

METODO DE HEMATOXILINA-EOSINA (Hematoxilina de Harris - Eosina alcohólica).

METODO DE HEMATOXILINA DE HARRIS.

11.2 METODOS TRIPLES

Método tricómico de Gallego

METODO DE DOBLE IMPREGNACION EN CALIENTE de Rfo-Hortega para armazones fibrilantes y células).

METODO DE IMPREGNACION PARA EPITELIO FIBRILLAS de Rfo-Hortega.

METODO DE FUCSINA ACIDA-AZUL DE ANILINA para gránulos basófilos y acidófilos de la hipófisis.

11.3 METODOS ARGENTICOS

METODO DE IMPREGNACION SENCILLA EN FRIO DE RIO-HORTEGA.

METODO DE IMPREGNACION CON CARBONATO SIMPLE EN CALIENTE.

METODO DE FLOXINA - HEMATOXILINA DE CROMO para gránulos basófilos y acidófilos de pancreas, de Gomori.

METODO DE IMPREGNACION PARA FIBRAS NERVIOSAS Y SISTEMA CROMAFIN VARIANTE BARROSO - MOGÜEL

(SUPRARRENALES)

METODO DE SCHMORL (SUPRARRENALES: PARA CELULAS
CROMAFINES)

METODO DE WIESEL (SUPRARRENALES: PARA CELULAS
CROMAFINES)

METODO DE GOMORI (SUPRARRENALES: PARA GRÁNULOS
CROMAFINES).

C O N C L U S I O N E S .	126
R E S U M E N .	128
BIBLIOGRAFIA.	129

I N T R O D U C C I O N

El contenido de este manual se desarrolló con la intención de proporcionarle una serie de técnicas histológicas para tejido epitelial, que sirvieran como base, además de una fuente de información importante, ya que muchas veces aún tratándose de temas generales, nos vemos en la necesidad de consultar literatura en otros idiomas.

Por esta razón se cree conveniente indicar de la manera más simple un conjunto de técnicas histológicas para conocer más a fondo las estructuras anatómicas de los organismos. Por lo que en este trabajo sólo se mencionan los más conocidos y utilizados para el tejido epitelial.

El propósito de este trabajo no es de ninguna manera el de abarcar una información completa acerca de dichas técnicas histológicas, pero sí trabajar para superar los cursos de las generaciones futuras y enriquecerlas con información cada vez más útil.

Es evidente que los adelantos en esta época se caracterizan por el repetido afán de mejorar más las aplicaciones de las técnicas, mediante nuevas combinaciones de acuerdo a las necesidades de preservaciones de un tejido para un futuro estudio.

Actualmente la técnica histológica cuenta con retribuciones valiosísimas, de las que aquí es imposible hacer una reseña histórica.

O B J E T I V O S

- Tener la información necesaria y actualizada sobre las técnicas histológicas del tejido epitelial.
- Contar con el apoyo técnico necesario para la clase de histología.
- Apoyar cualquier investigación que se realiza en esta área.

CAPITULO I

GENERALIDADES.

1.1.- LA CELULA.

La célula es la unidad biológica fundamental de los seres vivos. Las actividades de los organismos, cualesquiera que ellos sean, son los resultados de los de todas y cada una de las células que los constituyen. Es un elemento con una cierta individualidad propia. Las células de distintas plantas y animales presentan un tamaño variable. La célula tiene forma muy variable, cuando jóvenes son generalmente de forma ovoide o esferoidal. Cualquiera que sea su forma y tamaño la célula está constituida por tres partes esenciales: Membrana; protoplasma; núcleo y un cierto número de organelos sub-celulares; las formas más comunes son: Mitocondrias, retículo endoplásmico liso, aparato de golgi, lisosomas, centrosomas, cilios, flagelos..

Desde el punto de vista morfológico y anatómico la célula es el elemento fundamental de los seres vivos unicelulares o pluricelulares, desde el punto de vista funcional las células pueden agruparse en dos categorías fundamentales. Las vegetativas y las de relación. Al primer grupo corresponden la nutrición, la respiración, la secreción, la

circulación y la reproducción; y el segundo grupo la irritabilidad y el movimiento.

1.2.- TEJIDOS.

TEJIDO EPITELIAL.

Es un tejido integrado por células contiguas con escasa sustancia intercelular que suele cubrir superficies internas y externas del organismo y además puede derivar de cualquiera de las tres hojas embrionarias, y que cumple con funciones de revestimiento o glandular (principalmente) o revestimiento especializado, realizando trabajos sensoriales (como receptor de estímulos).

CLASIFICACION FUNCIONAL DE LOS EPITELIOS.

El tejido epitelial se clasifica de acuerdo a sus funciones más notorias:

- a) Epitelios de revestimiento.
- b) Epitelios glandulares.

Los epitelios de revestimiento son los encargados de cubrir las superficies internas y externas del organismo. De acuerdo con la cantidad de capas de células que los inte

gran se sub-clasifican en:

a) Epitelios simples; éstos a su vez se clasifican según la forma de las células en tres tipos diferentes:

- epitelios planos
- epitelios cilíndricos
- epitelios cúbicos.

b) Epitelios estratificados: En la constitución de éstos, intervienen varias capas o estratos, se clasifican en:

- pavimentoso estratificado
- cilíndrico estratificado
- polimorfo o de transición.

c) Epitelio glandular: Señalamos que hay dos clases principales de tejido epitelial, la glandular es la segunda y se pueden clasificar de muchas maneras, hay dos grupos principales:

- Glándulas exocrinas
- Glándulas endocrinas.

Las glándulas exocrinas se clasifican de varias maneras:

- glándulas simples y compuestas
- glándulas tubulares, acinosas y alveolares

- glándulas mucosas serosas y mixtas
- glándulas merocrinas, holocrinas y apocrinas.

La estructura de las glándulas endocrinas es bastante más sencilla que las de las exocrinas, porque no poseen conductos.

TEJIDO CONJUNTIVO.

El origen del tejido conjuntivo se deriva de la tercera capa germinativa.

El tejido conectivo difiere de los epitelios porque posee abundante sustancia intercelular o matriz. La matriz consiste en fibras y sustancia fundamentalmente, en cualquier clase de tejido conectivo, deben tomarse en cuenta tres elementos: Células, fibras y sustancia fundamental; las dos últimas forman la sustancia o intercelular o matriz intercelular. Los tejidos esqueléticos difieren de los conectivos propiamente dichos por la rigidez de la matriz.

Clasificación del tejido conjuntivo:

La clasificación principal del tejido conjuntivo depende de la concentración de fibras. El tejido conjuntivo que muestra abundantes fibras dispuestas en forma compacta se

llama tejido conectivo denso. El tejido conectivo laxo presenta pocas fibras y comparativamente más células.

TEJIDO MUSCULAR.

En el tejido muscular se distinguen tres tipos de tejido muscular:

- Estriado
- Liso o voluntario
- Cardíaco.

El tejido muscular tiene la propiedad de contractilidad en sentido lineal de las fibras musculares. La contracción es responsable de la locomoción y movimiento de órganos internos, también tiene gran importancia en la producción de calor del cuerpo.

El tejido muscular liso se compone de células largas, delgadas, fusiformes que poseen un solo núcleo alargado localizado en la porción central.

Tejido muscular estriado: Compone todos los músculos voluntarios, se encuentra formado por fibras largas.

Tejido muscular cardíaco: Presenta características del

músculo liso como del músculo esquelético, ya que sus contracciones son rítmicas o involuntarias.

Su desarrollo embrionario se intercala entre el ectodermo y el endodermo.

TEJIDO NERVIOSO.

La unidad estructural del tejido nervioso es la neurona, la cual tiene la propiedad de irritabilidad o capacidad para responder a estímulos físicos y químicos por iniciación del impulso y conductividad, transmisión de la onda de excitación. Además de las neuronas el sistema nervioso incluye células de sostén y satélites, vasos sanguíneos y, en el sistema nervioso central, un revestimiento protector llamado meninges.

Cada neurona está compuesta por un cuerpo celular y sus prolongaciones. El cuerpo de la neurona suele ser voluminoso, de tamaño variable. Las neuronas se clasifican en tres clases generales: Unipolares; multipolares y bipolares.

La mayor parte de las neuronas tienen varias dendritas que se ramifican repetidamente, lo cual aumenta la superficie para recepción del impulso.

Las fibras nerviosas están formadas por citoplasma y cubiertas por membrana plasmática, varían en tamaño. Las fibras nerviosas del sistema nervioso periférico están rodeadas de una vaina celular, el neurilema.

CAPITULO II

TECNICA GENERAL PARA EL ESTUDIO DE LOS TEJIDOS.

Los siguientes recursos prácticos forman la técnica histológica para estudiar los elementos constitutivos de los tejidos:

Aparatos, Material de Laboratorio que incluye cristalería, accesorios y reactivos y los Métodos ó Técnicas Histológicas.

Entre los múltiples aparatos que se utilizan actualmente para el estudio de la histología, aquéllos que se hacen indispensables para la enseñanza y la investigación son los aparatos de observación y de Corte.

APARATOS DE OBSERVACION.

(Microscopios). Aunque inciertos, los orígenes del microscopio se remontan a los egipcios; sin embargo no se logró la construcción de éste hasta el siglo XVII y el mérito corresponde a Antonio Leeuwenhoek. Pero fue en el siglo XIX cuando el físico Ernest Abbe, en colaboración con un relojero de nombre Carl Zeiss, construyeron los primeros microscopios.

Con Abbe se desarrollaron además las teorías para la construcción de otros sistemas ópticos tales como contraste de fases, interferencia, etc. Las contribuciones posteriores se refieren al perfeccionamiento y especialización del microscopio basándose en los principios de Abbe y Zeiss.

El microscopio puede ser simple, cuando consta de una sola lente biconvexa o plano convexa, dispuesta de tal suerte que suministra una imagen virtual derecha y más grande que el objeto, o puede ser compuesto cuando está constituido por un sistema de lentes separadas que combinan las dos condiciones en que las lentes dan imágenes amplificadas, es decir, una imagen real invertida y ampliada más una imagen virtual derecha y más grande, en relación a la primera.

Todo microscopio compuesto comprende una parte mecánica y una parte óptica. Ambas se complementan y deben ser lo más perfectos posibles para obtener el mejor rendimiento.

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

La parte óptica consta de espejo o prisma, que refleja la luz de la lámpara; condensador, objetivos y oculares. Esta descripción corresponde al microscopio de observación; este microscopio es especialmente útil en la enseñanza, e

ideal para la observación de preparaciones fijados y teñidos.

Para la determinación de los componentes tisulares, no solo el microscopio de observación es útil, sino que también tienen importante aplicación otros microscopios de los cuales se hará una breve mención a continuación.

2.1. MICROSCOPIO DE POLARIZACION.

Para fines prácticos, un microscopio de campo claro puede servir como microscopio de polarización, si se equipa adecuadamente con dos filtros de material polaroide: Uno que encaje en el anillo del condensador y que quede cercano a la fuente luminosa, y otro que se ajuste al ocular del microscopio y que quede cercano al objetivo. Al interponer estos filtros en planos de polarización perpendiculares entre sí, se obtiene un campo de luz polarizada que varía en presencia de algunos materiales, que destacan por su brillantez y coloración particular; los materiales que producen este efecto se dice que son ópticamente activos.

El material biológico en observación puede ser vivo o fijado y teñido, con el único requisito que sea ópticamente activo.

2.2. MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.

Es un microscopio común, puede aplicarse la fluorescencia mediante la inclusión adecuada de una fuente de iluminación ultravioleta, un condensador con lentes de cuarzo y entre el objetivo y el ocular, los filtros necesarios para eliminar la luz ultravioleta que pueda pasar al sistema. La fluorescencia que poseen los cuerpos puede ser natural o inducida por medio de fluorocromos.

Tanto animales como vegetales, poseen sustancias con fluorescencia natural o bien para un estudio específico, ésta puede ser inducida.

2.3. MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES.

Es el sistema óptico de mayor utilidad en el estudio del material vivo; para la histología representa la observación de la estructura real de las células eliminando las alteraciones que en cierta medida conllevan el material fijado y teñido. Además unifica la forma y la función celular, que es tan importante en la interpretación histológica. Desafortunadamente, en general, sólo brinda dotes aislados y hasta ahora no ha permitido el estudio integral de los tejidos.

Este microscopio se basa en la introducción de una diferencia de fase de $1/4$ de longitud de onda, entre la luz directa y la difractada que pasan a través del objetivo. Esto convierte las diferencias de refractividad en diferencias de intensidad de la luz apreciable por el ojo. En la práctica esto se logra mediante dos dispositivos anulares que se colocan, uno en el condensador y otro en el objetivo y que producen el desfasamiento de $\lambda/4$ de longitud de onda. Se debe utilizar luz monocromática, de preferencia verde.

2.4. MICROSCOPIO DE INTERFERENCIA.

Este sistema trabaja produciendo una interferencia entre dos campos, uno de la fuente de luz y otro de la fuente de luz más el objeto, haciéndose posible variar la diferencia de fases entre los dos campos y aumentar así considerablemente el contraste.

Puede obtenerse interferencia policromática si se adiciona una lámina de refracción policromática. Mediante la secuencia de colores, que indica diferentes índices de refracción pueden hacerse determinaciones cuantitativas, por ejemplo de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc.

Estos métodos físicos aplicados a la microscopía, son armas utilísimas para el desarrollo científico y adaptados

a la Biología brindan un amplio panorama para el estudio de sus diversas ramas.

CAPITULO III

APARATOS DE CORTE (MICROTOMOS)

Para hacer el examen microscópico de los tejidos, es necesario que éstos ofrezcan transparencia, lo cual solo puede lograrse de tres maneras: Mediante películas muy delgadas de tejido como las que se obtienen en algunos cultivos de tejidos disociando el tejido en sus elementos componentes; o reduciendo a cortes sumamente delgados. Muy numerosos son en la actualidad los modelos de microtomos usados en los Laboratorios, pero considerando el mecanismo mediante el cual impulsan el objeto seccionable, casi todos caen en la categoría de microtomos de deslizamiento. Estos microtomos tienen variaciones en precisión, automatismo, tamaño, etc. y pueden ser muy específicos de acuerdo al material de inclusión.

3.1 MICROTOMOS PARA CORTES POR PARAFINA.

Estos microtomos constan en general de una sólida base y soportes verticales; uno de éstos corre sobre un carril y lleva la pieza conductora de la navaja, que puede fijarse mediante tornillos en las más variadas posiciones; otros soportes sostienen las piezas que contiene la portaplátina y que tiene un mecanismo de ascenso y descenso, esta pieza está unida a una manivela que permite regular estos movimien-

tos, la pinza portaplatina puede deslizarse horizontalmente y paralela a la navaja mediante un tornillo micrométrico. 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 que se fija en el número de micras deseado.

3.2 MICROTOMO PARA CORTES POR CONGELACION.

En los últimos años, se ha ampliado mucho el uso de los microtomos para hacer cortes por congelación porque permiten obtener cortes finos en poco tiempo y porque se ha hecho común el empleo del ácido carbónico líquido para la producción inmediata de bajas temperaturas.

Los modelos por demás muy variados, son sencillos y económicos, además, aunque el microtomo no sea especial para congelación, pueden hacerse adaptaciones para que funcione como tal, sobre todo a microtomos que sirven para cortar mediante inclusión en parafina y celoidina.

En términos generales, el aparato consta de una base que puede sujetarse fácilmente al borde de una mesa; sobre esta base se encuentran las otras piezas que son: Una platina donde se coloca el bloque que se va a seccionar; relacionada y por debajo de esta platina, encontramos una cámara

pulverizadora unida al tanque que contiene el gas, el cual es independiente del microtomo y mediante tubos y juego de llaves hace pasar el ácido carbónico instantaneamente hasta el pulverizador; la otra pieza indispensable es la navaja, que mediante un soporte que le brinda giro en arco de circulo ataca perpendicularmente a la pieza seccionable.

En general, si se desea tener éxito en la microtomía, es indispensable obtener un perfecto endurecimiento o inclusión de la pieza que se va a seccionar y mantener constantemente la navaja bien afilada.

CAPITULO IV

MATERIAL DE LABORATORIOCRISTALERIA .

El material de cristalería más común y su empleo en la técnica histológica puede ser resumido en la siguiente lista.

- Vasos de Precipitados Graduados y no Graduados:

Se usan para colocar sustancias que no sean muy volátiles, concentrados y corrosivas, por ejemplo agua, alcoholes diluidos, etc. Los hay de muchas capacidades, los más empleados varían entre 40 cc y 500 cc.

Pueden usarse también como recipientes para residuos para calentar ligeramente alguna sustancia, etc.

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

- Matraces Graduados y No Graduados;

Se usan sobre todo para la preparación de reactivos, '

como colorantes, alcoholes, etc. y en general para hacer diluciones o mezclas; es frecuente que una vez preparado el reactivo se desocupen los matraces y las sustancias se pasen a frascos tapados donde se conservan.

Se usan también para calentar sustancias, incluso hasta ebullición, tapando o no la boca del matraz, según el desprendimiento de vapores.

- Probetas y Pipetas Graduadas:

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

- Cajas de Petri, Cajas y Vasos de Koplín:

Se emplean sobre todo en la elaboración de las técnicas de tinción, en ellas se depositan las diferentes sustancias en el orden establecido por la técnica y allí se colocan los cortes libres, en cuyo caso se usan cajas de Petri o adheridos al portaobjetos, utilizándose entonces las cajas o vasos de Koplín.

Las cajas de Petri se utilizan en especial para teñir cortes por congelación o inclusión, pero uno por uno; las

cajas y vasos de Koplín para teñir cortes en serie inclusión o frotis.

Las cajas que contengan alcoholes y xilol deben estar tapadas para que los cortes no se hidraten deben taparse, asimismo las cajas que contengan sustancias corrosivas y dañinas o que sufran precipitaciones.

Las cajas de Petri son útiles también para graduar y manejar cortes por congelación hasta el momento de ser teñidos, manteniéndolos en agua destilada con unas gotas de formol.

Las cajas de Petri profundas y poco profundas; las primeras suelen usarse para el xilol o la creosota, para facilitar el montaje de los cortes en el portaobjetos y en general para baños abundantes o por largo tiempo; las segundas se utilizan en general para baños escasos o de poco tiempo.

- Frascos Goteros:

Estos frascos son útiles para guardar reactivos no corrosivos que se emplean en pequeñas cantidades y se adicionan por goteo.

- Frascos con Tapón Esmerilado para Reactivos:

Se utilizan sobre todo para guardar reactivos, en especial los muy corrosivos, pues frecuentemente los vapores destruyen los tapones que no son de vidrio, estos frascos pueden ser transparentes o de color ámbar; los primeros para reactivos que no sufren cambios por la acción de la luz, y los segundos cuando se da el caso contrario.

- Cristalizadores:

Son ideales para efectuar baños sobre otros recipientes que contengan sustancias a las que se desea elevar o bajar la temperatura, o simplemente, conservar a ciertas condiciones de temperatura o también suelen emplearse para seleccionar y enjuagar el material obtenido de las disecciones.

- Vidrios de Reloj:

Se emplean para hacer pequeñas mezclas, enjuagues o tintaciones de pocos cortes o para cubrir recipientes, sobre todo vasos de precipitación y pocillos de Rfo-Hortega. Los hay de varios tamaños para adaptarse a la boca del recipiente.

- Frascos de Boca Ancha con Tapón de Rosca:

Se emplean con frecuencia, sobre todo en la enseñanza, para realizar la fijación de los órganos y para la preparación de las piezas de platina que van a ser incluidas en parafina; en estos frascos, los estudiantes hacen sus deshidrataciones, aclaraciones, transparentaciones, etc. En los laboratorios de investigación o de técnicas de rutina son menos empleados, puesto que los pasos previos a la inclusión suelen hacerse en un procesador automático de tejidos.

- Cubreobjetos y Portaobjetos:

Los cubreobjetos y los portaobjetos son láminas delgadas de cristal, libres de burbujas y asperezas, que sirven para montar y cubrir los preparados destinados a la observación microscópica. El tamaño y delgadez de estas laminillas varía para adaptarse a las dimensiones de los preparados; en general los portaobjetos miden 75 mm. de largo por 25 mm de ancho, con espesor poco variable, y los cubreobjetos más usados de 22 por 22 mm. con un espesor de entre 7 y 30 centésimas de mm. En el mercado el espesor se denomina con los números 1, 2 o 3, correspondiendo el número 1 a los más delgados, que son los que se recomiendan para trabajos de investigación y para la aplicación de fuertes aumentos.

Sobre el portaobjetos se montan los preparados, fres-

cos o fijados y teñidos, cubriéndose o no con un reactivo conservador. Sobre ellos se realizan también los métodos de tinción en los cortes, que mediante un adherente fueron montados previamente en ellos. -igualmente si se trata de frotis o extendidos.

Los cubreobjetos son delgadísimos cristales que están destinados a cubrir las preparaciones, ya montadas en el portaobjetos, y embebidas o no en el conservador; su función principal radica en hacerlas planas y manejables bajo el microscopio y protegerlas de cuerpos extraños.

- Embudos:

Son elementos indispensables en la preparación de muchos reactivos, entre ellos los colorantes. El empleo de los embudos está íntimamente ligado al uso de papel filtro o algodón de vidrio, ya que es mediante el ensamble de éstos dos objetos que se hace el filtrado de las sustancias, de las cuales se desea eliminar precipitados residuos, impurezas, etc.

- Otro Material:

Aunque no se trata precisamente de material de cristalera, mencionaremos algunos accesorios indispensables para

la elaboración de las técnicas histológicas. Estos son: Ganchos de vidrio, agitadores, pinceles, agujas de disección, pinzas, etc., necesarios para manejar los cortes, y etiquetas, charolas y cajas, para manejar las preparaciones.

CAPITULO V

REACTIVOS .

Se denominan reactivos a las sustancias que producen en los tejidos modificaciones físicas o químicas, en virtud de las cuales puede adquirirse información acerca de la estructura y relación de sus elementos anatómicos.

Existen tejidos como el conectivo, endotelial, nervioso, etc., cuyos elementos carecen de color o bien tienen es caso contraste en sus índices de refracción, lo que dificulta, bajo el microscopio, la determinación de ciertas estructuras por la homogeneidad que ofrecen al observador.

Este hecho, entre otros, ha propiciado que los reactivos sean ampliamente usados, debido a su poder revelador. Además, la mayor parte de los tejidos son gruesos y opacos, y es necesario reducirlos a finos cortes; para ello se hacen indispensables operaciones previas de fijación y posteriores de coloración y conservación.

Son múltiples los reactivos empleados y una manera - - práctica de clasificarlos es de acuerdo a las modificaciones que provocan en los tejidos. Así tenemos reactivos fijadores, aclaradores, opacantes, aisladores, ablandadores, inofensivos, colorantes y conservadores.

5.1 REACTIVOS FIJADORES:

Estos reactivos detienen o minimizan las alteraciones post-mortem por precipitación o coagulación de las proteínas celulares; al mismo tiempo endurecen los tejidos, preparándolos para su posterior manipulación. Los fijadores más usados son el alcohol, ácido crómico, acético, pícrico, ósmico, cloruro de platino, bicloruro de mercurio y formol, este último diluido al 10% es el más empleado.

Pueden usarse solos o mezclados en distintas proporciones, utilizando así las ventajas de varios de ellos.

5.2 REACTIVOS ACLARADORES:

Los reactivos aclaradores actúan borrando o moderando los índices de refracción de los elementos tisulares. Mientras menos contraste más claros aparecerán los preparados y más fácil será la apreciación de los elementos coloreados.

Entre los más usados tenemos esencias o aceite de clavo, de cedro, o de orégano, xilol y creosota.

5.3 REACTIVOS OPACANTES:

Los reactivos opacantes actúan de modo contrario a los

reactivos aclarantes, oscureciendo el contorno celular y robando transparencia a la preparación. Este efecto es útil cuando se observan células sueltas, filamentos libres y superficies que exhiben expansiones delicadas.

Entre estos agentes tenemos el aire, alcohol, éter, agua corriente.

5.4 REACTIVOS AISLADORES:

Estos reactivos actúan liberando los elementos celulares de los tejidos o, al menos, facilitando su disociación mecánica.

Los más usados son el ácido nítrico al 25%, potasa al 40%, alcohol al 30%, ácido sulfúrico diluido, ácido pícrico a saturación, etc.

5.5 REACTIVOS ABLANDANTES:

Estos reactivos se usan para reblandecer los tejidos excesivamente duros, como hueso y dientes, en virtud de que disuelven las sales de calcio.

Entre estos reactivos los más usados son los ácidos nítrico, tricloraceticocrómico, clorhídrico y pícrico, todos

en soluciones más o menos diluidas, con excepción del pfcrico, que se emplea a saturación.

5.6 REACTIVOS INOFENSIVOS:

Los reactivos inofensivos, también llamados soluciones o sueros fisiológicos, son aquellos líquidos que alteran poco o nada la forma y vitalidad de los elementos celulares, y con este fin se utilizan durante el examen en vivo de humores y tejidos.

Entre estos líquidos los más usados son soluciones salinas, como líquido de Ringer, de Locke, de Bizozero, etc., o simplemente cloruro de sodio 0.9 g. disuelto en 100 cc. de agua destilada. Son también ventajosas las soluciones naturales, como el humor acuoso, y sobre todo el plasma sanguíneo no coagulado.

5.7 REACTIVOS COLORANTES:

Los reactivos colorantes son sustancias que permiten distinguir detalles estructuralmente invisibles, o poco aparentes al microscopio, por su capacidad de fijarse en ciertas partes de los tejidos con matices de variada intensidad. Estas sustancias son de dos tipos generales:

a) Colorantes naturales, extraídos de productos anima-

les o vegetales, como el carmín, la hematoxilina, la orceína y la safranina.

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

Aquí podemos anotar también los reactivos impregnadores, que tienen la propiedad de teñir selectivamente, pero a condición de sufrir en presencia del tejido una descomposición. Las sustancias que actúan así con el ácido ósmico, el nitrato de plata amoniacal, el cloruro de oro y el bicromato de potasio puesto en presencia de sales de plata o de mercurio.

5.8 REACTIVOS CONSERVADORES:

Los reactivos conservadores son aquellos que protegen a los tejidos de la putrefacción, conservan el color y evitan cambios que pudieran sufrir las preparaciones histológicas.

Estos reactivos algunas veces eliminan el agua del preparado, evitando todo crecimiento bacteriano, otras veces sustituyen el agua por materias resinosas imputrecibles.

Entre estos conservadores tenemos a la glicerina, bál-

samo de Canadá, resinas sintéticas, gelatina, licor de Apathy y licor de Ferrant.

CAPITULO VI
MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Se denomina método o técnica histológica al conjunto de operaciones destinadas a demostrar la disposición estructural de los tejidos. Cada método incluye una serie de actos técnicos para determinar cada particularidad de una estructura dada.

Como es sabido, estos métodos son muy numerosos, pero para los fines de este trabajo vamos a reducirlos a dos grupos generales:

- a) Métodos para el examen en vivo.- El examen de los elementos vivos puede efectuarse, bien en líquidos orgánicos, en tejidos dissociables, y en membranas transparentes, manteniéndose en un reactivo inofensivo, o bien, mediante el método de los cultivos celulares.

- b) Métodos para el examen de tejidos privados de vitalidad.- La dificultad de ver directamente con el microscopio la arquitectura natural de la mayoría de los tejidos, por su grosor y capacidad, y sobre todo por la rápida descomposición que experimentan, ha dado lugar a una serie de operaciones indispensa

bles para evidenciar la estructura tisular y conservar la durante mucho tiempo en preparaciones fijas, las que son muy útiles en todos los campos de la Biología.

La serie de maniobras para el examen de tejidos privados de vitalidad incluye, en términos generales, fijación, corte, coloración y conservación.

En este trabajo solo se tratarán los métodos para el examen de los tejidos privados de vitalidad, dado que el examen de los tejidos vivos, sobre todo el método de los cultivos celulares, se ha convertido en un campo muy especializado, cuya exposición reclamaría una mayor extensión.

F I J A C I O N :

Con el advenimiento del microscopio y su empleo en el campo de la Biología se abrió un amplio panorama para el estudio de la investigación y trajo conjuntamente, una serie de problemas de difícil solución. Al principio los objetos observados eran extraordinariamente limitados, como gotas de agua, hojas, animales pequeños, etc.; ésto dió lugar a la iniciación de cortes en los tejidos. Inicialmente estos se efectuaron con navajas y a mano, y los primeros estudios corresponden a Robert Hooke en el corcho, material que se

sabe es producto de secreción celular, por naturaleza duro, y no sufre el fenómeno de putrefacción.

Cuando se trataba de hacer estudios con cortes de tejidos, animales o vegetales, se apreció que en poco tiempo sufrían fenómenos de destrucción. Esta dificultad abrió las puertas a lo que se conoce actualmente con el nombre de fijación tisular.

La fijación tiene como principales finalidades el evitar la putrefacción y la autólisis, ya que son la causa de las rápidas modificaciones que experimentan las células al morir.

En la autólisis hay que evitar la acción de las enzimas celulares, ya que cuando cesa la actividad viva de la célula, en vez de ayudar al proceso de síntesis protoplásmica actúan de manera inversa. Hay que evitar también el crecimiento de bacterias que destruyen los tejidos, dando lugar al fenómeno de putrefacción.

Para evitar ésto es preciso someter a los tejidos a la acción de sustancias que detengan o reduzcan al mínimo, estas alteraciones. Esto se consigue con reactivos que solidifiquen, por coagulación o precipitación, las sustancias proteicas celulares; al mismo tiempo, esta acción endurece los

tejidos, dándoles una consistencia adecuada para su tratamiento posterior.

Una fijación ideal sería aquella que conservara a la célula en un estado idéntico al estado vivo, sin alteración de la integridad de sus caracteres morfológicos, sin dar lugar a que aparezcan, artificialmente, nuevos detalles estructurales. Esta fijación exacta no puede llevarse a cabo con los procedimientos actuales; la acción pronta y enérgica de un reactivo fijador impide, hasta cierto punto, las alteraciones post-mortem, pero también modifica más o menos la estructura celular.

6.1 CUALIDADES DE LOS FIJADORES:

La primera cualidad de un buen fijador es la potencia de penetración en los tejidos, de tal manera que el líquido pueda fijar tanto las capas superficiales como las zonas profundas.

El fijador debe producir una coagulación total de las proteínas, pero no es necesaria que ésta sea instantánea.

La rapidez de acción de un fijador debe ser con el objeto de matar lo más rápidamente posible a las células, la coagulación total, por el contrario, debe producirse secun-

dariamente, a modo de no producir contracciones y encogimientos. Finalmente anotemos que un buen fijador no debe arrugar ni encoger los tejidos, no los debe ennegrecer, ni dejarlos quebradizos o frágiles, y debe dejarlos aptos para ser teñidos selectivamente.

6.2 CARACTERISTICAS DE LOS FIJADORES.

El fijador, da la dureza suficiente para permitir una resistencia a todas las manipulaciones siguientes de los tejidos sin deformarse, el endurecimiento es una operación distinta a la fijación; la mayor parte de los fijadores actuales endurecen suficientemente a los tejidos, pero lo opuesto no es verdad; no todos los líquidos endurecedores son buenos fijadores.

La fijación debe producir, al mismo tiempo, la insolubilidad de los elementos constitutivos de células y tejidos. Es necesario evitar que las estructuras conservadas por el fijador sean destruidas posteriormente por la acción de los líquidos de lavado o las soluciones colorantes; esta estabilidad varía según los fijadores.

De las diversas reacciones entre el fijador y el tejido, resultan también verdaderas diferencias ópticas, con modificaciones más o menos grandes en la refringencia de los

distintos componentes celulares, resultando detalles invisibles en el estado vivo, determinado, según el reactivo, el mayor o menor éxito en la interpretación.

6.3 ACCION DEL FIJADOR SOBRE LOS TEJIDOS:

La manera de actuar de los fijadores, sobre los componentes tisulares, es muy variable y depende de cada fijador en particular; algunos de ellos tienen acciones similares.

El efecto que los fijadores tienen sobre los tejidos vamos a analizarlo basándonos en el formol al 10%, pues es el fijador más ampliamente usado.

Las reacciones del fijador con las proteínas tisulares son numerosas y complejas, ya que pueden combinarse con una variedad de grupos diferentes, formando en muchos casos puentes de unión entre ellos, a esta acción de formar enlaces entre cadenas proteínicas adyacentes, debe el formol su éxito como fijador.

El formol afecta principalmente a los grupos amino, imino, amido, reptido, guanidilo; hidroxilo, carboxilo, sulfidrilo y anillos aromáticos.

Muchas de estas reacciones son reversibles, algunas su

mamente lábiles y un cierto número de reacciones irreversibles.

Lo importante de estas observaciones para la histología, es que después del tratamiento con formol, seguido de lavado, la mayoría de los grupos activos quedan en condiciones para reaccionar con los reactivos empleados posteriormente.

6.4 DESVENTAJAS DE LOS METODOS DE FIJACION:

Los métodos de fijación, desde el punto de vista histológico, tienen numerosas objeciones, siendo las principales:

- Pérdida de sustancias solubles, por ejemplo, lípidos en fijadores disolventes de grasas y proteínas, polisacáridos y materiales inorgánicos en fijadores acuosos.
- Desplazamiento de algunos constituyentes celulares por difusión, dando artefactos de arrastre, por ejemplo: agregación de pequeñas partículas y artefactos de fijación, por ejemplo: apilotamiento de ácidos nucleicos en el núcleo.

- Desnaturalización de proteínas con alteración de sus propiedades físicas.
- Alteración química de los grupos reactivos de proteínas, y
- Desnutrición de enzimas.

En la mayoría de los casos es el formol el fijador al que menos objeciones pueda oponérsele. Desde el punto de vista histológico, la única objeción importante es que da una deficiente imagen nuclear, especialmente en tejidos que tienen una cantidad grande de células.

6.5 AGENTES FIJADORES:

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

- Acidos Minerales:

Acido Crómico.- Solo tiene acción fijadora en soluciones muy diluidas, 0.1 a 1%, ya que en soluciones concentradas es un disociador muy poderoso. Fija bien los núcleos. Es rara vez usado.

Acido Osmico.- Debe ser llamado tetróxido de osmio ($O_5 O_4$), ya que el ácido ósmico ($H_2 O_5 O_4$) no se usa en fijación. Se usa en solución acuosa al 1%. Mata rápidamente las células y fija bien el citoplasma y el condrioma, pero no el núcleo. Impide una buena diferenciación óptica. En estado de vapor es un fijador excelente solo para piezas muy delgadas y pequeñas, como protozoarios y frotis.

- Sales Metálicas:

Bicromato de Potasio.- Las soluciones al 3 o 4% endurecen perfectamente los centros nerviosos. Fija bien el citoplasma pero altera el núcleo.

Bicloruro de Mercurio.- Se usa disuelto a saturación en agua destilada o en una solución de cloruro de sodio al 0.5% es un fijador de primer orden pero es necesario eliminarlo por completo de los tejidos, cuando la fijación termine, para evitar la formación de cristales.

Cloruro de Platino.- Se utiliza al 1.300 en solución alcohólica o acuosa. Conserva bien el núcleo pero altera el citoplasma.

- Acidos Orgánicos:

Los ácidos orgánicos tales como el pícrico, acético,

tricloracético, entran en gran número de mezclas fijadoras, pero aisladamente se utilizan cada vez menos.

- Reductores Orgánicos:

Alcohol Etilico.- La concentración mínima para fijación es de 80%, en otras concentraciones la acción deshidratante impide la acción fijadora. Es poco penetrante, endurece mucho los tejidos, disuelve las grasas, fija mal el núcleo; por lo tanto es un pobre fijador que se usa sobre todo para la demostración de carbohidratos.

Alcohol Metílico.- Se usa puro, es muy importante en la técnica de frotis desecados.

Acetona.- Se usa pura, no se considera un buen fijador pues causa en los tejidos contracciones considerables. Su principal ventaja consiste en que no disuelve el ácido úrico ni el glicógeno y conserva algunas grasas a condición de que su acción no sea prolongada.

Formol.- Proviene del formaldehído que es un gas, cuya solución acuosa es la que recibe el nombre de formol; se considera formol puro la solución comercial al 40%. Es universalmente usado porque fija bien, endurece suficiente y conserva las grasas y lípidos; se usa en soluciones acu-

sas que varían de 3 al 25%, al 10% es la solución más empleada pues da excelentes resultados. Con el tiempo se polimeriza empobreciéndose y haciéndose nocivo para la fijación por la formación de ácido fórmico que siempre está presente en cantidades más o menos considerables en el formol comercial y a menudo conviene neutralizarlo.

6.6 MEZCLAS FIJADORAS:

Podemos decir en general que ninguno de los agentes fijadores es capaz de reunir por sí sólo todas las cualidades que debe tener un buen fijador. En la actualidad es muy común utilizar mezclas fijadoras combinadas de tal manera que completen la acción de un fijador con otro, balanceando las acciones nocivas, de esta forma los diferentes elementos de los tejidos y células pueden ser conservados lo mejor posible.

Las mezclas fijadoras llevan habitualmente el nombre de la persona que las descubrió o las utilizó por primera vez. A continuación mencionaremos algunas de estas mezclas separadas por grupos caracterizados por el elemento más activo.

- Mezclas Fijadoras a base de Cromo en forma de Acido Crómico o Bicromato:

- Mezcla de Orth o Muller/formol. Buen fijador general, útil para glicógeno y grasa.
- Mezcla de Zenker (1894). 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.

Mezclas Fijadoras a base de Acido Osmico:

- Mezcla de Flemming (cromo-aceto-ósmico). Bueno para figuras mitóticas.
- Mezcla de Chumpey (1909). Bueno para detalles citológicos.
- Mezcla de Altman. Buen fijador general.

Mezclas Fijadoras a base de Sublimados Corrosivos:

- Sublimado alcohólico de Shaudim (1889). Bueno para protozoarios.
- Mezcla de Gilson (1897). Bueno para invertebrados.

Mezclas Fijadoras a base de Acido Pícrico:

-Picroformol de Bovin (1897). Recomendado para uso común y cotidiano, excelente para conservar glucógeno.

-Mezcla de Duboscq-Brasil. Buen fijador general.

Mezclas Fijadoras a base de Formol:

-Formol bromuro de Cajal. Excelente para tejido conectivo y neuroglia.

Mezclas fijadoras a base de Alcohol:

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

-Alcohol-Formol. Bueno para Tejido Nervioso.

6.7 SELECCION DEL FIJADOR:

Es importante mencionar que cuando una persona se inicia en el manejo de las técnicas, desorientada ante tantas fórmulas, es conveniente que se decida por el empleo de un fijador general aconsejado en todo tratado de técnicas histológicas, por ejemplo: Formol al 10% simple o salino, Bovin, Zenker-Formol, Orth, etc.

Se debe comprender que estas indicaciones son de carácter general, en realidad es necesario para cada caso particular escoger un fijador lo más apropiado posible, tomando en cuenta al tejido, los detalles que se quieran resaltar y la coloración que se va a utilizar.

6.8 MODO DE EMPLEO DEL FIJADOR:

Después de haber elegido el fijador se debe determinar la manera de emplearlo para obtener los mejores resultados; se propone seguir las siguientes indicaciones:

F1) Para extraer los tejidos que se van a fijar se recomienda que el animal sea descerebrado o bien muerto en el momento de hacer la disección, efectuando todas las maniobras lo más rápidamente posible para evitar las alteraciones post-mortem. También es esencial extraer los órganos sin que sufran traumatismos, separándolos cuidadosamente por sus adherencias conectivas.

F2) Una vez extraídos los órganos se obtienen las piezas que van a ser fijadas, éstas se denominan fragmentos de platina y para hacerlos se toma en cuenta la forma y consistencia del órgano.

Los órganos parenquimatosos como las glándulas, hígado

bazo, riñón, etc., se cortan en fragmentos cuyo volumen - - aproximado debe ser de 1 cc. es conveniente hacer estos cortes en forma de pirámide del centro hacia afuera del órgano.

Para asegurar la correcta fijación y corte de las piezas, puede hacerse un segundo movimiento en el fijador, para hacerlo se requiere elaborar cortes más pequeños y definitivos al cabo de dos horas de fijación, aprovechando el endurecimiento parcial que han sufrido los órganos; se obtienen así piezas muy regulares y convenientemente orientadas, lo cual es difícil lograr en los órganos frescos que son muy blandos, en seguida, se colocan los cortes en el nuevo fijador, favoreciéndose así la pronta penetración de éste. Por precaución debe agitarse los fragmentos mientras se están fijando para que no se adhieran a las paredes del frasco, sobre todo para órganos muy irrigados.

Los órganos tubulares se cortan en secciones transversales entre 0.5 y 2.0 centímetros de largo aproximadamente. Puede seguirse el segundo movimiento descrito anteriormente.

Para trabajos más específicos es necesario tomar en cuenta que la mayoría de los órganos tubulares se contraen, y es necesario que se les fije en extensión para evitar que las capas musculares se contraigan irregularmente deformando la superficie interior. Esto se puede lograr ligando el

tubo en uno de sus extremos e inyectando por el otro el fijador suficiente para distender moderadamente la cavidad, ligando luego este otro extremo.

Para membranas y órganos delgados en general, se colocan las piezas en papel filtro de poro cerrado o cualquier otra superficie plana a la que se adhieren, se pueden cubrir con otro papel o algodón para evitar que floten; de esta manera conservan su estructura plana a través de la fijación.

Para órganos esponjosos como los pulmones se recomienda endurecer por una o dos horas en el fijador secciones más o menos voluminosas, aproximadamente 2 cc. y posteriormente se cortan piezas rectangulares de menor volumen y se sumergen en nuevo fijador. Un algodón colocado sobre el fragmento evita que éste flote. En general es aconsejable que los fragmentos de platina no excedan de un centímetro cúbico, excepto para piezas muy delgadas cuyo tamaño puede variar; con esto se logra una adecuada fijación en la mayoría de los fijadores.

F3) Es esencial que la composición de fijador permanezca lo más constante posible, a pesar de las acciones osmóticas y químicas ejercidas por las piezas que se están fijando, es necesario por tanto emplear un volumen de fijador muy gran-

de en relación al volumen de la pieza a fijar. La proporción suele ser de 50:1, pero puede disminuir de acuerdo al fijador; para el formol al 10% es suficiente una proporción de 10:1.

Para facilitar la penetración del fijador es necesario que el órgano se encuentre en suspensión en el líquido, esto se puede lograr suspendiendo las piezas en una bolsa de gasa.

F4) La duración de la fijación depende de cada fijador y de cada tejido y que especifica en cada técnica que aquí describimos, sólo hay que mencionar que de la duración adecuada en el fijador depende en cierta medida el éxito de los resultados.

F5) El lavado después de la fijación es una operación de gran importancia, ya que es necesario eliminar lo más posible las sustancias fijadoras, para que no interfieran con los reactivos empleados posteriormente. El disolvente empleado para el lavado, así como su tiempo de acción depende del fijador y la técnica que se vaya a seguir. Una vez lavadas las piezas debe continuarse el procesamiento inmediatamente.

CAPITULO VII

C O R T E S.

El método de los cortes consiste en una serie de maniobras destinadas a conseguir secciones delgadas de los órganos y tejidos. La mayoría de los tejidos pueden estudiarse suficientemente gracias a este método en adición a los métodos de fijación y colocación, usando las variantes más útiles según el detalle estructural que se desee resaltar.

Casi todos los tejidos son más o menos blandos, pero existen, aunque pocos, ciertos tejidos excesivamente duros, en vista de esto hay que distinguir dos casos en cuanto a las maniobras necesarias para la obtención de secciones finas:

7.1 CORTES EN TEJIDOS BLANDOS:

Como ya dijimos, los procedimientos de fijación aumentan la dureza de los tejidos blandos, pero no les proporcionan la consistencia adecuada para ser seccionados finamente; esto se consigue sin dificultad por medio de los procedimientos de congelación y de inclusión en parafina.

7.2 PROCEDIMIENTO DE CONGELACION:

Esta maniobra se efectúa mediante el microtomo de congelación descrito anteriormente, y la congelación se logra por la evaporación de anhídrido carbónico líquido dispuesto en este aparato.

Antes de efectuar los cortes es necesario en la mayoría de los casos realizar la fijación de las piezas, ya que sin ella, muchas de las materias que integran los tejidos se mantienen en estado semisólido, disgregándose los cortes al descongelarlos.

Se suele emplear como fijador el formol al 10%, y el tiempo de fijación depende del tamaño del fragmento y varía desde unos minutos cuando se usan vapores, hasta varios días, cuando se usan líquidos.

Es conveniente en todos los casos el lavado acuoso abundante para quitar el exceso de fijador.

7.3 CORTES POR CONGELACION:

C1).- Se coloca una pequeña porción del órgano, de aproximadamente 0.5 cc. en la platina del microtomo de congelación, sobre un trozo de papel fil

tro humedecido.

C2).- Se enfría suficientemente con anhídrido carbónico de manera que el tejido quede congelado hasta la parte superior, esto se hace abriendo a intervalos breves la llave de salida del gas.

C3).- Logrando esto, la pieza ha adquirido suficiente dureza para poder cortar secciones finas con la cuchilla del microtomo. Es indispensable vigilar el punto de congelación para cada órgano, ya que si el bloque no está suficientemente congelado, o la congelación ha sido excesiva, los cortes se destruyen. Con un poco de práctica se llega pronto al punto debido para cada órgano, obteniéndose entonces, rápidamente, buen número de cortes.

C4).- Las secciones se recogen con un pincel y se colocan en un recipiente con agua destilada, donde se extienden y se conservan hasta ser observadas o teñidas. Si la tinción no se efectúa el mismo día que se hicieron los cortes, se le agrega al agua un poco de formol, el cual se quitará mediante un lavado previo, antes de la tinción.

La congelación es ampliamente usada en las técnicas -

histológicas por su rapidez y economía, y se recomienda ampliamente para las técnicas argentícas.

CAPITULO VIII

PROCEDIMIENTO DE INCLUSION EN PARAFINA

Casi todos los tejidos pueden ser cortados mediante su inclusión en sustancias especiales, obteniéndose en general cortes más finos que con la congelación. Este procedimiento es parcialmente útil para tejidos no excesivamente duros, y no se debe usar en piezas que hayan sufrido la acción de endurecedores energéticos, ni en tejidos que tengan estructura muy laxa.

Las operaciones necesarias para este procedimiento son: fijación, lavado, deshidratación, inclusión y corte.

FIJACION.

Se lleva a cabo mediante cualquier fijador, según se requiera.

LAVADO.

Después de la fijación es casi siempre necesario el lavado en el disolvente adecuado, según el fijador; en muchos casos se utiliza el lavado abundante en agua de la llave, con tiempo variable de acuerdo al fijador.

DESHIDRATACION.

Los disolventes de las sustancias empleadas en la in--

clusión como son el éter, cloroformo, xilol, etc., no se mezclan con el agua, por lo que es preciso una perfecta deshidratación de la pieza con alcoholes graduales, hasta absolutos, para que la sustancia de inclusión penetre bien en los tejidos.

INCLUSIÓN.

Es la operación mediante la cual se hace penetrar en la pieza deshidratada una materia solidificable que tiene a lo más la consistencia del tejido y facilita la ejecución de cortes finos. Se han utilizado muchas sustancias con este fin, pero en la actualidad se emplea ordinariamente la parafina, dejando para casos especiales la inclusión en otros materiales como gelatina y celoidina, o abandonándolos definitivamente, como sucede con las inclusiones en albúmina, agar-agar, jabón, goma, etc.

A continuación solo se describirá el método de inclusión en parafina por ser éste el de uso más general.

8.1 INCLUSIÓN EN PARAFINA.

P1).- Fijar en formol al 10% por 24 horas, como mínimo o bien en cualquier otro fijador.

P2).- Lavar en agua corriente de 15 a 30 minutos, como

mínimo.

P3).- Deshidratar con alcoholes de concentración ascendente, de 30, 50, 70, 80, 96 grados, y absoluto, de 30 minutos a una hora en cada alcohol, con el fin de suprimir el agua tisular, ya que la parafina no es soluble en agua.

P4).- Aclarar en xilol, de 30 minutos a una hora.

P5).- Transparentar en aceite de cedro, de 12 a 24 horas, o hasta que las piezas adquieran un color ámbar.

P6).- Colocar en xilol durante 15 minutos antes de incluir. Los pasos 4, 5 y 6 son con el objeto de facilitar la penetración de parafina en la trama del tejido, aprovechando al mismo tiempo que estos reactivos tienen poder como aclarantes.

P7).- Incluir en parafina. Para esto se sumerge la pieza en parafina fundida, cuyo punto de fusión se selecciona de acuerdo al órgano, en general se recomienda entre 54° -- 56° y 56° - 58°; se hacen dos cambios, de 30 minutos a una hora cada uno, de preferencia el primero en una parafina de menor punto de fusión y el segundo en una parafina con un punto de fusión ligeramente mayor, en cajitas metálicas, de plástico o de papel, se coloca parafina fundida y limpia,

de punto de fusión igual al del segundo cambio; se deja formar una capa superficial sólida de parafina, la cual se licúa pasando una aguja de disección caliente, en este momento se introduce el fragmento y se orienta de acuerdo a la forma en que se va a cortar. Cuando ha solidificado una nueva capa superficial, se rodea la pieza con una aguja de disección caliente, con el objeto de sacar las burbujas que se hayan formado al introducir el fragmento. Finalmente, se deja solidificar completamente sin mover, en un recipiente con agua fría, ya que es preferible que sea un enfriamiento repentino para que la parafina solidifique en cristales pequeños; una solidificación lenta de cristales gruesos que pueden estropear los elementos tisulares. Es importante indicar sobre la cajita de inclusión la orientación del fragmento, con el objeto de no perder el sentido del corte.

Es importante hacer notar que los pasos previos a la inclusión son muy variables, ya que son múltiples los reactivos que pueden ser usados, sobre todo los fijadores y disolventes de la parafina. Según esto, cada autor nos presenta una secuencia que varía en reactivo y tiempos, de acuerdo a sus experiencias personales; en la mayoría de los casos los resultados que se obtienen son buenos. Por la misma razón el procedimiento que aquí se menciona se considera adecuado, según nuestra experiencia.

Cortes por Parafina:

Ya solidificada, la parafina, se delimita el bloque con una navaja, dándole forma de pirámide truncada, sin lesionar el órgano y quitando todo el exceso de parafina. La base de la pirámide se adhiere por calor a la platina del microtomo, siendo el ápice truncado la superficie que se va a cortar; el filo de la navaja deberá estar paralelo a dicha superficie.

Los cortes se harán de un grosor entre 3 y 10 micras y saldrán en serie. Los cortes se pueden guardar en serie, numerando las tiras en orden progresivo, sobre hojas de papel preservados del viento y del polvo hasta el momento de ser utilizados. Se aconseja cortar solamente aquéllos que puedan ser montados inmediatamente para evitar que se estropeen las series. Los cortes que se van a utilizar se colocan en un baño de flotación a 37°C con gelatina previamente disuelta para que se extiendan y se adhieran al portaobjetos con el cual se recogen de modo que queden centrados. Se dejan secar durante 24 horas a la temperatura ambiente, o se secan en una parrilla o estufa a 37°C, durante 12 horas.

Desparafinación e hidratación de los cortes:

Para teñir los cortes es indispensable desparafinarlos e hidratarlos para lo cual se pasan a xilol y a cambios de alcohol, en concentración descendente de la siguiente manera:

- a) Colocar en tres cambios sucesivos de xilol de 5 a 10 minutos cada uno. El xilol que se emplea para desparafinar puede volverse a emplear, siempre y cuando se filtre.
- b) Colocar en alcoholes de 100°, 96°, 80°, 70° y 50° por 5 minutos en cada uno. La mayoría de los colorantes actúan en medio acuoso, por lo que es necesario hidratar los cortes cuando éstos se han hecho por inclusión en parafina.
- c) Colocar en agua destilada. En este punto los cortes están listos para ser teñidos.

Cortes en Tejidos Duros:

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

Procedimiento de Tallado:

Este procedimiento puede resumirse en los siguientes

pasos:

T1).- Hacer con una sierra de diente fino, un corte grueso, transversal o longitudinal de la pieza.

T2).- Sobre una lija de grano medio se desbasta el corte por ambas caras hasta alcanzar aproximadamente medio milímetro de espesor.

T3).- El corte se lleva a una piedra de asentar o lija de agua humedecida con alcohol o agua y se adelgaza y pule hasta quedar lo más transparente posible.

T4).- La sección obtenida se lava con alcohol o xilol para eliminar el polvillo que queda en los conductos. Si se desea aclarar se deja xilol limpio durante 24 horas.

Estas secciones pueden ser teñidas con anilina.

T5).- Ya sean aclarados o no teñidas o no estas secciones, adelgazadas y lavadas, se montan en bálsamo de Canadá, o resina.

CAPITULO IX

METODOS GENERALES DE TINCION.9.1 COLORACIONES:

Hemos establecido que los diversos elementos de los te jidos poseen en su mayoría, un índice de refracción casi igual, de modo que su diferenciación óptica es difícil. Por otra parte, es de todos conocido el hecho de que las imágenes que dan las preparaciones coloreadas son más fáciles de interpretar que las imágenes dadas por las preparaciones in coloras. Estos dos argumentos nos revelan la importancia que tienen en la técnica histológica las coloraciones para el estudio morfológico de células y tejidos.

Es importante aclarar que, tanto en la antigüedad como en la actualidad, se han hecho admirables descubrimientos sin la ayuda de los colorantes. A este respecto, podemos decir que reconocemos la importancia de las observaciones en estado fresco y sin tinción; tampoco olvidamos que la facilidad con que se llega a diferenciar muchas estructuras, por medio de colorantes, presenta al observador el peligro de interpretar erróneamente los cortes. No está por demás decir que las coloraciones no son lo más importante en la histología, y que el papel del histólogo no consiste en ser un buen teñidor, sino más bien, en saber observar y obtener

de sus observaciones una correcta interpretación. Vamos a ver ahora qué se entiende por coloración.

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 aquéllas que absorbe.

Un colorante es un cuerpo coloreado que puede comunicar su coloración a otros cuerpos.

Se sabe que existe una relación entre la constitución de las sustancias y la absorción selectiva de radiaciones que produce el color; cualquier configuración de la molécula que produce absorción de la luz se denomina badocrómica, y al grupo en general se denomina cromoforo. Todas las teorías que tratan de explicar la constitución de los cromoforos admiten en general, que existe una relación entre el color resultante y la falta de saturación de los átomos que constituyen la sustancia, lo que explica la gran avidez que tiene a los colorantes por el hidrógeno.

Son grupos cromoforos los que contienen en su molécula dobles ligaduras conjugadas, sin embargo, esta característica no hace coloreadas a las sustancias, por lo menos en la

región visible del espectro, pero la acumulación de dobles ligaduras en un sitio, sobre todo cuando están conjugadas hacen aparecer el color.

Las sustancias que encierran en su molécula grupos cromoforos se denominan cromógenos. El cromógeno, a pesar de ser un cuerpo coloreado no puede considerarse como elemento de tinción si no posee afinidad por los tejidos. Para que un colorante se considere apto para la tinción debe contener además del grupo cromoforo, otro que le imparta propiedades de electrolito, es decir, que tenga posibilidades de ionizarse; a estos grupos auxiliares se les denomina genéricamente auxocromos.

Los auxocromos son también agrupamientos no saturados y que no son cromoforos, pero que pueden al ser introducidos en la molécula de un cromógeno, modificar su espectro de absorción, es decir, su coloración. Los auxocromos por tanto exaltan la coloración y confieren generalmente el poder tintóreo. Los auxocromos pueden ser ácidos, es decir, electronegativos caracterizados por la presencia del oxígeno, o pueden ser básicos o electropositivos, caracterizados por la presencia del nitrógeno.

Así la clasificación de los colorantes desde el punto de vista químico estará dado por los grupos cromoforos, los

cuales se dividen en dos grandes grupos: los ácidos y los básicos.

9.2 NATURALEZA DE LAS COLORACIONES:

Existen muchas teorías para explicar porqué los tejidos se tiñen; cualquiera que sea la teoría que se adopte, en la práctica existen dos tipos de colorantes, unos que se unen directamente a los tejidos y otros que necesitan intermediarios, es decir que se unen indirectamente.

Las coloraciones directas son aquéllas 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 que lo prepara para recibir el colorante a esta sustancia intermedia se le llama mordente; también se les llaman coloraciones adjetivas o por mordaza. La combinación que el mordente forma con el colorante se denomina laca.

Se ha discutido mucho sobre la interpretación del fenómeno de las tinciones, sin llegarse a un acuerdo satisfactorio y que se aplique a todos los casos. Se admite generalmente que la penetración del colorante es por osmosis, y el principal problema se presenta al tratar de explicar cómo se fija el colorante a los tejidos.

La teoría física de A. Fisher y seguidores ve a las coloraciones como una fijación de los colorantes en los tejidos tiene lugar mediante una unión química entre el colorante y los elementos constituyentes del tejido, formándose una verdadera sal. Así ciertas partes de la célula que tienen carácter ácido, tendrán afinidad por los colorantes básicos, en tanto que las partes de carácter básico presentan afinidad por los colorantes ácidos.

Tanto la teoría física como la química tienen hechos en pro y en contra, por lo que actualmente se tiende más a considerar a las coloraciones como fenómenos muy complejos, en los cuales las acciones físicas y químicas son cinérgicas.

9.3 CLASIFICACION DE LOS COLORANTES:

Atendiendo a su origen los colorantes se clasifican en dos grupos: Los naturales y los artificiales.

El primer grupo tiene poca importancia en la actualidad porque la mayor parte de estos colorantes son preparados sintéticamente. El segundo grupo corresponde casi a la totalidad de los colorantes usados en la técnica microscópica.

Colorantes naturales.

Son extraídos de productos animales y vegetales, como el carmín (*Coccus cacti*), la hematoxilina (*Hematoxylon campechianum*), la orceína (*Rocella tinctoria*), el tornasol - - (*Chrozophora tinctoria*), etc.

Colorantes artificiales.

Son conocidos también como colorantes de anilina, de carbón o sintéticos. De acuerdo a la naturaleza de su cromóforo pueden ser: Colorantes nitrados, colorantes azoicos, oxiquinonas, quinona-oxinas, quinona-imidas, fenilmetanos, quinoleínas, acridinas, tiazoles, oxicetonas, xantonas y flavonas.

Ehrlich los ha dividido en dos grupos según sus afinidades para el núcleo y el citoplasma: Nucleares o básicos cuando el compuesto colorante es una base y citoplásmicos o ácidos cuando el compuesto colorante es un ácido.

Es muy raro que se empleen los ácidos o las bases libres, debido a su poca solubilidad. Los colorantes artificiales que se emplean son casi siempre 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 tetrametilioni

na, 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 cual es 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 picro de azul de metileno.

Michaels ha creado la categoría de los colorantes indiferentes, para aquéllos que no son ni ácidos ni básicos, y no poseen agrupamientos capaces de formar sales, son por ejemplo el sudan III y el rojo escarlata.

9.4 MÉTODOS DE COLORACION:

No todos los colorantes pueden servir indistintamente a la técnica histológica, por lo tanto se han dividido los métodos de coloración en las siguientes categorías de acuerdo a las relaciones entre el colorante y los tejidos.

9.5 COLORACIONES GENERALES Y ESPECIFICAS:

Las primeras se basan en el teñido intenso de los núcleos y débil del protoplasma o en la fuerte coloración de

ambas partes con colores distintos; ésto, aunado a las tonalidades que dan las sustancias intercelulares, permite tener una idea clara de conjunto, tanto para los tejidos como para órganos. Los segundos se aplican para estudiar particularidades histológicas, aprovechando la tinción selectiva y casi exclusiva de algunos colorantes sobre ciertas estructuras.

9.6 COLORACIONES DIRECTAS E INDIRECTAS:

Anteriormente ya se trataron estos dos métodos de coloración, solo añadiremos el papel y la naturaleza de los mordentes, en el caso de las coloraciones indirectas. Sabemos que los mordentes son cuerpos que sirven de intermediarios entre el colorante y el tejido, cuando éstos no tienen afinidad química entre sí. El mordente actúa formando en el tejido una combinación coloreada muy estable, e insoluble en el agua, y que resiste a los agentes decolorantes, aumentando además la selectividad del tejido por el colorante. Los mordentes pueden hacerse actuar directamente sobre los tejidos formando parte de los fijadores o mezclados al colorante. Los principales mordentes usados en la microtécnica son los alumbres de potasio y fierro, algunos ácidos oxidantes, como el crómico, ósmico, etc., cloruros metálicos, sales de yodo y oxidantes orgánicos, como el ácido pícrico.

9.7 COLORACIONES PROGRESIVAS Y REGRESIVAS:

Cuando el tejido adquiere, lenta y progresivamente, el grado de color necesario, sin exigir una operación posterior de desteñido, tiene lugar lo que se conoce como coloración progresiva; se usa sobre todo con los colorantes que dan coloraciones muy sólidas o difíciles de diferenciar, por ejemplo, el azul de metileno, azul de algodón, carmalum y hematoxilina. La coloración regresiva es aquella en la que el objeto sobrecoloreado, por la excesiva concentración del colorante, debe sufrir la acción de un disolvente apropiado; el disolvente cumple, en este caso, dos fines esenciales: Elimina el exceso de colorante y respeta el teñido, haciéndolo más evidente en ciertas partes del preparado, es decir, es un agente diferenciador.

Entre las sustancias diferenciadoras encontramos alcalis, como sosa y potasa, alcoholes etílico y metílico, ácidos, como el sulfúrico, clorhídrico, nítrico, acético, pírrico, etc., oxidantes, como el permanganato potásico, reductores como el ácido fórmico y el formol, sales metálicas como el alumbre de hierro, cloruro férrico, yoduro de potasio, etc., y metaloides como el yodo, bromo, etc.

Los colorantes que más se prestan para la diferenciación son los colorantes básicos, como la hematoxilina.

9.8 COLORACIONES SIMPLES Y COMBINADAS:

Las coloraciones simples son aquellas que se obtienen con un solo colorante, ácido o básico. Según su naturaleza con 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, químicamente definido y puro, es capaz de colorear varios constituyentes tisulares con marcadas diferencias, por ejemplo, el azul de toluidina tiñe muchos constituyentes celulares en azul, pero a la matriz del cartílago que presentan esta propiedad son llamados metacromáticos, y los elementos que hacen virar el color son llamados cromotropos. 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, pudiendo teñir de diversos colores varios constituyentes del tejido, por ejemplo, el verde de yodo; a este efecto se le llama alocromasia.

Como ejemplo de colorantes metacrómicos tenemos violeta

de metilo, azul de anilina, violeta de cresil, azul de cresil, azul de toluidina, rojo neutro, safranina, verde jano, etc.

Las coloraciones combinadas pueden ser practicadas haciendo actuar diversos colorantes, ya sea sucesiva o simultáneamente. En las coloraciones sucesivas cada colorante simple puede actuar independientemente y fijarse sobre un elemento dado, como en las coloraciones con hematoxilina-eosina. En las coloraciones, simultáneas cada elemento actúa generalmente por su cuenta, pero se ha visto que en presencia de ciertos líquidos dan automáticamente coloraciones triples o cuádruples imprevistas, y el resultado puede ser defectuoso e inconstante.

9.9 COLORACIONES PANOPTICAS:

No hay que confundir estas coloraciones con las combinadas, en las que actúan colorantes ácidos y básicos, en tanto que los agentes de coloración panóptica son colorantes neutros. El principio de las coloraciones panópticas es el de poner en evidencia el mayor número posible de elementos con una gran variedad de tonos. Este método tiene especial importancia en el estudio de los protozoarios y la sangre. Todos los colorantes sanguíneos son colorantes neutros y dan coloraciones panópticas. Los fenómenos de metacroma-

sia juegan un papel importante en las coloraciones panópticas, y contribuyen a distinguirlas de las coloraciones combinadas.

9.10 COLORACIONES EN BLOQUE:

Actualmente, casi siempre, los procedimientos de coloración son aplicados a cortes y solo a éstos pueden aplicarse ciertos métodos de coloración, como los regresivos, combinados y panópticos, no obstante, los tejidos pueden ser coloreados en bloque; este método, muy usado en otros tiempos, es aún utilizado, aunque poco, principalmente para el estudio de animales enteros. Las coloraciones en bloque son sobre todo directas, simples y progresivas, y deben ser aplicadas con colorantes muy penetrantes, prácticamente solo el carmín y la hematoxilina lo son; las anilinas están excluidas, porque no penetran suficientemente, sobrecolorando la parte superficial y no tiñendo las partes profundas. Este procedimiento es muy económico y permite montar los cortes inmediatamente, pero no se obtienen nunca coloraciones tan delicadas como la tinción sobre los cortes.

9.11 IMPREGNACIONES METALICAS:

La impregnación a base de sales metálicas, principalmente de plata, ha sido indispensable para el estudio del

sistema nervioso, y brinda preciosas imágenes de este tejido, debido a la distinta intensidad con que se deposita el coloide metálico. Algunas sales metálicas poseen la propiedad de precipitar selectivamente, sufriendo una descomposición en presencia del tejido; el precipitado impregnador se forma algunas veces por reducción, afectando el estado coloidal, como en la impregnación argéntica, áurea, etc., y otras se forman por doble descomposición en presencia del mordente, como sucede con el cromato de plata sobre piezas embebidas en bicromato de potasio.

El mecanismo de las impregnaciones argénticas aún no ha sido bien esclarecido, no obstante las numerosas investigaciones que se han venido realizando desde 1911.

Liese'gang en 1911, Owens y Bensley en 1929, Nageotte y Guyon en 1930, Zon en 1936 y Silver en 1947 sentaron las bases de este mecanismo, pero ninguna mostró evidencias inobjetables sobre el particular. Sin embargo, una combinación de los principios de estos científicos postularos ha permitido una explicación aceptable del mecanismo de las impregnaciones de plata:

- 1.- Cuando en una solución amortiguada de plata se sumergen los cortes de tejido, dos tipos de plata se depositan en ellos: Una fracción de plata reducida

por el tejido, probablemente como diminutas partículas metálicas o "núcleos" y una fracción de plata reducible que es reducida por una sustancia que actúa como desarrollador. Según Silver, diferentes desarrolladores producen diferentes efectos en el proceso de impregnación con una influencia controlada a causa de un desarrollador particular.

- 2.- La cantidad y distribución de los núcleos de plata y la plata reducible dependen de propiedades del tejido, el PH de la solución, la concentración de plata, el tiempo y la temperatura de incubación.
- 3.- Los núcleos de plata juegan un papel dinámico como centros catalíticos para la reducción de plata.
- 4.- Hay una compleja interrelación entre estos centros de la plata reducible, el desarrollador y los tejidos; todos juegan un papel fundamental en la impregnación final de la sección (Samuel, 1953).

En la actualidad existen muchos métodos en que se emplean sales metálicas de impregnación, algunos de estos métodos serán detallados en la sección de técnicas histológicas.

Conservación de las preparaciones:

Las preparaciones fijadas y teñidas pueden sufrir decoloraciones u otras alteraciones si no son protegidas adecuadamente.

Para la conservación de las preparaciones se utilizan resinas sintéticas o el bálsamo de Canadá. Se aplican generalmente disueltos en xilol, a modo de jarabe espeso. Antes de cubrir las preparaciones es preciso que los cortes estén perfectamente deshidratados y aclarados.

La deshidratación se hace, de preferencia, en varios cambios de alcohol de 96° o absoluto, o acetona, y para la aclaración se requiere de una esencia que puede ser de clavo, cedro, bergamota, orégano, creosota, xilol, etc.; después de algunos minutos de permanencia en esta esencia se escurren las preparaciones y se recoge el excedente con papel filtro.

No es indiferente la elección de la esencia, depende en gran parte del medio en el cual se hizo la inclusión pero sobre todo el método de tinción, por ejemplo, para las coloraciones con anilinas se utilizan esencias que no disuelven estos colores, como bergamota y xilol. La creosota o la esencia de clavo conviene usarlas con coloraciones só-

lidas, que no se destiñan con facilidad, por ejemplo colorantes naturales o impregnaciones argentícas.

Las preparaciones así tratadas están listas para ser cubiertas con el agente conservador, para lo cual se coloca una gota sobre un cubreobjetos limpio y se acerca al portaobjetos que contiene el corte, de manera que tomen contacto uno con otro, enseguida se adhieren y se deja que el conservador se extienda por todo el cubreobjetos; hay que procurar que el tamaño de la gota sea suficiente para llenar el cubreobjetos, sin que falte ni se derrame; se deja secar a la temperatura ambiente por varios días o en una estufa a 37°C por 24 horas.

Otros conservadores que pueden ser usados son la glicerina, gelatina glicerinada, resina sintética, licores de Ferrant y de Apathy, etc., pero el uso de estas sustancias tiende a ser abandonado, sin embargo, suelen ser utilizadas cuando se requieren vehículos de menor índice de refracción que el bálsamo de Canadá, por ejemplo la glicerina, que da preparados temporales, que sufre alteraciones, o bien cuando es necesario emplear sustancias en cuya composición no entren esencias y alcoholes, por ejemplo la glicerina, licor Ferrant, licor de Apathy y gelatina glicerinada.

CAPITULO X

ANTECEDENTES HISTORICOS.

El estudio de la estructura de los organismos es el objeto fundamental de las ciencias morfológicas, y constituye la parte más antigua y quizá la más extensa de la Biología.

El conocimiento empírico de las técnicas histológicas puede remontarse a los egipcios, como el embalsamiento de cadáveres y el uso de los fijadores como el alcohol etílico para la conservación de los tejidos; sin embargo, se puede decir que es desde el siglo XVI cuando se deja la dependencia escolástica antigua para ceder paso al método científico moderno.

Al principio, el estudio de las estructuras se hacía a simple vista luego de la disección con cuchillos comunes. El ejemplo más antiguo del empleo de colorantes en la anatomía macroscópica, importante para el desarrollo de los métodos microscópicos, es el relleno de los vasos con sustancias coloreadas, y al parecer fue BENGARIOS ó CAPRI (1502-1550) el primero que usó este procedimiento.

Sin embargo, pronto comenzaron a usarse lentes simples como auxiliares para distinguir detalles finos y texturas,-

que fueron publicados entre 1661 y 1666. ROBERTO HOOKE --- (1635 - 1703) hace los primeros cortes histológicos en el corcho, significativamente importantes por el descubrimiento de la célula, usando también lentes de aumento simples, y público en 1665 un libro denominado "MICROGRAPHIA" título que destaca la observación de estructuras diminutas.

De 1673 a 1716 LEEUWENHOEK perfeccionó las lentes compuestas que permitieron aumentos mucho mayores. Así, a principios del siglo XVIII, la morfología fue dividida en una parte microscópica y otra macroscópica. El advenimiento del microscopio abrió de esta manera el campo para el nacimiento de una multitud de disciplinas científicas, entre ellas la histología. Para facilitar sus exámenes microscópicos, el mismo LEEUWENHOEK en 1714 empleó una solución alcohólica de azafrán para teñir cortes de músculo; la desecación espontánea fue la primera forma de fijación, usada también por él en 1720.

El método de los cortes, primeramente empleado en Botánica, dió con el tiempo los mejores resultados; uno de los instrumentos más antiguos para este fin, el MICROTOMO, fue construido y descrito en 1770 por GEORGE ADAMS.

En la última parte del siglo XVIII FRANCOIS XAVIER BICHAT (1771 - 1802) utilizó el término "TEJIDO" para referir

se a las diversas texturas de las capas y estructuras del cuerpo, y sin la ayuda del microscopio hizo una clasificación de más de veinte variedades de tejidos; BICHAT no concedía valor al empleo del microscopio, argumentando que daba lugar a interpretaciones subjetivas. Con el paso del tiempo y el perfeccionamiento del microscopio se llegaron a determinar solo cuatro tipos básicos de tejidos; no obstante, por tan significativa aportación se puede considerar a BICHAT como el primer histólogo o fundador de la doctrina de los tejidos. En 1819, el anatomista MEYER DE BONN ideó el término "HISTOLOGIA" para designar a la ciencia que estudia los tejidos. Los microscopistas de entonces, utilizando especímenes frescos, desmenuzados o macerados, y cortes de tejidos realizados a mano, establecieron los rudimentos de la histología.

De 1800 a 1829 se hicieron investigaciones aisladas sobre la estructura morfológica, como opuesta a la estructura química, de los tejidos, en una tendencia de separar la Histología de la Histoquímica.

En 1838, CHRISTIAN GOTTFRIED EHRENBERG utiliza el carmín y el índigo en sus investigaciones sobre infusorios.

Aunque en los albores del siglo XIX ya se disponía de microscopios adecuados, las técnicas para preparar los teji

dos distaban de ser ideales. Como los especímenes gruesos no podían observarse con provecho en los potentes microscopios, se necesitaban métodos exactos capaces de proporcionar cortes delgados, sobre todo de tejidos animales no consistentes; éstos sólo fueron posibles después de aplicar la técnica de fijación mediante desecación, alcohol, sublimado y ácido crómico, introducida en 1832 por JACOBSON y en 1840 por HANNOVER. En este campo, fue el histólogo Suizo VALENTI NE quien, en 1839, empleó una doble cuchilla, cuyas hojas podían separarse a discreción, para hacer cortes sucesivos y más exactos de tejidos animales. El primer microtomo de ADAMS, construido por el mecánico OSCHATZ en 1843, para trabajos histológicos animales y vegetales.

En 1848, KRAUSE emplea el nitrato de plata para hacer visibles los contornos de las células epiteliales.

En 1852, KOLLIKER instituyó a la histología como un campo especial de estudio.

En 1860, DANIEL V. RECKLINGHAUSEN introduce la impregnación argéntica como método histológico de observación.

El verdadero éxito en la búsqueda de procedimientos útiles de tinción sólo se obtuvo en la segunda mitad del siglo XIX, al ser introducidos por BENCKE, en 1862 los colo

rantes de anilina para teñir preparaciones microscópicas. El nacimiento de las anilinas ocasionó una revolución en la práctica de la histología, por lo que la técnica histológica progresó a grandes pasos; simultáneamente se fueron desarrollando los procedimientos en el uso de los microtomos para la obtención de cortes, endureciendo adecuadamente los especímenes mediante congelación, inclusión en parafina, celandina, gelatina y otras sustancias semejantes, para evitar el desplazamiento de los componentes de los tejidos. A mediados del siglo XIX R. HEIDENHAIN utilizó por primera vez el método de inclusión, empleando solución de goma y dejándola secar antes de hacer los cortes; en 1864 EDWIN KLEBS usó en forma conveniente la parafina como medio de inclusión, técnica perfeccionada por PAUL MAYER (1848 - 1923).

En 1867, EDUARD SCHWARTZ introdujo a la técnica microscópica el doble teñido, utilizando el carminato de amonio y el ácido pícrico; más tarde CHRISTIAN GOTTFRIED EHRENBERG usó el polvo de indigo y el carmín para el estudio microscópico de organismos vivos. Las técnicas microscópicas se limitaron por muchos años, a pocos colorantes.

En 1869 fue introducida por EDWIN KLEBS la gelatina glicerínada como medio de inclusión, más tarde KAISER, en 1880, usó solamente la gelatina con endurecimiento posterior mediante un fijador.

El primer microtomo para hacer cortes de material congelado fue construido por el fisiólogo RUTHERFORD en el año 1871, usando mezclas frigoríficas o pulverización de éter. Más adelante, siguiendo el ejemplo de JOHNE, en 1897 se generalizó el empleo del ácido carbónico líquido.

Los medios de inclusión adecuados siguieron siendo objeto principal de búsqueda y en 1875 WALTER FLEMMING usó el jabón transparente y MATHIAS DUVAL recomendó el colodión; ambos fueron desplazados por la celoidina, introducida por PAUL SCHIEFFERDECKER en 1882.

El método de la coloración regresiva de preparaciones microscópicas, recomendado en 1875 por HERMANN, llegó a adquirir fundamental importancia pero solo después de que FLEMMING empleó en gran escala y con éxito dicho método, en sus estudios sobre núcleo, en 1881. La combinación de hematoxilina-eosina fue utilizada por CARL DAVID WILHEM BUSCH, en 1877, por RENALT en 1879 y por WILLIAM STIRLING en 1881; desde entonces se ha convertido en la técnica histológica más usada. La orceína, que es un colorante natural de origen vegetal obtenido de *Rocella tinctoria*, fue utilizada por primera vez por WEDL en 1878, y fue TAENZER, en 1891, quien descubrió su especial afinidad por el tejido elástico de 1879 a 1894, PAUL EHRLICH contribuye al desarrollo de la técnica de teñido por sus estudios acerca del empleo de los

colorantes de anilina en trabajos histológicos.

En 1885, CARL WEIGERT da a conocer su método perfeccionado de teñido con hematoxilina de la vaina medular. En 1886, PAUL EHRLICH descubrió la hematoxilina de la vaina medular. En 1886, PAUL EHRLICH descubrió la hematoxilina ácida, en 1885 se dió a conocer la hematoxilina de DELAFIELD, en 1892 fue publicado el modo de aplicación de la hematoxilina férrica de MARTIN HEIDENHAIN. Entre 1876 y 1891 fue postulada una teoría física para explicar el mecanismo de las tinciones, de la cual FISHER fue el pionero y WITT un seguidor de esta teoría, quien dió una explicación más amplia y la llamó "Teoría Quínónica".

Los adelantos en esta época se caracterizan por el repetido afán de mejorar más las aplicaciones de la técnica de teñido mediante nuevas combinaciones. Surgen las coloraciones triples o tricrómicas cuando en 1889 VAN GIESON utiliza triple coloración con hematoxilina, fucsina ácida y ácido pícrico.

RANVIER, ALTMAN, CALDWELL y MINOT tomaron parte en el perfeccionamiento de las técnicas de corte, con el resultado de que en 1892, con la introducción del microtomo rotatorio de MINOT, se pudieron preparar cortes de hasta un micrometro de espesor. Paralelamente, con el perfeccionamiento

de los microtomos fueron mejorándose las técnicas de inclusión y fijación. Entre 1889 y 1890, ALTMAN desarrolló su método de fijación mediante liofilización, disecación al vacío previa congelación a -20°C ; en 1892 TILLANT y en 1893 BLUM señalaron las propiedades del formol como fijador; estos procedimientos preservan los tejidos para su futuro estudio; y modificaban su consistencia de manera que los cortes podían prepararse más fácilmente.

Entre 1888 y 1902 un grupo de científicos, EHRLICH, KNESCHT, MIESCHER, MAYER, UNNA, etc., elaboraron una teoría química de las tinciones usando y combinando ampliamente los colorantes para destacar las diferentes estructuras de los tejidos.

De 1889 a 1929 se difundió ampliamente el empleo de los colorantes de anilina, se desarrollaron nuevos colorantes y técnicas de tinción; posteriormente, los amplios avances histoquímicos han sido aplicados a la histología, surgiendo gran cantidad de métodos histológicos, usados extensamente antes de ser aplicados.

De 1923 a 1929, WILHELM V. MOELLENDORFF lleva a cabo investigaciones para esclarecer la teoría del teñido histológico, y en 1924 establece una diferencia entre el teñido "por precipitación" y el teñido "por impregnación".

Actualmente la técnica histológica cuenta con contribuciones valiosísimas, de las que aquí es imposible hacer una reseña histórica, afortunadamente la mayoría de los modernos métodos histológicos llevan el nombre de su descubridor y/o su modificador, además de la fecha en que ésto ocurrió, de manera que contamos con un arsenal de información más ó menos precisa que permite tener noción clara de los avances científicos que de esta área se suceden.

TEJIDO EPITELIAL.

DEFINICION :

Es un tejido integrado por células contiguas con escasa sustancia intercelular que suele cubrir superficies internas y externas del organismo y además puede derivar de cualquiera de las tres hojas embrionarias, y que cumple con funciones de revestimiento o glandular (principalmente) o de revestimiento especializado, realizando trabajos sensoriales (como receptor de estímulos).

CLASIFICACION FUNCIONAL DE LOS EPITELIOS:

El tejido epitelial se clasifica de acuerdo a sus funciones más notorias:

- a) Epitelios de revestimiento.
- b) Epitelios glandulares.

EPITELIOS DE REVESTIMIENTO:

Los epitelios de revestimiento son los encargados de cubrir las superficies internas y externas del organismo. De acuerdo con la cantidad de capas de células que los integran se subclasifican en:

- a) Epitelios simples.
- b) Epitelios estratificados.

Los epitelios simples son aquéllos que en su constitución poseen un solo tipo de células dispuestas en una sola hilera. Se clasifican según la forma de sus células en tres tipos diferentes: Planos, cilíndricos y cúbicos.

Los epitelios planos se encuentran solo en lugares en que se hallan muy protegidos de la abrasión y erosión que podría descamarlos, ya que son delgados al extremo. Los epitelios planos pueden cubrir cavidades abiertas o cerradas, como los endotelios vasculares. También, pueden estar sin tapizar ninguna cavidad.

Los epitelios cúbicos están formados por células cúbicas. Frecuentemente son de sección exagonal (transversal) y cuadrada (longitudinal). Vistos en conjunto, dan la impresión de un piso de mosaicos (Bloom-Fawcett). Como ejemplos de epitelios cúbicos simples encontramos: Tiroides, plexos coroideos y conductos excretores de algunas glándulas.

Los epitelios cilíndricos simples se pueden presentar bajo diversos aspectos. No pueden ser considerados como elementos de simple recubrimiento, ya que algunos presentan una capacidad secretora. El epitelio cilíndrico simple está

constituido por células altas, de sección transversal prismática, que se apoyan sobre una membrana basal continua. El epitelio glandular (con células piramidales) no es más que un epitelio cilíndrico alterado mecánicamente para que pueda coronar una luz de tubo. El núcleo de las células cilíndricas tiene, por lo común forma ovalada.

A veces las células epiteliales cilíndricas sufren sensibles variaciones y presentan un aspecto peculiar. Un ejemplo concreto son las células caliciformes, secretoras de mucina y que se ubican a nivel del tubo digestivo, epitelios respiratorios, etc. Generalmente, su citoplasma está desplazado por la mucina almacenada en la célula. Cuando no hay más lugar para contener la membrana plasmática de la célula caliciforme libera la mucina. Son verdaderas glándulas unicelulares.

Además ciertas células cilíndricas se especializan en la recepción de estímulos, ya que están conectadas con las terminaciones nerviosas.

EPITELIOS ESTRATIFICADOS:

En la constitución de los epitelios estratificados, intervienen varias capas o estratos. Se clasifican en:

- Pavimentoso estratificado.
- Cilíndrico estratificado.
- Polimorfo de transición transigente.

El pavimento estratificado está compuesto por varias capas.

Fisiológicamente, está afectado a la protección. El número de estratos celulares que lo componen varía según su ubicación en el organismo, pero en líneas generales, el esquema estructural es idéntico en todos los casos. Se compone, entonces, de varias capas, de las cuales la superior o superficial es totalmente plana, semejando un "pavimento". Algunos lo llaman escamoso.

Es el tipo clásico de la mucosa que cubre la cavidad bucal. La capa superficial se descama y es repuesta constantemente por las células originadas en la mitosis de las capas más profundas.

El epitelio va variando, en su forma, de la basal a la superficie. Contra el corión, se presenta cilíndrico o cúbico, y a medida que avanza hacia la superficie, se torna más aplastado.

Las células superficiales de la piel carecen de núcleo;

tiene queratina a nivel de la epidermis, ya que debe soportar mucha atrición y descamación.

En cambio los epitelios de la boca, faringe, etc., que no están tan expuestos a los desgastes contínuos de la piel no tienen queratina y sus núcleos se ven bastante bien. Sin embargo hay casos en que poseen queratohialina, en las células superficiales del epitelio de determinadas zonas. Este epitelio es uno de los más generalizados, ya que recubre toda la superficie del cuerpo, sus orificios y membranas.

Se encuentra a nivel piel, mucosa bucal, faringea, laríngea, esofágica, conducto auditivo externo, vagina, porciones de uretra, etc.

El cilíndrico estratificado. Es poco común. Su estructura es a base de una serie de células cúbicas apoyadas en el corion, sobre las cuales se asientan algunas filas de células cilíndricas. Generalmente se los puede encontrar en puntos de transición entre epitelios pavimentosos estratificados y cilíndricos pseudo estratificados.

En el tipo pseudo estratificado, el epitelio se compone de una sola fila de células cilíndricas, pero el corte evidencia sus núcleos a diferentes alturas. Esto hace que parezcan varias capas.

El cilíndrico estratificado se encuentra a nivel de faringe y laringe. El cilíndrico pseudo estratificado lo encontramos a nivel de aparato digestivo y genital masculino.

El epitelio polimorfo o de transición lo encontramos en la vejiga. Las capas de epitelio se pueden presentar bajo dos aspectos según el estado funcional del órgano.

Su estado de vacuidad, el epitelio está relajado y tiene un cierto espesor. Cuando la vejiga se llena de orina, entra en estado de repleción y se estira de tal forma que el epitelio queda tenso y su espesor se angosta.

En los epitelios polimorfos, la membrana basal no existe porque, en tal caso, al estirarse el epitelio se rompería, o bien, debido a la rigidez de la membrana, no podría extenderse.

El epitelio de transición lo encontramos en el aparato urinario: Ureter, vejiga, pelvis renal, etc.

EPITELIO GLANDULAR:

Señalamos que hay dos clases principales de tejido epitelial: 1) Membrana de cubierta y revestimiento y 2) Glándulas, a las que nos referimos ahora.

CLASIFICACION DE LAS GLANDULAS:

Aunque las glándulas pueden clasificarse de muchas maneras, hay dos grupos principales: 1) Glándulas exocrinas, provistas de conductos, que llevan la secreción a la superficie epitelial de la cual se originaron y por ello fuera de los tejidos corporales, y 2) Glándulas endocrinas, que carecen de conductos y tienen que secretar hacia los tejidos corporales (generalmente capilares), por lo cual se llaman glándulas sin conducto.

GLANDULAS EXOCRINAS:

Las glándulas exocrinas consisten en dos componentes epiteliales principales: 1) Grupos de células especializadas llamadas unidades secretoras que sintetizan la secreción elaborada por la glándula y 2) Conductos tubulares que vacían su secreción en alguna superficie.

Las glándulas exocrinas se clasifican de varias maneras:

GLANDULAS SIMPLES Y COMPUESTAS:

Si una glándula solo tiene un conducto no ramificado se le llama GLANDULA SIMPLE. Sin embargo si posee un siste-

ma de conductos ramificados que permite llevar la secreción de gran número de unidades secretorias se llama GLANDULA -- COMPUESTA.

GLANDULAS TUBULARES Y ACINOSAS Y ALVEOLARES:

Si los acumulos de células que forman la unidad o las unidades secretorias de una glándula tienen forma de tubo la glándula se llamará tubular. Cuando las unidades secretorias son más redondeadas se dice que la glándula es acinosa (Lat. acinus, uva) o alveolar (Lat. alveolus, pequeño saco hueco). Si las glándulas poseen unidades que tienen algunas características de ambos, se denominan GLANDULAS TUBULOALVEOLARES.

GLANDULAS MUCOSAS, SEROSAS Y MIXTAS:

Hace mucho tiempo se advirtió que la secreción de algunas glándulas era más viscosa y pegajosa y las glándulas que elaboran esta clase de secreción se llaman GLANDULAS MUCOSAS.

También se apreció que la secreción de otra clase de glándula era relativamente transparente y acuosa, que recordó a alguien el suero, por lo cual las glándulas se denominaron SEROSAS. De los conductos de algunas glándulas salen

secreciones mucosa y serosa, y dado que estas glándulas poseen las dos clases de unidades secretorias (mucosas y serosas) se llaman GLANDULAS MIXTAS.

GLANDULAS MEROCRINAS, HOLOCRINAS Y APOCRINAS:

Otra clasificación de las glándulas se funda en la forma en la cual inicialmente se supuso que producían la secreción.

GLANDULAS MEROCRINAS:

Tienen células secretorias ejem: Las células acinosas del páncreas y las células calciformes. En este caso la secreción es un producto de la célula y se expulsa a través de su membrana en vesículas membranosas de modo que ésta se mantiene íntegra, de lo cual se deduce que no hay pérdida de citoplasma en el fenómeno de secreción.

GLANDULAS HOLOCRINAS:

Por fortuna, holocrina (gr. holos, todo) significa que para que una glándula holocrina secrete, deben desprenderse células completas, morir y convertirse en la secreción glandular.

GLANDULAS APOCRINAS:

Cuando solo se disponía de ME, se consideraba que en algunas glándulas la llegada de la secreción a la luz de la unidad secretoria exigía cierta pérdida del citoplasma superficial de la célula secretoria, de modo que se convertiría en parte de la secreción. Sin embargo, con el ME se ha demostrado que el concepto de que las células pierden algo de citoplasma durante la secreción no era valedero, y es probable que la mayor parte de las glándulas antes llamadas apocrinas en realidad serán merocrinas.

GLANDULAS ENDOCRINAS.

La estructura de las glándulas endocrinas es bastante más sencilla que la de las exocrinas, porque no poseen conductos.

ALMACENAMIENTO INTRACELULAR:

Todas las glándulas endocrinas almacenan secreción en menor o mayor medida. Esto se logra en la mayor parte de los casos, por el almacenamiento intracelular. Hay granulos secretorios en las células de muchas glándulas endocrinas, en las cuales se almacenan pasajeramente antes de ser secretados.

ALMACENAMIENTO EXTRACELULAR:

Las células que de otra manera formarían un acúmulo secretan un depósito extracelular de secreción en el centro del conglomerado, en consecuencia, la secreción se almacena extracelularmente, en lo que se le llama folículo.

CAPSULAS, TRABECULAS Y RIEGO SANGUÍNEO:

Las glándulas endocrinas están cubiertas por una cápsula de tejido conectivo, que suele emitir prolongaciones hacia la sustancia de una glándula, en forma de trabéculas que dan sostén interno y transportan vasos sanguíneos al interior.

FUNCIONES DE LAS GLÁNDULAS ENDOCRINAS:

Aunque la mayor parte de ellas elaboran hormonas, es correcto llamar endocrinas a una glándula aunque no elabore una hormona siempre que secreta un producto útil hacia el cuerpo.

ORIGEN EMBIOLÓGICO:

Embrionológicamente, los epitelios pueden derivar de cualquiera de las tres hojas embrionarias, pero un tipo de

epitelio puede derivar de una sola hoja. Por ejemplo:

Ectodérmico: piel, glándulas sebáceas y sudoríparas,

Mesodérmico: la capa endotelial de los vasos sanguíneos

Endodérmico: el epitelio del estómago y sus glándulas.

ESTRUCTURA HISTOLOGICA DE LOS EPITELIOS:

Dentro del estudio del tejido epitelial se deben considerar dos partes fundamentales constitutivas asociadas:

- a) epitelio propiamente dicho,
- b) Corión o tejido conjuntivo anexo.

C O R I O N :

Se le denomina dermis o lámina propia.

En su constitución interviene TEJIDO CONJUNTIVO LAXO.- Es imposible tener un epitelio sin su corión o conjuntivo subyacente, ya que es el que le permite la nutrición. Por el corión transcurren elementos vasculares que vuelcan la sangre en su seno. Además, los elementos nutritivos atraviesan la MEMBRANA BASAL y llegan a la porción epitelial del conjunto. En el corión se encuentran terminaciones nerviosas que dan la sensibilidad al epitelio, el tejido conjuntivo

vo participa ofreciendo sostén a la porción epitelial. Por lo tanto si el corion no existiera, el epitelio moriría. El epitelio y el corion no están en contacto directo sino a través de una membrana de naturaleza fibrilar-conjuntiva; es la membrana basal o membrana de BOWMAN. Es una formación que separa el epitelio del corión subyacente.

PAPILAS DEL CORION:

El límite epitelio-corional no es uniforme. El corion presenta elevaciones bastante notorias denominadas papilas.

Las papilas pueden sobresalir por intermedio del epitelio en la superficie. Tendremos según el caso, papilas DELA MORFAS O ADELAMORFAS.

PAPILAS DELOMORFAS:

Son aquellas que salen a la superficie, es decir, empujan el epitelio.

PAPILAS ADELOMORFAS:

El corion tiene también papilas que no salen a la superficie. Son las adelomorfias.

ESTRUCTURA HISTOLOGICA DEL CORION:

El corion está constituido de tejido conjuntivo laxo, vale decir que forma parte de él la mayoría de los elementos del tejido conjuntivo. Sin embargo predominan las fibras de colágeno, sobre todo en tejidos antiguos.

CITOLOGIA EPITELIAL;

En la citología epitelial, o el estudio de la célula epitelial aislada, consideramos una célula tipo de la cual veremos sus características de una y otra variedad.

F O R M A :

Adoptan formas muy variadas. Las hay cúbicas, cilíndricas, piramidales, poliédricas, caliciformes, etc.

TAMANO:

Generalmente su diámetro es superior a los tres micrones.

CITOPLASMA:

Es incoloro. En algunos lugares resalta su transparen-

cia (cristalino). Otras veces toma el color del órgano (piel), en estos casos encontramos presente pigmentos.

En algunas células, como las caliciformes, encontramos material mucígeno. En ellas hay ciclos de actividad secretora. El ciclo comienza con la elaboración de mucina que empieza a aumentar en cantidad hasta que la célula se hincha, constituyendo lo que le llaman "globet-cell". Luego la mucina se libera y se reinicia el ciclo. Poseen gran cantidad de mitocondrias, sobre todo las que tienen capacidad secretora.

Los organoides se disponen de modo especial. La gran mayoría de las mitocondrias se encuentran debajo del núcleo el aparato de Golgi se ubica sobre el mismo, al igual que el centriolo, que es diplosómico.

NUCLEO:

El tamaño del núcleo es proporcional a la célula. Lo más importante es su ubicación, se encuentra entre el tercio medio y el tercio inferior. Es muy basófilo.

CONCEPTO DE POLARIDAD:

En toda célula epitelial encontramos dos polos. El polo

que se orienta hacia la membrana basal se denomina: Polo basal o nutritivo. El otro polo que mira hacia "afuera" se denomina apical o excretor. El núcleo está en el polo basal.

PATOLOGIA TUMORAL DE LOS EPITELIOS:

Dentro del tejido epitelial hay dos tipos de tumores malignos: el ADENOCARCINOMA y el CARCINOMA, tanto uno como otro llevan a la muerte.

El Adenocarcinoma es el tumor maligno de los epitelios glandulares (de mama).

El carcinoma es el tumor maligno de los epitelios de revestimiento (de labio y lengua).

CAPITULO XI

TECNICAS GENERALES PARA TEJIDO EPITELIAL.

El mismo tejido puede observarse con diferentes técnicas que brindan una imagen de conjunto, pero la nitidez o evidencia de ciertas estructuras depende de la técnica.

11.1 METODOS COMBINADOS DOBLES.

Epitelio de Revestimiento y glandular; Hipófisis, Piel Humana (planta del pie), Páncreas; Suprarrenales.

METODO DE HEMATOXILINA-EOSINA.

(Hematoxilina de Harris - eosina alcohólica).

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes por congelación o por parafina.
- 3.- Lavar los cortes en agua destilada.
- 4.- Teñir con hematoxilina de Harris, de 1 a 3 min.
- 5.- Virar con agua de la llave.
- 6.- Lavar con agua destilada para detener el viraje.

- 7.- Deshidratar con alcoholes de 50° y 70°, por 3 min. en cada 1.
- 8.- Tefir con eosina alcohólica, de 1 a 3 min.
- 9.- Deshidratar con alcoholes de 96° (dos cambios) y absoluto, durante 5 min. 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:

Núcleo y Cartilago: Azul Morado.
 Protoplasma y sustancias intercelulares: De Naranja ó Rojo.

PREPARACION DE LOS COLORANTES:

- Hematoxilina de Harris:
 - Eosina alcohólica
 - Eosina azulosa 1.0 g.
 - Orange G. 1.0 g.
 - Alcohol de 70° 100 cc.

Se mezcla todo en 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°.

METODO DE HEMATOXILINA DE HARRIS.

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes delgados por congelación o por parafina.

- 3.- Lavar los cortes en agua destilada.
- 4.- Teñir con hematoxilina de Harris, de 1 a 3 min. (la coloración debe verse homogénea).
- 5.- Lavar en agua destilada.
- 6.- Virar en agua de la llave o en agua destilada con granos de carbonato de litio.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Deshidratar en dos cambios de alcohol de 96°.
- 9.- Aclarar con creosota si los cortes son por congelación, con xilol si son por parafina.
- 10.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Núcleos:	Morado.
Otros elementos:	Diferentes tonos de azul.

PREPARACION DEL COLORANTE:

<u>-Hematoxilina de Harris:</u>	
-Hematoxilina (Merck)	1.0 g.
-Oxido rojo de Mercurio	0.5 g.

Sulfato de aluminio y Amonio	
o Potasio (Alumbre)	20 g.
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 Oxido rojo de Mercurio (puede explotar) hasta que toma un color rojo púrpura, enseguida se enfría con hielo o 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.

11.2 METODOS TRIPLES:

HIPODISIS: PIEL HUMANA (PLANTA DEL PIE) PANCREAS: SUPRARRENALES.

METODO TRICOMICO DE GALLEGO:

1.- Fijar en Formol al 10%.

- 2.- Hacer cortes por congelación.
- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Teñir con la solución de fuesina, durante 5 min. '
Conviene teñir el mismo día que se hicieron los '
cortes.
- 5.- Pasar los cortes al viro fijador, durante 5 min. '
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 un minuto.
- 8.- Deshidratar en tres cambios de alcohol de 96°, de
1 a 3 min. en cada uno.
- 9.- Aclarar en dos cambios de xilol, de 1 a 3 min. ca-
da 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 Zuehl	5 gotas
Acido Acético	1 gota

-Virofijador:

Formol al 1%	10 cc.
Acido Acético	2 a 4 gotas

-Picrocarmín de Indigo:

Solución acuosa saturada	100 cc.
de Acido pícrico	
Carmín de indigo	0.25 g.
Agua destilada	15 cc.

· EPIHELIO FIBRILLAS. LIMITES CELULARES Y MEMBRANA BASAL.

METODO DE DOBLE IMPREGNACION EN CALIENTE de Rfo-Hortega para armazones Fibrilates y células.

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes por congelación.
- 3.- Lavar en agua amoniaca, de 15 min. a 24 Hs.

- 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 min.
- 10.- Lavar en agua destilada.
- 11.- Virar en Cloruro de Oro, 15 min. en frío (gris), reforzando la coloración en caliente de 10 a 40 min. (violeta intenso).
- 12.- Fijar en hiposulfito de sodio al 5%, por 5 min.
- 13.- Lavar en agua destilada.
- 14.- Deshidratar en alcohol de 96°.
- 15.- Aclarar en cerosota.
- 16.- Cubrir con Bálsamo de Canadá o Resina.

NOTA:

Para Epteliofibrillas hacer las siguientes modifica--

ciones, cortes gruesos por congelación y sin lavar pasar al nitrato de plata al 2%, o si se reciben en agua destilada, poner dos terceras partes del formol al 1% y una tercera parte de agua, pues los cortes deben tener formol.

RESULTADOS:

Fibras Nerviosas:	Negro intenso.
Núcleos:	Negro granuloso.
Soma celular:	Gris Violáceo muy tenue.
Colágena:	Gris violáceo.
Precolágena:	Pardo.
Fibras reticulares:	Negro.
Músculo estriado:	Gris.

METODO DE IMPREGNACION PARA EPITELIOFIBRILLAS de Rfo-Hortega

- 1.- Fijar en Formol al 10%, por 10 días o más,
- 2.- Hacer cortes delgados por congelación.
- 3.- Sin lavar, impregnar con carbonato de plata más 15 gotas de piridina por cada 10 cc. de carbonato; si se enturbia la solución pasar los cortes a una nueva. Calentar a 40 - 45°C, hasta que tomen un color tabaco.
- 4.- Lavar abundantemente en agua destilada, mínimo - - tres cambios.

- 5.- Reducir en formol al 2%.
- 6.- Lavar en agua destilada.
- 7.- Deshidratar en alcohol de 96°.
- 8.- Aclarar en creosota y cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Espiteliofibrillas: Negro.

NOTA:

Para mitocondrias impregnar intensamente en carbonato de plata no reduciendo en formol y virando a fondo con cloruro de oro.

METODO DE FUCSINA ACIDA -- AZUL DE ANILINA para gránulos basófilos y acidófilos de la Hipófisis.

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes por congelación.
- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Pasar al mordente de 12 a 18 hrs.
- 5.- Lavar en agua de la llave, durante 10 min. o más.
- 6.- Teñir con hematoxilina de Harris durante 10 min.
- 7.- Diferenciar en alcohol ácido al 1%.

- 8.- Lavar en agua de la llave hasta que los cortes ten gan un color azul pálido.
- 9.- Teñir con fucsina ácida al 1%, por 10 min.
- 10.- Lavar en agua de la llave durante 5 min.
- 11.- Enjuagar en agua destilada.
- 12.- Contrateñir con azul de anilina, de 5 a 15 min.
- 13.- Lavar en agua de la llave por 5 min.
- 14.- Diferenciar en alcohol de 96° por 5 min.
- 15.- Deshidratar con acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, por 5 min. en cada uno.
- 16.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Gránulos acidófilos:	Anaranjados.
Gránulos basófilos:	Azul cobalto.
Eritrocitos:	Naranja intenso.
Tejido conectivo:	Azul brillante.

PREPARACION DE SOLUCIONES:

-Mordente:

Bicromato de potasio	2.5 g.
Agua destilada	100 cc.

Acido acético glacial 5.0 cc.

-Fucsina ácida:

Fucsina ácida 1.0 g.

Agua destilada 100 cc.

-Azul de anilina-orange G.

Azul de anilina soluble en agua 0.5 g

Orange G. 2.0 g

Acido fosfomólfhdico 1.0 g

Agua destilada 100 cc.

11.3 METODOS ARGENTICOS (Límites celulares y membrana basal).

METODO DE IMPREGNACION SENCILLA EN FRIO DE RIO-HORTEGA

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes delgados por congelación.
- 3.- Lavar abundantemente en agua destilada.
- 4.- Sumergir los cortes en carbonato de plata, durante 20 min. En este punto los cortes permanecen incoloros.
- 5.- Reducir en formol al 1%. Aquí los cortes permanecen, adquieren un color tabaco obscuro.
- 6.- Lavar en agua destilada.

- 7.- Virar en frío en cloruro de oro, durante 10 min.
- 8.- Colocar los cortes en hiposulfato de sodio al 5%, durante 5 min.
- 9.- Lavar en agua destilada. Se puede dar una coloración de fondo con picrocarmin de indigo, por un minuto, seguido de lavado y continuar con el paso 10.
- 10.- Deshidratar en alcohol a 96°.
- 11.- Aclarar en creosota.
- 12.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

El colorante destaca los núcleos y el carbonato las fibras nerviosas.

NOTA:

En este método el carbonato de plata se precipita con mucha facilidad, por lo que es necesario seguir cuidadosamente las reglas para los métodos de plata dados en el apéndice.

METODO ARGENTICO (LIMITES CELULARES Y MEMBRANA BASAL)**METODO DE IMPREGNACION CON CARBONATO SIMPLE EN CALIENTE:**

- 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 con agua amoniaca, de 10 a 30 min., para -- eliminar totalmente el formol.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Hacer la impregnación en carbonato de plata amonia cal con tres 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 doráceo.
- 7.- Reducir en formol al 1% durante 30 seg.
- 8.- Lavar en agua destilada. Si se desea, virar en cloruro de oro al 1 por 500, durante 15 min. en frío, y 15 min. en caliente; los cortes deben tomar un color gris. Pasar los cortes a hiposulfito de sodio al 5%, durante 5 min. 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 ó púrpura.

METODO DE FLOXINA-HEMATOXILINA DE CROMO para gránulos basófilos y acidófilos de páncreas, de Gomori.

- 1.- Fijar la Bouin, de 12 a 24 hrs.
- 2.- Hacer cortes delgados por parafina.
- 3.- Fijar nuevamente en Bouin, de 12 a 24 hrs.
- 4.- Lavar en agua destilada, hasta quitar el exceso de ácido pícrico.
- 5.- Poner los cortes en la solución durante 1 min.
- 6.- Decolorar en la Solución D.
- 7.- Lavar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución E, por 10 a 15 min, controlando microscópicamente a intervalos, hasta que las células beta se observen azules.

- 9.- Diferenciar en la solución F por 1 min.
- 10.- Lavar con agua de la llave hasta que los cortes se vean azules.
- 11.- Contrateñir con la solución G durante 5 min.
- 12.- Lavar en agua de la llave.
- 13.- Pasar los cortes a la solución H por 1 Min.
- 14.- Lavar en agua de la llave hasta que los cortes se observen en color rojo.
- 15.- Diferenciar en alcohol de 96°. Si los cortes están sobreteñidos con floxina por 5 seg. en alcohol de 80°.
- 16.- Deshidratar con el alcohol absoluto.
- 17.- Aclarar con xilol.
- 18.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Células alfa:	Rojo.
Células beta:	Azul.
Células delta:	Rosa o ligeramente rojo.
Células acinosas:	Rosas o decoloradas.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES:

-Solución A:

Permanganato de potasio al 1%.

-Solución B:

Acido sulfúrico acuoso al 5%.

-Solución C:

Agua destilada	49.5 cc.
Solución A	47.5 cc.
Solución B	3.0 cc.

-Solución D:

Metabisolfito de sodio acuoso al 3%.

-Solución E:

Hematoxilina de alumbre de cromo de Gamori,	
Alumbre de cromo acuoso al 3%	50 cc
Hematoxilina aciosa al 1%	50 cc
Dicromato de potasio al 5%	2.0 cc
Acido sulfúrico al 3%	3.35 cc

-Solución F:

Alcohol al 70%	99 cc
Acido clorhídrico concentrado	1.0 cc

-Solución G:

Floxina acuosa al 0.5%

-Solución H:

Acido fosfotungstico acuoso al 5%.

METODO DE IMPREGNACION PARA FIBRAS NERVIOSAS Y SISTEMA CROMAFIN VARIANTE BARROSO-MOGUEL. (SUPRARRENALES).

- 1.- Fijar en formol al 10%, no menos de diez dfas.
- 2.- Lavar abundantemente en agua de la llave.
- 3.- Hacer cortes por congelación de mediano grosor. Recepción de los cortes en agua destilada.
- 4.- Poner los cortes en mezcla explosiva el día del corte (piridina, amoniaco y alcohol de 96° a partes iguales).
- 5.- Lavar los cortes en agua destilada durante 10 min.
- 6.- Hacer la impregnación en nitrato de plata al 2%, en caliente.
- 7.- Lavar los cortes en agua destilada, de 15 a 30 seg.
- 8.- Hacer una segunda impregnación en carbonato de plata amoniacaal más tres gotas de piridina, en caliente.
- 9.- Sin reducir, lavar rápidamente en agua destilada, de 30 a 60 seg.
- 10.- Poner los cortes en cloruro de oro en frfo, durante 15 min.
- 11.- Poner los cortes en cloruro de oro en caliente, durante 15 min.
- 12.- Pasar los cortes a hiposulfito de sodio, poniendo

de 1 a 3 gotas de amoniaco.

13.- Lavar en agua destilada, de 1 a 3 min.

14.- Lavar en agua destilada, de 1 a 24 hrs.

15.- Deshidratar en alcohol de 96°, de 30 a 60 seg.

16.- Aclarar en creosota, de 15 min. a 24 hrs.

17.- Cubrir con bálsamo de Canadá b Resina.

NOTAS:

a) Usar solo 6 cortes por técnica.

b) Procurar que los cortes naden en el nitrato, para evitar que se peguen al fondo del pocillo, hasta que tomen un color tabaco rubio.

RESULTADOS:

Células cromafines:

Púrpura.

Granulaciones:

Café oscuro o negro.

METODO DE SCHMORL (SUPRARRENALES: PARA CELULAS CROMAFINES).

1.- Fijar el órgano lo más fresco posible en fijador de Orhi, durante dos días, a pasar a una solución de bicromato de potasio al 2.5%, por dos días más, haciendo un total de cuatro días para la cromación.

- 2.- Lavar durante toda la noche los fragmentos antes de cortar.
- 3.- Hacer cortes por congelación.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Teñir con Giemsa diluido (10 gotas en 10 cc de - - de agua destilada), de 24 a 36 hrs.
- 6.- Lavar en agua destilada.
- 7.- Diferenciar en ácido acético al 0.25%, controlando el color de los cortes que debe ser azul, pasando los cortes uno a uno.
- 8.- Deshidratar rápidamente en alcohol de 96°. Teniendo en cuenta que el alcohol los decolora, se debe hacer la deshidratación corte por corte.
- 9.- Pasar los cortes por acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, por 3 min. en cada uno.
- 10.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Citoplasma de células:

Cromafines:

Verde.

Núcleos:

Azul oscuro.

Tejido conjuntivo:

Rosa.

METODO DE WIESEL (SUPRARRENALES; PARA CELULAS CROMAFINES):

- 1.- Fijar de uno a cuatro días en el fijador Wiesel y pasar a bicromato de potasio al 5%, de uno a dos días.
- 2.- Lavar en agua destilada, de 2 a 24 hrs.
- 3.- Hacer cortes por congelación.
- 4.- Lavar en agua destilada.
- 5.- Teñir en una solución acuosa de azul de toluidina al 1%, durante 20 min.
- 6.- Lavar en agua destilada tres o cuatro veces.
- 7.- Pasarlos a una solución acuosa de safranina al 1% durante 20 min.
- 8.- Diferenciar en alcohol de 96° hasta que los cortes se vean azules.
- 9.- Deshidratar y aclarar en acetona, acetona-xilol (1:1) y xilol, por 3 min. en cada uno.
- 10.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Células cromafines:	Verde.
Núcleos:	Rojo.
Citoplasma:	Azul.

NOTA:

El bicromato de potasio tiende a precipitarse, si ésto sucede hay que cambiarlo manteniéndolo en un frasco ámbar ' herméticamente tapado.

MÉTODO DE GOMORI: (SUPRARRENALES; PARA GRANULOS CROMAFINES)

- 1.- Fijar en formol al 10%.
- 2.- Hacer cortes por congelación.
- 3.- Lavar en agua destilada.
- 4.- Teñir con azocarmin 6, de 60 a 90 min., a 58°C.
- 5.- Lavar en agua destilada.
- 6.- Pasar a alcohol de 96°.
- 7.- Diferenciar en alcohol, anilina por 15 min.
- 8.- Lavar rápidamente en agua destilada.
- 9.- Pasar a una solución de ácido fosfotúngstico, por 20 min.
- 10.- Lavar en agua corriente durante 1 min.
- 11.- Teñir en azul de anilina - amarillo de quinoleina, de 15 a 40 min.
- 12.- Lavar en agua destilada.
- 13.- Deshidratar en alcohol de 96° y absoluto, hacer dos cambios, de 5 min. en cada uno.

14.- Aclarar con xilol.

15.- Cubrir con bálsamo de Canadá o Resina.

RESULTADOS:

Gránulos cromafines, células alfa de los islotes de la pancrearticos, algunas células de la pituitaria anterior, franulaciones neutrófilas y mielocitos. Rojo púrpura.

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES:

-Azucarmín G:

Azucarmín G	0.05 g.
Acido acético	1.0 cc.
Agua destilada	100 cc.

-Alcohol anilina:

Aceite de anilina	1.0 cc
Alcohol de 96°	100 cc

-Acido fosfotúngstico:

Acido fosfotúngstico	3.0 g
Agua destilada	100 cc.

-Azul de anilina-amarillo de quinoleina:

Azul de anilina	0.5 g.
-----------------	--------

Quiniloina amarilla u Orange G.	2.0 g.
Acido fosfotungstico	1.0 g.
Agua destilada.	100 cc.

CONCLUSIONES

Con frecuencia observamos que los intentos a realizar en cuanto a las técnicas histológicas, obtenidas de un libro o guía, no se realizan plenamente y de forma ampliamente convencional, aún cuando nos apeguemos estrictamente a las técnicas y métodos sugeridos por el autor; en base a esto nos dimos cuenta que el fracaso se debe en gran parte a que no se tiene el conocimiento de las condiciones y procedencia del material vivo, además de que los reactivos han resultado ser otro obstáculo para el éxito de nuestro propósito.

De tal forma que cualquier técnica a utilizar por primera vez y lograr resultados positivos deberá la muestra ser sometida estrictamente y sobre todo si es la primera vez a una serie de pruebas de ensayo y error, hasta lograr nuestro objetivo y de esta forma no decaer en el primer intento.

En lo que respecta a resultados que se presentan al pie de cada técnica o método histológico puede concluirse que es una síntesis de lo que se propone encontrar, en general en los tejidos, sin embargo, es importante hacer notar que cada tejido en particular responde de manera muy singular y exclusiva ante determinados reactivos empleado en el

momento de someterlo a nuestro estudio histológico, por lo que las técnicas a utilizarse deberán efectuarse de manera más minuciosa.

En base a nuestra experiencia adquirida, consideré que es de gran importancia esta rama de la medicina - La Histología Epitelial - ya que a través de ésta el estudiante lo grará obtener una visión informativa y práctica de los temas a estudiar así como sus aplicaciones.

Y finalmente quiero hacer notar que en la práctica de técnicas histológicas; es de gran importancia guiarse siempre de manera crítica, buscando obtener condiciones y resul tados óptimos en cada uno de los pasos a seguir, además de como se mencionaba al principio, someter nuestro estudio a la prueba de ensayo y error y de esta forma lograr obtener el éxito. Además cabe mencionar que los métodos propuestos en este manual son una herramienta científica ya que la experiencia teórica nos hizo observar que las técnicas histológicas nunca han sido estáticas, éstas siempre ofrecen posibilidades nuevas o de continuar evolucionando, por lo que se debe evitar llevar a cabo variaciones superfluas, ya que puede darse a través de éstos el error; debemos recordar ' que cada una de las técnicas mencionadas han sido ya compro badas por sus autores.

R E S U M E N

El desarrollo de este manual se llevó a cabo mediante una investigación bibliográfica, en la cual la información que obtuvimos, la efectuamos mediante una relación de datos verificando las posibles variables que existen dentro de las técnicas histológicas de acuerdo al método científico. Además de seleccionar los materiales y métodos de dicho trabajo de una manera más conveniente, tanto para las necesidades de un laboratorio y el enriquecimiento de los conocimientos de los estudiantes.

También se investigaron las técnicas histológicas más generales para Tejido Epitelial, clasificándolas y ordenándolas lo más posible con el fin de conocer cada una de las estructuras de dicho tejido.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ann Preece, H.T. (ASCP). A Manual for Histologic Technicians Third Edition. Little Brown and Company Boston.
- 2.- Bradley M. Patten. Embriología Humana. 4a. Edición. Edit. Florida- 340- Buenos Aires.
- 3.- Disbrey/Rack. 1970. Histological Laboratory Methods. Edinburgh London. E.S. Livigstone.
- 4.- Elvira Estrada Flores- Leonor Peralta Zamora- Patricia Rivas Manzano. Manual de Técnicas Histológicas. 1a. Edición. AGT Editor, S.A. *5281073*
- 5.- Gaviño Gonzalo/Juárez/Figueroa. 1982. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo. 6a. Edición. Limusa. México.
- 6.- Gretchen L. Humason. 1979. Animal Tissue Techniques Fourth Edition. W.H. Freedman and Company, San Francisco.
- 7.- Ham Arthur W. 1975. Tratado de Histología. 7a. Edición. Interamericana. México.

- 8.- Dr. Jan Langman. Embriología Médica. 2a. Edición. Desarrollo Humano Normal y Anormal. Edit. Interamericana.
- 9.- Jeffrey J. W. Baker, Gerland E. Allen. 1965. Biología e Investigación Científica. Fondo Educativo Interamericano.
- 10.- L. C. Junqueira/J. Carneiro. 1981. Histología Básica. 2a. Edición. Salvat S.A. México.
- 11.- Dr. Keith L. Moore. Embriología Clínica. 2a. Edición. Editorial Interamericana.
- 12.- R. Martoja y M. Martoja-Pierzon. 1970. Técnicas de Histología animal. 1a. Edición. Toray-Masson, S.A. Barcelona.
- 13.- Maximow and Bloom. Textbook of Histology. Sixth Edition. W.B. Saunders Company Philadelphia and London.
- 14.- Orban's. Oral Histology and Embriology. Fifth Edition. The C.V. Mosby Company. 1962.
- 15.- Revollo Marfa Antonieta. 1966. Histología. 2a. Edición. Editorial Intermédica.

- 16.- S. Ramón y Cajal/J.F. Tello y Muñoz. 1955. Elementos de Histología normal y de Técnica Micrográfica. Duodécima Edición. Editora Nacional. México, D.F.

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. ESTHER RODRIGUEZ GONZALEZ, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulado:

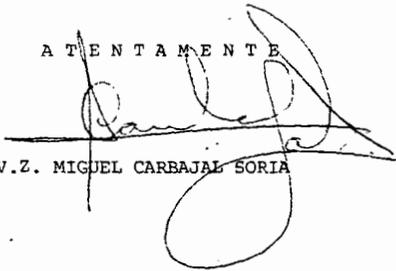
"MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA TEJIDO EPITELIAL"

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



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 667/86

Srita. Esther Rodríguez González
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el -
tema de Tesis " Manual de Técnicas Histológicas para Tejido Epitelial"-
para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Recursos Natu-
rales.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como -
Director de dicha Tesis el M.V.Z. Miguel Carbajal Soria.

Al contestar este oficio sírvase citar fecha y número



FAACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 4 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario


Dr. José Manuel Copeland Gurdíel.

c.c.p. El M.V.Z. Miguel Carbajal Soria, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R.,
GUADALAJARA, JAL.

TELEFONOS 17-58-29 Y 17-09-71