

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



“IDENTIFICACION HISTOQUIMICA DE CALCIO
EN TEJIDOS DE RATAS CON LAS TECNICAS
DE ROJO DE ALIZARINA Y DE VON KOSSA”.

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Oscar Enrique Rodríguez Carranza

ASESORES: MVZ. VICTOR BARRAGAN CANO

MVZ. JORGE HERNANDEZ GOBORA

GUADALAJARA, JAL.

1986

A Dios doy gracias porque me dió los medios para mi superación.

A mis padres que me han dado su apoyo y comprensión para ser alguien en la vida.

A las personas que por un motivo u otro me incitaron a seguir adelante.

A mis amigos y amigas más cercanos por su apoyo y amistad incondicional.

A mi jurado, que además de ser muy buenos maestros supieron ser buenos amigos.

A mis asesores, que además de la ayuda prestada son amigos de verdad.

Al personal técnico y docente de los Departamentos de Patología y Bioquímica de la F.M.V.Z., así mismo a los Departamentos de Investigación Científica y del Bioterrio del Centro de Investigaciones Biomédicas del IMSS, por la ayuda prestada.

I N D I C E

	PAGINA
TITULO	1
INTRODUCCION	2
OBJETIVOS	3
MATERIAL	4
METODOS	4
RESULTADOS	9
DISCUSION	11
CONCLUSIONES	14
SUMARIO	16
BIBLIOGRAFIA	17

" IDENTIFICACION HISTOQUIMICA DE CALCIO EN TEJIDOS
DE RÁTAS CON LAS TECNICAS DE ROJO DE ALIZARINA Y
DE VON KOSSA "

INTRODUCCION:

Debido a que bajo condiciones anormales de la actividad fisiológica celular se producen grandes acúmulos de calcio en tejidos que normalmente lo contienen en bajas cantidades, es necesario establecer la identificación de este elemento en las áreas calcificadas con el objeto de identificar las patologías que inducen a estas alteraciones en el metabolismo del calcio.

Ante tal circunstancia, se hace necesario el disponer de técnicas que puedan proporcionar datos precisos sobre la existencia de este mineral en los órganos o tejidos en donde normalmente no debe encontrarse en concentración elevada y a la postre, ocasione alteraciones en esas vísceras o tejidos.

La utilidad que tendrá esta tesis será la de dejar implementadas algunas técnicas, tanto en material como en la instrucción del personal del Departamento de Patología para ayuda en los diagnósticos, así como para instrumento educativo del alumnado de la Facultad de Medicina - Veterinaria y Zootécnica de la Universidad de Guadalajara.

Este trabajo formará parte de una serie de investigaciones para la mejoría diagnóstica del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la Universidad de Guadalajara.

OBJETIVO GENERAL:

Identificar la presencia de calcio mediante técnicas histoquímicas en tejidos que participan en el recambio de elementos celulares.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- a) Estandarizar las técnicas de Rojo de alizarina y la de Von Kossa para la identificación de calcio tisular.
- b) Comparar la especificidad de cada una de las técnicas.
- c) Dar una aplicación práctica a las técnicas implementadas con fines de diagnóstico.
- d) Continuar con la serie de trabajos propuestos por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para la identificación histoquímica de diferentes sustancias o elementos con fines de diagnóstico.

MATERIAL Y METODOS:

Se utilizarán para este trabajo nueve ratones adultos de ambos -- sexos a los cuales se les incorporará calcio por dos diferentes vías:

A tres ratones se les incorporará Ca por vía oral.

A tres ratones se les incorporará Ca por vía parenteral.

Los tres ratones restantes nos servirán como testigos.

La dosis de calcio que se le aplicará a cada uno de los ratones en experimentación será de 100 mg diariamente durante una semana, después de lo cual se procederá a sacrificarlos por medio de dislocación cervical. (La dosis normal de Ca para ratones es de 40 a 50 mg/día).

Los tejidos específicos a estudiar serán el riñón, el miocardio, el músculo estriado esquelético y el intestino en sus porciones duodenal, yeyunal e ileónica. Estos mismos tejidos se procesarán con las técnicas de inclusión de parafina para luego obtener cortes seriados de los diferentes órganos con un espesor de 6 micrómetros.

Después de esto, se teñirán con las respectivas técnicas en estudio. Por último, se obtendrán fotomicrografías para que posteriormente nos sirvan para hacer las observaciones.

Con el propósito de detectar posibles partículas de calcio en órganos blandos, para de esta forma identificarlo durante su transporte hacia los depósitos óseos, se modificará el modelo experimental de la forma siguiente:

A un ratón se le administrarán 200 mg de Ca divididos en tres partes (66.6 mg) por las vías oral, intraperitoneal e intramuscular respectivamente.

Transcurrida una hora después de haber sido administradas las dosis de calcio, se sacrificará al ratón y se seguirá el método inicial de procesamiento histológico.

A continuación se describen los procedimientos necesarios para realizar las técnicas de Rojo de alizarina y de Von Kossa:

TECNICA DE ROJO DE ALIZARINA

FIJACION: Se hará con una solución de formalina al 4% bufferada (pH 7).

SOLUCIONES: Rojo de alizarina 0.5 g
Fosfato a pH 9 100.0 ml

- PROCEDIMIENTO:
- 1) Desparafinar e hidratar las laminillas en agua.
 - 2) Teñir en Rojo de alizarina: 30 - 60 minutos.
 - 3) Enjuagar en la solución de fosfato pH 9 durante 5 segundos.
 - 4) Deshidratar en tres cambios con etanol absoluto - cada dos minutos.
 - 5) Aclarar en xileno.
 - 6) Montar en resina sintética.

RESULTADO: Las partículas de calcio se ven de un color rojo naranja.

METODO DE VON KOSSA

FIJACION: Se hará con una solución de formalina al 4% bufferada (pH 7).

SOLUCIONES: Nitrato de plata (AgNO_3) 5.0 g
Agua destilada 100.0 ml

Nota: Utilizar soluciones frescas. Nunca usar esta solución después de una semana.

Safranina (Solución al 1% acuosa).

- PROCEDIMIENTO:
- 1) Desparafinar e hidratar las láminas en agua destilada; remover en cloruro de mercurio (HgCl_2).
 - 2) Tratar con nitrato de plata en obscuro durante 30 minutos.
 - 3) Enjuagar completamente en agua destilada.

- 4) Exponer las laminillas en agua destilada a luz brillante (75 - 100 W) durante una hora. Luego colocarlas sobre un fondo blanco para exponer la reacción.
- 5) Lavar completamente en agua destilada.
- 6) Contrastar en safranina durante 2 ó 3 minutos.
- 7) Enjuagar en alcohol al 70%
- 8) Deshidratar en alcohol.
- 9) Aclarar en xileno.
- 10) Montar en resina sintética.

RESULTADOS: Los depósitos de calcio se verán de un color café oscuro al negro.

El núcleo y otros elementos tisulares se verán sombreados de un color rojo y rosa.

TECNICA DE ROJO DE ALIZARINA VARIANTE DE DAHL'S

FIJACION: Se hard con una solución de formalina al 4% bufferada (pH 7)

SOLUCIONES:

Rojo de alizarina	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml
Hidróxido de amonio	0.1 ml
Agua destilada	100.0 ml
Solución verde luz:	
Verde luz	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml
Acido acético glacial	1.0 ml

Nota: A la solución de Rojo de alizarina se le agregarán lentamente 10 ml de la solución de Hidróxido de amonio al 0.1% y mover constantemente.

La solución será estable durante un mes.

- PROCEDIMIENTO:
- 1) Desparafinar e hidratar en alcohol al 95%.
 - 2) Teñir en Rojo de alizarina durante 2 minutos.
 - 3) Enjuagar con agua destilada. 5 - 6 lavados.
 - 4) Tratar con solución verde luz durante un minuto.
 - 5) Lavar con agua destilada durante 10 segundos.
 - 6) Deshidratar en alcohol al 95%, alcohol absoluto. Dos cambios cada uno.
 - 7) Aclarar en xileno.
 - 8) Montar en resina sintética.

RESULTADOS: Sales de Ca.- Color rojizo intenso.
Fondo.- Verde pálido.

TECNICA DE VON KOSSA VARIANTE DE MALLORY

FIJACION: Se hará con una solución de formalina al 4% bufferada (pH 7)

SOLUCIONES:

Nitrato de plata	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml
Hiposulfito de sodio	5.0 g
Agua destilada	100.0 ml
Safranina (solución al 1% acuosa) ..	1.0 g
Agua destilada	100.0 ml

- PROCEDIMIENTO:
- 1) Desparafinar e hidratar en agua destilada.
 - 2) Tratar las laminillas con nitrato de plata. Exponer a la luz brillante (100 W) durante 30 minutos.
 - 3) Lavar en agua destilada.
 - 4) Tratar con la solución de hiposulfito de sodio durante 2 minutos.
 - 5) Lavar bien en agua destilada.
 - 6) Contrastar con safranina durante 5 minutos.
 - 7) Lavar en agua destilada.
 - 8) Deshidratar en alcohol al 95%, alcohol absoluto. Dos cambios en cada uno.
 - 9) Aclarar en xileno.
 - 10) Montar en resina sintética.

RESULTADOS: Sales de Ca.- Negro.
Citoplasma.- Rosado.

(3, 9, 12, 13, 19)

RESULTADOS:

Las pruebas con las técnicas de tinción de Rojo de alizarina y de Von Kossa para la identificación de calcio en modelos experimentales fueron negativas. Debido a lo anterior, se establecieron controles positivos fisiológicos y patológicos para comprobar la validez del procedimiento tintorial, éstos fueron secciones de fémur de feto porcino con los que se observaron resultados positivos ya que se hicieron evidentes zonas delimitadas con afinidad específica para calcio.

Esto no se observó con los tejidos experimentales, ya que estos no mostraron ningún aumento de afinidad tintorial selectiva por las áreas con minerales, de esta manera fue posible comprobar la utilidad de las técnicas empleadas, así como de demostrar la imposibilidad de observar calcio aún en condiciones de sobredosis de éste en los tejidos de los ratones.

Al realizar el otro modelo experimental, se tomaron para estudio los tejidos obtenidos de éste modelo y se repitieron las técnicas de tinción junto con los cortes de hueso fetal como control. Bajo estas condiciones, los resultados fueron diferentes a los iniciales ya que se pudieron identificar algunas partículas de calcio en el lumen intestinal y en el glucocalix de las células absorbentes del epitelio intestinal.

La identificación de este elemento no fue fácil, ya que además estaban presentes en las placas partículas extrañas y residuos de colorante que podían confundirse fácilmente. En la técnica de Rojo de alizarina no se consiguió un buen contraste lo que dificultó la apreciación del color rojo naranja que nos da la alizarina al reaccionar con el calcio, mientras que en la técnica de Von Kossa quedaban muchos residuos de plata que no reaccionaron con el calcio.

Con el objeto de poder resolver estos problemas se ensayaron otras variantes de estas técnicas que pudieran dar mejores resultados tal como la técnica de Von Kossa variante de Mallory y la técnica de Rojo de alizarina variante de Dahl's. Con estas los resultados fueron más satisfactorios, pues los cortes en estudio se observaron más claramente.

La identificación de calcio fue positiva mediante las técnicas - inicialmente propuestas en hueso fetal. Para comprobar la efectividad de las mismas cuando se aplican a tejidos blandos y no sólo en material óseo, se realizaron otras pruebas con el uso de tejidos patológicos sopechosos de calcificación como hígado, ganglios linfáticos y bazo de cerdo, con los cuales fue posible comprobar la afinidad tintorial que se observó en el material obtenido de fetos.

DISCUSION:

En cuanto a sus funciones, el calcio es un mineral necesario para el organismo, pues es esencial para la formación y normal consolidación de los huesos y además es un ingrediente importante del cemento intercelular. Como otras funciones importantes el calcio mantiene la contractilidad, ritmo y tonicidad del miocardio y antagoniza la acción de los iones sodio y potasio sobre el corazón. También es necesario para la activación de muchas enzimas, tales como las vinculadas a la coagulación de la sangre y de la leche. Actúa también en la contracción de todos los músculos, que además del corazón, actúa a nivel de las vellosidades intestinales para la absorción a nivel del canal alimentario.

(15, 17)

El calcio parece ser esencial para la permeabilidad celular selectiva y para que la excitabilidad neuromuscular se mantenga normal.

La regulación de calcio está a cargo de la parathormona y la calcitonina. Cuando esta concentración disminuye se libera parathormona y hay una movilización más intensa de elementos minerales del hueso, el cual actúa como almacén en el metabolismo del calcio y el fósforo.

(11)

El calcio se absorbe en la parte inferior del intestino delgado. La cantidad de calcio absorbido de la ingesta está influenciada normalmente por ciertos factores, como el pH y la posibilidad de formar sales insolubles; además se favorece por la presencia de cantidades adecuadas de fósforo y de vitamina D.

(17)

Los factores intestinales que influyen en la absorción del calcio son:

- a) pH.- Entre más alcalino sea el contenido intestinal, menor solubilidad tendrán las sales de calcio.

- b) Fosfatos. - Si la relación 2:1 de Ca y P es elevado, se formará bastante fosfato de calcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) y disminuirá la absorción.
- c) Presencia de ácidos grasos libres. - Cuando hay alteración en la absorción de las grasas, existen bastantes ácidos libres. Estos ácidos reaccionan con el calcio libre para formar jabones insolubles de calcio.
- d) Vitamina D. - Promueve la absorción de calcio en el intestino.

Aproximadamente dos tercios del calcio administrado por vía bucal se excreta en las heces y alrededor de un tercio se absorbe y retiene en el cuerpo. Con la orina se excreta una cantidad relativamente pequeña de calcio que pierde el organismo.

(1, 11, 27)

El exceso de calcio en el organismo nos producirá una calcificación, la cual puede ser de dos tipos:

- a) Calcificación local o distrófica.
- b) Calcificación general o metastásica.

La calcificación local es la deposición de calcio en un área focal del cuerpo. Ocurre cuando la cantidad de calcio en la corriente sanguínea es normal. Las sales se depositan en los tejidos que han experimentado un trastorno en el metabolismo celular o que son necróticos. La presencia de tejido animal muerto o agónico es la causa fundamental del depósito de calcio de este tipo.

(18, 22, 25)

La calcificación general es la descomposición de sales de calcio en muchos tejidos por todo el cuerpo. Ocurre cuando hay una cantidad excesiva de calcio en la sangre (más de 12 mg). Puede ser ocasionada por varios factores, como son:

- a) Hiperparatiroidismo.
- b) Gran cantidad de gránulos de sales de calcio en las paredes o lumen de los túbulos renales, que pueden ser el resultado de una excreción anormal de calcio y de hipercalcemia.

- c) Extensa calcificación de las paredes arteriales, ocasionada por la hipercalcemia producida por grandes excesos de vitamina D en la dieta.

La calcificación general ocurre cuando los neoplasmas, especialmente los tumores mieloides, están presentes en la médula del hueso. El aumento de la actividad metabólica en la cercanía del tumor causa la desmineralización del esqueleto y que la corriente sanguínea se invada de calcio.

(16, 21, 22, 25)

CONCLUSIONES:

1) El modelo experimental utilizado que se sugirió en este trabajo no fue el indicado porque el objetivo de éste era el de detectar - partículas de calcio en órganos normales, provocando una hipercalcemia transitoria y aumentar la cantidad de calcio en los órganos sin que se llegaran a formar depósitos, ya que el depósito de calcio en otros tejidos con excepción del óseo, se considera anormal o patológico (calcificación distrófica o metastásica).

(18, 22, 25)

2) Al duplicar la dosis diaria normal de calcio (50 mg) se inhibió su transporte activo a través de la mucosa intestinal ya que la absorción intestinal de calcio es más de un 10% de las necesidades normales disminuyen el índice de incorporación del mismo.

(10, 27)

3) La alta ingestión de vitamina D acompañada con la aplicación simultánea de calcio aumenta la absorción intestinal de éste elemento y aumenta su depósito en el hueso y otros tejidos provocando una calcificación metastásica. Si hubiéramos actuado de esa manera con los ratones, se hubieran obtenido tejidos anormales o patológicos, no siendo este el objetivo del modelo experimental.

(10, 18, 22, 25)

4) En el modelo experimental se aplicaron dosis elevadas de calcio con la adición de vitamina D, pero ésta no en dosis lo suficientemente elevadas como para provocar patologías en los órganos.

Cuando existe un exceso de calcio en el torrente circulatorio la calcitonina descende el nivel sérico del calcio garantizando así el tono cálcico. Existe un balance entre la parathormona y la calcitonina, el cual ayuda a que no haya un desbalance de este mineral en el organismo en condiciones normales. Esto hace que las cantidades de - calcio existentes normalmente en los tejidos (9 a 11 mg/100 ml) no -

puedan ser detectadas de esta manera mediante técnicas histoquímicas y utilizando un microscopio común.

(8, 18, 26)

5) Las técnicas histoquímicas usadas detectan muy bien las partículas cálcicas de los órganos afectados, pero la que nos da mejores resultados es la técnica de Von Kossa variante de Mallory, porque además de teñir mejor las partículas pequeñas, el color café oscuro que obtienen es de fácil localización.

(2, 5, 9, 12, 13, 14, 19, 20)

6) Nuestras técnicas no podrán ser usadas como diagnóstico en muertes causadas por dosis excesivas de calcio en ratones, pero sí podrán ser útiles para el diagnóstico de calcinosis en órganos patológicos de evolución crónica extensa.

(4, 18, 22, 25)

SUMARIO:

Se diseñó un modelo experimental para tratar de localizar calcio en órganos normales con la ayuda de técnicas histoquímicas. El modelo experimental contemplaba la aplicación de 100 mg de calcio diario durante una semana a ratones de los cuales se tomaron muestras de riñón, músculo estriado, miocardio e intestino.

Al realizar las técnicas con las muestras de tejido los resultados fueron negativos. Para demostrar la efectividad de las técnicas, se tomaron muestras de hueso fetal y los resultados con ellas fueron positivos.

Se diseñó otro modelo aplicando dosis masivas (200 mg) de calcio para tratar de localizar partículas de calcio en alguno de los órganos en estudio. Este mostró resultados positivos al encontrar partículas de calcio en el lumen intestinal y en el glucocalix de las células absorbentes del epitelio intestinal.

Se comprobó que las técnicas de Rojo de alizarina y de Von Kossa sirven para identificar partículas o acúmulos de calcio en los tejidos aunque se buscaron variantes de cada una de ellas para evitar la interferencia del exceso de colorante y de partículas de plata que no reaccionaron con el calcio.

Para observar la efectividad de las técnicas en órganos blandos se usaron tejidos sospechosos de calcificación como el hígado, ganglios linfáticos y bazo de cerdo, en los cuales se distinguen áreas bien definidas tintorialmente.

Se pudo observar que la técnica de Von Kossa variante de Mallory puede detectar acúmulos más pequeños de calcio que con la técnica de Rojo de alizarina, la cual necesita de acúmulos más grandes.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Blood D.C. - Henderson J.A. *Medicina Veterinaria. Editorial Interamericana* 4a. Edición. 1976. Pags. 784-7
- 2) Chaplin A.J. Calcium oxalate and the Von Kossa method with reference to the influence of citric acid. *Histochem J.* 7(5):451-8, Sep'85
- 3) Disbrey B.D. - Fack J.H. *Histological Laboratory Methods* E. & S. Livingstone. Edinburg and London, 1970. Pags. 210-1
- 4) Dos Santos. *Patología Especial de los Animales Domésticos. Editorial Interamericana* 2a. Edición. 1982. Pags. 314-5
- 5) Elbadawi A. Combined alizarin red reticulum stain for tissue localization of calcium deposits. *Am J Clin Pathol* 1981 Mar; 75(3): 355-6
- 6) *Enciclopedia Médica de Selecciones del Reader's Digest. El Gran Libro de la Salud* 1970. Pag.453
- 7) Garner R.J. *Toxicología Veterinaria. Editorial Acribia.* 1970. Zaragoza, España. Pag.67
- 8) Harper H.A. *Manual de Química Fisiológica. Editorial El Manual Moderno S.A.* 2a. Edición 1969. México, D.F. Pags.411-3. 439-40 442
- 9) Humason G.L. *Animal Tissues Technics. 4th Edition. W.H. Freeman and Company. San Francisco, Cal.* 1979. Pags.256-9
- 10) J.I. Kaneko/G.E. Cornelius. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals Vol.1 Academic Press* 1970. New York and London. Pags. 313-27
- 11) Kolb Erich. *Fisiología Veterinaria Vol.1. Editorial Acribia.* 2a. Edición 1976. Zaragoza, España. Pags.104-6, 137-9, 180-1
- 12) Lee G. Luna, HT (ASCP). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3th Edition. Mc Graw-Hill Book Company* 1968. Pags. 175-7
- 13) Lillie R.P./Harold M. Fullmer. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. 4th Edition. Mc Graw-Hill Book Company* 1976. Pags.537-43
- 14) Martoja R/Martoja M. *Técnicas de Histología Animal. Toray Mason S.A. Barcelona, España* 1970. Pags.239-43

- 15) Mc Dowall R.J.S. Manual de Fisiología y Bioquímica. Editorial José Ma. Cajica Jr. S.A. 42a. Edición. 1957. México-Buenos Aires. Pags. 579-81
- 16) Merck & Co., Inc. El Manual Merck de Veterinaria. MSD AGVET. 2a. Edición 1981. Pag. 170
- 17) Meyer-Jones. Farmacología y Terapéutica Veterinarias. UTEHA. 1980 México, D.F. Pags. 744-7
- 18) Norman F. Cheville. Patología Celular. Editorial Acribia. 1980. Zaragoza, España. Pags.68-71
- 19) Preece Ann H.T. A Manual for Histologic Technics. Little Brown and Company 1972. 3th Edition. Boston, Mass. Pags.324, 377-8
- 20) Puchtler H. Demonstration of Phosphates in calcium deposits; a modification of Von Kossa's reaction. Histochemistry 56 (3-4); 177-85, 12 Jul 78
- 21) Robertson F. Ogilvie. Histopatología. Editorial Interamericana 5a. Edición 1960. Pags.13-5
- 22) Russell A. Runnells. Principios de Patología Veterinaria. Compañía Editorial Continental, S.A. México, D.F. 1968. Pags.54-5, 192-4
- 23) Scott M.L., Young R.J., Nesheim M.C. Alimentación de las Aves. Ediciones Gea 1973. Barcelona, España. Pags.146, 273-6
- 24) Siegenthaler Walter. Fisiopatología Clínica. Ediciones Toray S.A. 1977. Pags.306-8
- 25) Smith H.A./Jones T.C. Patología Veterinaria. UTEHA México, D.F. 1980. Pags.45-7
- 26) Sodeman W.A. Jr./Sodeman T.M. Fisiopatología Clínica. 6a. Edición Editorial Interamericana. México, D.F. 1980. Pags.1112-3
- 27) Sporri H. Fisiopatología Veterinaria. Editorial Acribia. 1977. Zaragoza, España. Pags.86-7, 612-5