

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA.

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.

" ESTANDARIZACION DE ALGUNAS TECNICAS ESPECIALES DE TINCION
COMO AUXILIARES EN LA ENSEÑANZA PRACTICA DE LA HISTOLOGIA. "

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA:

ROMAN JESUS CASTILLO ARANDA.

A S E S O R:

M.V.Z. VICTOR BARRAGAN CANO.

GUADALAJARA, Jal. 1987.

" I N D I C E "

1.- TITULO	PAGINA.
2.- INTRODUCCION	1 5
3.- OBJETIVOS	6
4.- MATERIAL Y METODOS	7 15
5.- RESULTADOS	16 17
6.- DISCUSION	18 19
7.- CONCLUSIONES	20
8.- SUMARIO	21
9.- BIBLIOGRAFIA	22 23

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

El estudio de la estructura de los organismos es el objeto fundamental de las Ciencias Morfológicas, y en épocas antiguas el estudio de las estructuras se hacía a simple vista, después de la disección con cuchillos. Luego comenzaron a usarse lentes simples como auxiliares para distinguir detalles finos y texturas. Las lentes compuestas permitieron aumento mucho mayores. Así a principios del siglo XVIII, la morfología fué dividida en una parte macroscópica y otra microscópica. El advenimiento del microscopio abrió de esta manera el campo para el nacimiento de una multitud de disciplinas científicas, entre ellas, la Histología. La Histología es la Ciencia que se encarga del estudio de la composición y estructura microscópica de los tejidos, órganos y células normales de ellos, incluyendo un estudio profundo en estructura, forma, y su funcionamiento. La Histología se ha constituido en una Ciencia básica para todas aquellas personas que están dentro de las ciencias biológicas, pues se relacionan con materias tan fundamentales como la Bioquímica, Fisiología, Patología, Citología, Oncología, etc.

Para poder alcanzar el nivel y grado de conocimientos actuales en la Histología, los investigadores se han valido de gran diversidad en métodos como los que a continuación citamos. (2,3,8, y 13).

TEORIA QUIMICA:

Admite que el colorante se una a la sustancia coloreable combinándose y formando sales insolubles (tejidos acidófilos, basófilos o neutrófilos, según presente afinidad colorante con los reactivos ácidos, básicos, o neutros.)

TEORIA FISICA:

Según esta teoría, la coloración es un fenómeno de adsorción.

TEORIA FISICOQUIMICA.

La coloración dependerá de las características fisicoquímicas de las materias coloreantes y de los tejidos.

CLASIFICACION DE LOS COLORANTES.

Colorantes naturales: a).- Animal (Carmín)
b).- Vegetal (hematoxilina)

COLORANTES ARTIFICIALES

- A).- Ácidos: Son sales con base incolora, son colorantes citoplasmáticos.
- B).- Básicos: Son sales cuyas bases son coloreadas y el ácido incoloro (azul de metilena), son colorantes nucleares.
- C).- Neutros: Son sales en que el ácido como la base son coloreadas (eosinato de azul demetileno). Tiñen el núcleo de un color y el citoplasma de otro color.
- D).- Indiferentes: No forman sales, tiñen aquellas sustancias que tienen un poder disolvente superior al del líquido que ha servido para preparar la solución colorante.

TIPOS DE COLORACION:

A).- Ortrocromática:

Donde los tejidos adquieren un color igual al de la solución colorante empleada.

B).- Metacromática:

Cuando una sustancia celular se tiñe con un valor diferente al del colorante. Ejemplo: el violeta de metilo tiñe de rojo la sustancia mieloide y las granulaciones de las células cebadas.

METODOS DE COLORACION

- A).- Coloración directa; es cuando existe una verdadera afinidad entre el objeto y la solución colorante.
- B).- Coloración indirecta; es cuando se requiere la intervención de mordiente para que la coloración tenga lugar. El mordiente actúa antes del baño del colorante.
- C).- Coloración progresiva; en esta se hace actuar el colorante hasta que llegue a su punto óptimo.
- D).- Coloración regresiva; se realiza primero una sobrecoloración, luego se elimina el exceso del colorante por medio de diferenciadores.
- E).- Coloración simple: cuando se colorean algunos elementos del preparado (Núcleos, fibras elásticas).
- F).- Coloración combinada; es cuando se tiñen los elementos nucleares y citoplasmáticos, recurriendo al empleo de colorantes básicos y ácidos que contrasten por sus colores. (hematoxilina-eosina: Hematoxilina - tiñe núcleos de color violeta: la eosina tiñe el citoplasma de rojo).

- G).- Coloración panóptica; es la coloración combinada realizada por colorantes neutros (giemsa).
- H).- Coloración pancrómica: cuando en un solo baño colorante actúan todos los colorantes neutros que se necesitan (pancrómico de la veran).
- I).- Coloración en masa; colorea la pieza en su conjunto antes de cortarla.

En el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara, se labora diariamente de manera rutinaria la tinción con hematoxilina y eosina (H-E). Esta técnica, a pesar de que da buenos resultados, resulta insuficiente para poder apreciar todos los detalles necesarios que deben tenerse en cuenta cuando se está iniciando al alumno en el conocimiento y estudio de la Histología. En el Laboratorio existe conciencia de que es necesario implementar nuevas y diferentes técnicas de tinción, pero la falta de personal y el exceso de trabajo ha provocado que no se haya implementado nuevas técnicas de tinción para la mejor enseñanza de la Histología Práctica. Para suplir estas deficiencias, se ha establecido un programa para la estandarización de nuevas técnicas tanto para el área de diagnóstico (Patología y la Histología. Esta tesis forma parte de un Programa. (1, 7, 9, 12, 16,).

Las técnicas que se proponen son:

- Técnica de P.A.S. (para mucopolizacaridos)
- Técnica de Van Gieson (para colágeno)
- Técnica tricrómica de Masson (para tejido conectivo)
- Técnica de Mallory-Azan (para núcleos, fibras, sustancias mucoides y citoplasma.)
- Técnica de hematoxilina férrica (heidenhain) para fibras de músculo estriado.)

" O B J E T I V O S "

Objetivo General: Estandarizar nuevas técnicas de tinción en el Laboratorio de Histología y dejar colecciones de laminillas con estos métodos para una mejor enseñanza de la Histología.

Objetivos Particulares:

- Estandarizar nuevas técnicas de tinción para la enseñanza práctica de la Histología.
- Hacer acopio en el Departamento de Histología de reactivos, materiales y preparaciones necesarios para elaborar los nuevos métodos de tinción para que en un momento dado, se puedan elaborar en cualquier momento - teniendo todo el material preparado.
- Dejar colecciones de laminillas para que se puedan utilizar en las prácticas de la Histología.
- Capacitar al personal técnico para que adquiriera práctica en el manejo, uso, y preparación de reactivos y materiales utilizados en los nuevos métodos de tinción.

" MATERIAL Y METODOS "

Se utilizarán tejidos de Rata Cepa Wistar fijados con formol Buferado al 10 %, y solución de Bouin. Se considerará estandarizada la técnica cuando se obtengan resultados esperados para cada método, por lo menos 10 veces seguidas. El trabajo se realizará con la ayuda, instalaciones y equipo del Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de Guadalajara.

TECNICA DE P.A.S.

Preparación de la Solución: (Reactivos)

ACIDO PERIODICO

Acido Periódico (HIO_4)0.6 g.
Agua destilada100.0 ml.
Acido nítrico concentrado..... 0.3 ml.

REACTIVO DE SCHIFF:

Fuosina básica (C.I. 42500)0.1y 1.0g.
Agua destilada 85.0 ml.
Metabisulfito de Sodio ($NA_2 S_2 O_5$) 1.9 g.
Acido clorhidrico normal15.0 ml.

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Desparafinar las secciones.
- 2.- Hidratar secciones a 70 % alcohol y enjuagar brevemente en agua destilada.
- 3.- Tratar con ácido periódico, 60 minutos.
- 4.- Lavar en alcohol puro. 2-3 cambios, 3 minutos cada uno.
- 5.- Tratar con el reactivo de Schiff: 30 minutos cada uno.
- 6.- Lavar en alcohol puro: 20 minutos
- 7.- Aclarar y montar.

RESULTADOS:

Hongos rojo

Glicógeno, almidón celulosa, mucina, coloide de la tiroide, cartílago de la matrix, retícula fibras, colágeno-morado a morado rojo.

Nucleos y otros elementos de tejido- color contrateñido.

TECNICA DE VAN GIESON

Preparación de la solución (Reactivo).

Solución acuosa de ácido pícrico al 1.22 % 100 ml.

Solución acuosa de Fucsina ácida al 1% 15 ml.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Combinar la solución (Acido pícrico, ácido fucsina y solución acuosa.
- 2.- Aplicar el colorante sumergiendo individualmente los portaobjetos en una jarra de Coplin hasta que se adquiriera el tono de coloración deseada.
- 3.- Enjuagar los portaobjetos en agua destilada.
- 4.- Observarlos bajo el microscopio.
- 5.- Deshidratar y aclarar en la manera tutinaria.

RESULTADOS:

Tejido conectivo-rojo.

Otros elementos del tejido amarillo.

TECNICA TRICROMICA DE MASSON.

Preparación de la Solución (Reactivos).

ALUMBRE FERRICO.

Sulfato Férrico de Amonio 4.0 g.
Agua destilada 100.0 ml.

HEMATOXILINA.

Hematoxilina 2.0 g.
Alumbre de amonio ($\text{NH}_4\text{AL}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 3.0 g.
ALCOHOL ETILICO 100.0 ml.
Glicerina 100.0 ml.
Agua destilada 100.0 ml.

FUCSINA ACIDA

Fucsina Acida (C.I. 42685) 1.0 g.
Agua destilada 100.0 ml.
Acido acético glacial 1. ml.

PONCEAU DE XILLIDINA

Ponceau de xillidina (C.I. 16150) 1.0 g.
Agua destilada 100.0 ml.
Acido acético glacial 1.0 ml.

VERDE FIJO

Verde fijo (C.I. 42053) 2.0 g.
Agua destilada 100.0 ml.
Acido acético glacial 2.0 ml.

ACIDO FOSFOMOLIBDICO

Acido fosfomolibdico 1.0 g.
Agua destilada 100.0 ml.

AGUA ACIDIFICADA

Acido acético glacial 1.0 ml.
Agua destilada 100.0 ml.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Desparafinar, hidratar los portaobjetos en agua;
Colocar el tejido fijado en formalina mordiente en H_2Cl_2 saturado acuoso, por 5 minutos. Tratar con lu gol y Triosulfato de sodio.
- 2.- Sumergir las secciones en alumbre férrico, 30 minutos.
- 3.- Lavar en agua corriente por 5 minutos.
- 4.- Colorearlo en hematoxilina (Delafield o algo similar) por 30 minutos.
- 5.- Lavar en agua corriente 5 minutos.
- 6.- Cambiarlo a ácido pícrico saturado acuoso.
- 7.- Lavar completamente en agua corriente, 10 minutos o más.
- 8.- Colocar en fucsina ácido,, 5 minutos.
- 9.- Enjuagar en ponceau de xilidina, 1-5 minutos.
- 10.- Colorear en ponceau de xilidina, 1-5 minutos.
- 11.- Enjuagar en agua de la llave, controlando bajo del microscopio por intensidad correcta del ácido fucsina y ponceau de xilidina.

- 12.- Cambiarlo a ácido fosfomolíbido, 5 minutos.
- 13.- No enjuagar: colocarlo directamente a la fijación verde, 2 minutos.
- 14.- Cambiar lo verde en agua acidificado y alcoholes - deshidratantes.
- 15.- Deshidratar en alcohol absoluto, 2 cambios, 3 minutos cada uno.
- 16.- Secarlo y ponerlo en portaobjetos.

RESULTADOS.

Nucleos- color violeta a negro

Elementos eitoplasmáticos- tintes variantes de malva "Redond"

Músculo-rojo

Colágeno- verde.

TECNICA DE MALLORY-AZAN.

Preparación de la solución (Reactivos)

AZOCARMIN G:

Azocarmin G.	I-I.5 g.
Agua destilada -.....	200.0 ml.

ALCOHOL-ANILINA

Aceite de anilina	1.0 ml.
Alcohol etílico 95 %	100.0 ml.

ALCOHOL ACETICO GLACIAL 1 %

Alcohol acético glacial	1.0 ml.
Alcohol etílico 95 %	100.0 ml.

SOLUCION ACIDO FOSFOTUNGSTICO

Acido Fosfotúngstico 5. g.
Agua destilada100.0 ml.

SOLUCION MADRE DE AZUL ANILINA.

Agua soluble en Azul de Anilina 0.5 g.
Naranja G 2.0 g.
Agua destilada100.0 ml.
Acido acético glacial 8.0 ml.

SOLUCION TRABAJO AZUL DE ANILINA.

Solución madre azul de anilina 1 parte
Agua destilada 2 partes

PROCEDIMIENTO

- 1.- Desparafinar las secciones por medio de xileno, y alcohol absoluto y al 95 %.
- 2.- Enjuagar en agua destilada.
- 3.- Teñir en solución de azocarmina G. en un recipiente tapado en el horno de parafina por 5 minutos hasta 20 minutos. Dejar enfriarse por 5 minutos a la temperatura ambiental.
- 4.- Enjuagar en agua destilada.
- 5.- Diferenciar en la solución anilina-alcohol hasta que el citoplasma y tejidos conectivos estén de rosa ligero y los nucleos se distingan claramente. Controlar la diferenciación y enjuagar el portaobjeto en 1 % de alcohol acético glacial y observarlo al microscopio.

Si la sección es demasiado roja, devolverla al alcohol anilino.
Enjuagar con 1% alcohol acético glacial.

- 6.- Teñir en 5 % solución de ácido-fosfotúngstico hasta que el tejido conectivo esté descolorizado, 15 minutos hasta 1 hora.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Contrateñir de 5 a 30 minutos en la solución anilina azul "B" hasta que las más finas fibras conectivas del tejido estén teñidos claramente.
- 9.- Enjuagar en agua destilada.
- 10.- Deshidratar rápidamente con alcohol a 95 % dos cambios de alcohol - absoluto.
- 11.- Aclarar con dos o tres cambios de xileno y montar en Permount.

RESULTADOS:

Cromatina y neuroglia- rojo.
Citoplasma- rosado a azul
Colágeno y retícula- azul
Músculo- rojo o anaranjado
Células alfas- rojo.

TECNICA HEMATOXILINA FERRICA DE HEIDENHAIN

PREPARACION DE LA SOLUCION . (REACTIVOS).

Solución de Alumbre de Amonio Férrico.

Alumbre de Amonio férrico..... 2. 5 g.
Agua destilada.....100.0 ml.

HEMATOXILINA- ALCOHOL.

Hematoxilina0.5 g.

Alcohol Etílico 10.0 ml.
Agua destilada 100.0 ml.

Disolver la hematoxilina en el alcohol y agregar el agua.
Dejar que se madure 4-5 semanas. Para usarla, diluir la -
hematoxilina con partes iguales de agua destilada. Se pue-
de volver a usar la solución.

TINCION DE VAN GIESON

Fucsina Acida 1 % 5.10 ml.
Acido pícrico saturado 1.22 %100. ml.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Desparafinar en alcohol absoluto, alcohol de 95 % los portaobjetos 2 veces cada uno.
- 2.- Lavar bien en agua corriente.
- 3.- Remojar los portaobjetos en Alumbre de Amonio- Férrico - por 1 a 2 horas.
- 4.- Lavar rápidamente con agua destilada.
- 5.- Teñir de 1-36 horas en la solución de Hematoxilina alcoholica. Se teñirán las secciones adecuadamente cuando al quitarles de la Hematoxilina son del color negro homogéneo y microscópicamente no muestren detalle celular en absoluto.
- 6.- Lavar en agua de la llave.
- 7.- Diferenciar en la solución de Alumbre de Amonio Férrico controlando los resultados al microscopio.
Se debe enjuagar las secciones en el agua de la llave antes de cada examinación, que parará inmediatamente la descolorización.

- 8.- Lavar con agua de la llave de 15 a 20 minutos.
- 9.- Contrateñir en la solución de Van Gieson.
- 10.- Enjuagar con alcohol al 50 %
- 11.- Deshidratar con 2 cambios de 95 % alcohol y dos cambios de alcohol absoluto.
- 12.- Aclarar en 2 o 3 cambios de xileno y montar.

RESULTADOS.

Cromatina, Nucleolos, Mitocondrias, Centriolos, Fibras de músculo estriado-negros.

Amibas -negro.

Otros tejidos se colorean según la contratinción.

" R E S U L T A D O S "

Al realizar las técnicas de tinción propuestas se obtuvieron los resultados esperados para cada una de ellas. Se elaboraron colecciones de algunos órganos con diferentes técnicas buscando siempre que estas fueran específicas para el órgano o partes de él. Las colecciones compuestas de 12 laminillas por cada órgano fueron teñidos con una técnica. A continuación enumeramos los órganos y técnicas que se elaboraron.

ORGANO	P.A.S.	MALLORY	MASSON	VAN GIESON	H.FERRICA
Piel	-	+	+	+	-
Bazo	-	-	-	+	-
Lengua	+	+	-	-	-
Ganglio	-	-	+	+	-
Esófago	+	+	+	+	-
Vejiga	-	+	+	+	-
Gland. Salival.	+	+	+	-	-
Estómago	+	+	+	-	-
I. Delgado	+	+	+	-	-
I. Grueso	+	+	+	-	-
Riñón	+	+	+	-	-
Tráquea	+	+	+	-	-
Tiroides	+	+	+	-	-
Hígado	+	+	+	-	-
Adrenal	-	+	+	-	-
Vesícula Biliar	-	+	+	-	-
Páncreas	-	+	+	-	-
Utero	-	+	-	-	-
Mús. Estriado	-	-	-	-	+

NOTA: El signo + equivale órgano teñido.
El signo - equivale órgano no teñido.

Para realizar la técnica de P.A.S. se eligieron órganos con abundantes sustancias mucopolisacáridas como glándulas, mucosas, glucógeno, o abundantes membranas nasales.

La técnica de Mallory-Azan es muy versátil y llamativa; se puede aplicar esta técnica a una gran cantidad de órganos. Los únicos órganos a los cuales esta técnica no es práctica son Bazo y Ganglios Linfáticos por la gran cantidad de Nucleos y Linfocitos y ausencia de otro tipo celular.

En el resto de los órganos se puede obtener un buen contraste, porque los núcleos se tiñen de rojo, y el citoplasma de rosa o azul pálido y el tejido conectivo de azul.

Para la técnica de Tricromica de Masson se escogieron casi los mismos órganos que para la Técnica de Mallory-Azan. La diferencia es que el núcleo se tiñe de azul, el citoplasma de rosa, y el tejido conectivo de verde. En la Técnica de Van Gieson, se escogieron órganos con abundante tejido conectivo que se tiñe de rojo. Estos órganos fueron: piel, bazo, ganglio linfático, esófago y vejiga urinaria.

Con la Técnica de Hematoxilina Férrica de Heidenhain, se puede observar la cromatina, mitocondrias, citoplasma y membrana celular; pero se utilizó únicamente para observar las estriaciones del músculo estriado esquelético.

" D I S C U S I O N "

Debido a que no se hizo un trabajo experimental, la discusión consta solo de un relato sobre los problemas a los que nos enfrentamos para lograr la estandarización de cada una de las técnicas y de como se solucionaron dichos problemas.

Es frecuente tener fracasos al intentar realizar algunas técnicas histológicas obtenidas de un libro de técnicas, aunque nos apeguemos a la metodología sugerida por el manual, esto se debe en parte al grado de pureza del material empleado siendo el primer obstáculo para la obtención de buenos resultados. Hay que tomar en cuenta que cada tejido tiene sus variantes exclusivas ante los reactivos empleados, por lo tanto el constante manejo de la técnica, el conocimiento del tejido y la acción de los reactivos es lo que va dando la pauta adecuada para cada método.

Al realizar la Técnica de P.A.S., el primer problema fué al preparar el Reactivo de Schiff, al cual se le quintuplicó la cantidad de carbón activado. El carbón era muy viejo y no lograba cumplir su cometido, tiñendolo de rojo en lugar de un blanco claro. Además se tuvo que duplicar el tiempo de exposición a los reactivos, para poder obtener una mejor y más firme coloración.

Para la Técnica de Van Gieson, solo se tuvo que aumentar el tiempo de exposición al colorante de una hora para obtener una mejor coloración.

En el Método Tricrómica de Masson tuvimos problemas en la coloración roja dada por la fucsina y ponceau de xilidina al diferenciarla en el ácido fosfomolíbdico, por lo que se tuvo que bajar el tiempo a un minuto.

El color verde dado por el colorante verde brillante no fué tomado por los tejidos por lo que se aumentó el tiempo de exposición en la tinción de 2 a 30 minutos.

En el Método Tricrómica de Mallory-Azan, fué necesario colocar las laminillas de tejido fijados con formol en una solución mordente - de dicromato de potasio al 2 % por una noche. Después se colocaron a la solución de alcohol-anilina por media hora antes de iniciar la técnica.

Se debe tener mucho cuidado al hacer la diferenciación del Azocarmin G. chequeando cada 15 segundos las laminillas; pues un exceso de anilina decolora a todo el tejido. Se aumentó la exposición en la solución de azul de anilina de 30 minutos a 2 horas, porque no había buena penetración del colorante.

Mencionaremos que en el Método de la Hematoxilina Férrica de Heidenhain el tiempo para lograr una buena penetración del colorante es \pm 2 horas en la solución de hematoxilina férrica. En la diferenciación de las laminillas con la solución alumbre de amonio férrico, es necesario tener un buen control de los resultados deseados al observarlos con el microscopio. En caso contrario, se te decoloran y se pierde el detalle celular de las fibras musculares.

En general, en la mayoría de las técnicas se aumentó el tiempo de exposición a algunos colorantes. Esto fué debido a que dichos colorantes tenían mucho tiempo de almacenamiento, perdiendo mucho de sus propiedades químicas.

" C O N C L U S I O N E S "

- Se logró la completa estandarización de las cinco técnicas de tinción propuestas.

- Se pudo conseguir todos los reactivos necesarios para la elaboración de las técnicas de tinción.
(Se importó la Azocarmin G. de St. Louis, Missouri.)

- Se aumentó en 480 el número de laminillas útiles en los inventarios de material del laboratorio de Histología.

- El personal técnico aumentó su experiencia en la preparación uso y manejo de reactivos y colorantes en el laboratorio de Histología.

- El alumno puede tener una mejor y mayor aprendizaje de la Histología al observar más características de los tejidos expuestos por medio de las técnicas antedichas.

" S U M A R I O "

Se estandarizaron cinco diferentes técnicas de tinción para lograr una mejor enseñanza práctica de la Histología. Las técnicas estandarizadas fueron: Tricrómica de Masson, Tricrómica de Mallory-Azan, Técnica de Van Gieson, Técnica de Hematoxilina Férrica de Heidenhain, y la Técnica de P.A.S. (Acido Periódico de Schiff). Se elaboraron 48 colecciones de laminillas de distintos tejidos. Se capacitó al personal técnico en cada una de estas técnicas y se dejaron preparadas las soluciones de estas nuevas técnicas.

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

- 1.- CARDENAS, L.R., CASTELLON, O.J., ZARAGOZA A. MA. SECO DEBIL SECO FUERTE E INMERSION, ATLAS PRACTICA DE HISTOLOGIA, MEDICINA No. 24, MEXICO 21, D.F. 1980 PAGES. 21, 34, 55-62.
- 2.- CARPENTER, A.M. HUMAN HISTOLOGY: A COLOR ATLAS Mc.GRAW-HILL, INC. 1968 PAGES. 11-15.
- 3.- COPENHAVER, W.M. TRATADO DE HISTOLOGIA, 17a EDICION INTERAMERICANA MEXICO, D.F. 1981 PAGES. 240-242.
- 4.- DELLMANN, H.D., VETERINARY HISTOLOGY: AN OUTLINE TEX-ATLAS. LEA AND FIBIGER PHILADELPHIA, 1971 PAGES. 34-63
- 5.- DELLMANN, D.H. AND BROWN, E.M: TEXTBOOK OF VETERINARY HISTOLOGY SECOND EDITION. LEA AND FIBIGER, PHILADELPHIA, 1981 38-42, 101,108.
- 6.- DISBREY, B.D. AND ROCK J.H. HISTOLOGICAL LABORATORY METHODS. E.S. LIVINGSTONE, EDINBURGH AND LONDON. 1970 108-124 147 144.
- 7.- FLORES E.E., ZAMORA, L.P. Y MONZANO, P.R. MANUAL DE TECNICAS - HISTOLOGICAS, 1ra. EDICION. A.G.T. EDITOR, S.A. MEXICO 18,D.F. 1982. PAGES. 15, 26.
- 8.- GRAU, H. Y WALTER P. HISTOLOGIA Y ANATOMIA, MICROSCOPICA COMPARADA DE LOS MAMIFERSO DOMESTICOS, editorial LABOR, S.A. PAREY IN BERLIN AND HAMBURG, CALABOIA, 235. BARCELONA 15, 1975. PAGES. 29-50.

- 9.- HAMMERSEN, F. HISTOLOGIA: ATLAS EN COLOR DE CITOLOGIA, HISTOLOGIA Y ANATOMIA MICROSCOPICA, SEGUNDA EDICION. SALVAT EDITORES, S.A. MALLORCA 41, BARCELONA, ESPAÑA. 1982
PAGS. 1,2, 52, 78.
- 10.- HERRATH , E. VON: ATLAS DE CITOLOGIA, HISTOLOGIA Y ANATOMIA MICROSCOPICA HUMANA, SEGUNDA EDICION. EDITORIAL CIENTIFICO-MEDICO, BARCELONA, 1975,
PAGS. 23-35.
- 11.- HODGES, R.D. THE HISTOLOGY OF THE FOWL, ACADEMIC PRESS, INC. 24 OVAL ROAD, LONDON, 1974.
PAGS. 243-253
- 12.- HUMASON., G.L. ANIMAL TISSUE TECHNIQUES, FOURTH EDITION. W.H. FREEMAN AND COMPANY, SAN FRANCISCO, 1979.
PAGS. 135- 144- 212 -213.
- 13.- LEESON, T.S. y LEESON, C.R. HISTOLOGIA, CUARTA EDICION EDITORIAL INTERAMERICANA S.A. de C.V. MEXICO, D.F. 1984
PAGS. 106/127.
- 14.- MATTHEWS, L.L. MARTIN, J.H. ATLAS DE HISTOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA HUMANA, SALVAT EDITORES, S.A. MALLORCA 43, BARCELONA, ESPAÑA 1974.
PAGS. 40, 41, 50, 57, 102, 103.
- 15.- MAXIMOW, A.A., AND BLOOM, W, TEXTBOOK OF HISTOLOGY, FOURTH EDITION W.B. SAUNDERS COMPANY, LONDON, 1942.
PAGS. 54-55, 161 - 162.
- 16.- PREECE, ANN, PREECE, H.T. A MANUAL FOR HISTOLOGIC THECHNICIANS, THIRD EDITION. LITTLE, BROWN, AND COMPANY, BOSTON, 1972.
PAGS. 229, 251, 254, 269, 270, 350,352.
- 17.- SAMPEDRO, ED. OTEO PASEO DE LAS FACULTADES N: 20 CIUDAD UNIVERSITARIA,
1961.
PAGS. 238 241.