

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTORIAL DEL
COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON EN EL
ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO Y CEREBELO
DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)**

T E S I S

Para optar el Título Profesional de:

MÉDICO VETERINARIO

Presentada por la Bachiller

ANA JUDITH ABANTO VARGAS

Asesor:

M.Cs. M.V. Jorge Luis Portal Torres

CAJAMARCA – PERÚ

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



**DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTORIAL DEL
COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON EN EL
ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO Y CEREBELO
DE CONEJO (*Oryctolagus cuniculus*)**

T E S I S

Para optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentado por la Bachiller
ANA JUDITH ABANTO VARGAS

Asesor
M.Cs. M.V. Jorge Luis Portal Torres

Cajamarca – Perú
2014



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
NORTE DE LA UNIVERSIDAD PERUANA
Fundada Por Ley N°14015 Del 13 De Febrero De 1962
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
DECANATO

Av. Atahualpa 1050 – Ciudad Universitaria Edificio 2F – 205 Fono 076 365852



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las nueve de la mañana del día nueve de diciembre del dos mil catorce, se reunieron en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias “**César Bazán Vásquez**” de la Universidad Nacional de Cajamarca, los integrantes del Jurado Calificador, designados por el Consejo de Facultad, con el objeto de evaluar la sustentación de Tesis Titulada “**DETERMINACIÓN DE LA AFINIDAD TINTORIAL DEL COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE CEREBRO Y CEREBELO DE CONEJO (*Orytolagus cuniculus*)**”, presentada por la Bachiller en Medicina Veterinaria: **Ana Judith Abanto Vargas**.

Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación, y para los efectos del caso se invitó a la sustentante a exponer su trabajo.

Concluida la exposición de la Tesis, los miembros del Jurado Calificador formularon las preguntas que consideraron convenientes, relacionadas con el trabajo presentado; asimismo, el Presidente invitó al público asistente a formular preguntas concernientes al tema.

Después de realizar la calificación de acuerdo a las Pautas de Evaluación señaladas en el Reglamento de Tesis, el Jurado Calificador acordó **APROBAR** la sustentación de Tesis para optar el Título Profesional de **MÉDICO VETERINARIO**, con el Calificativo Final obtenido de **QUINCE (15)**.

Siendo las diez de la mañana del mismo día, el Presidente del Jurado Calificador dio por concluido el proceso de sustentación.

M.Cs. M.V. **JORGE BERNARDO GAMARRA ORTIZ**
PRESIDENTE

M.Cs. M.V. **EDUARD EGBERTO GUEVARA LARA**
SECRETARIO

Mg. M.V. **FERNANDO ALBERTO OBLITAS GUAYÁN**
VOCAL

DEDICATORIA

A Dios.

Por su inmensa misericordia e inefable amor, por sus cuidados y protección de cada día y por haberme heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo "sus padres".

A mis padres.

Quienes sin escatimar esfuerzo alguno sacrificaron gran parte de su vida para educarme. Gracias por su apoyo moral, su cariño y comprensión que desde niña me han brindado, por guiar mi camino y estar junto a mí en los momentos más difíciles, sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo, comprensión y confianza, sólo espero que comprendan que mis ideales, esfuerzos y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes. Los amo.

A mi hermano.

Por su apoyo, confianza, comprensión y amistad incondicional, por estar siempre presente a lo largo de mi vida.

A mi gran amor.

Por tu paciencia, amor, comprensión y sacrificio me inspiraste a ser mejor para ti, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, gracias por estar siempre a mi lado y compartir mis tristezas y alegrías. Te amo.

La Autora

AGRADECIMIENTO

Agradezco en primer lugar a Dios quien me dio la vida y la ha llenado de bendiciones en todo este tiempo, a él que con su infinito amor me ha dado la sabiduría suficiente para culminar mi carrera universitaria. A mis padres, a quienes jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, comprensión y apoyo brindado en los momentos buenos y malos de mi vida, hago este triunfo compartido, sólo esperando que comprendan que mis ideales y esfuerzos son inspirados en ustedes. A mi hermano que ha sido un amigo fiel y sincero en el que he podido confiar y apoyarme para seguir adelante.

A mis profesores y en especial a mi asesor, M.Cs. M.V. Jorge Luis Portal Torres por su guía y apoyo incondicional durante el desarrollo del presente trabajo de investigación. Este trabajo simboliza mi gratitud por toda la responsabilidad e invaluable ayuda que siempre me ha proporcionado.

A la Universidad Nacional de Cajamarca y en especial a la Facultad de Ciencias Veterinarias, por permitirme crecer en todos los aspectos de mi persona, por ofrecerme todas las actividades que contribuyeron a mi educación que me ha permitido formarme como profesional útil para la sociedad y porque aquí he vivido la mejor etapa de mi vida.

La Autora

RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la Provincia de Cajamarca-Perú, con el objetivo de determinar la afinidad tintorial del tejido del cerebro y cerebelo de conejo, con la técnica de coloración tricrómica de Masson. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. La técnica de coloración tricrómica e Masson, se realizó en la Universidad Peruana Cayetano Heredia-Lima. La afinidad del tejido nervioso del cerebro y cerebelo por el colorante tricrómico de Masson, tiene buenos resultados con los elementos celulares (neuronas), más no con las células del sistema glial y fibras nerviosas.

Palabras Claves: Coloración tricrómica de Masson, tejido nervioso, conejo.

ABSTRACT

This research was conducted in the Province of Cajamarca-Peru, with the aim of determining the staining affinity of the tissue of the brain and cerebellum of rabbit, with the technique of Masson trichrome staining. The samples we reprocessed at the Laboratory of Embryology and Histology, Faculty of Veterinary Sciences, National University of Cajamarca. The technique and Masson trichrome stain in was performed at the Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima. The affinity of nervous tissue of the brain and cerebellum by Masson trichrome stain, has good results with the cell elements (neurons), but not with glial cells and nerve fiber system.

Keywords: Masson trichrome coloration, nervetissue, rabbit.

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTO	
RESUMEN	
ABSTRACT	
	Pág.
CAPÍTULO I	
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	2
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO.....	3
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
CAPÍTULO V	
CONCLUSIONES.....	31
CAPÍTULO VI	
REFERENCIAS.....	32
ANEXO	35

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La afinidad de los elementos celulares, fibrilares y constitutivos intersticiales de un determinado tejido orgánico, tienen diferente apetencia por los colorantes de uso cotidiano ácidos o básicos, de tal manera, que al final de la coloración, cada uno muestra diferente apetencia por determinado colorante. Este principio fundamental ácido o básico que muestran los tejidos de un órgano, determinan la química de lo que están formados estos elementos estructurales del tejido. Por lo tanto; en los órganos de los animales o del hombre, habrá elementos acidófilos y basófilos de acuerdo a su afinidad tintorial.

Durante la elaboración de una muestra de tejido animal o vegetal para su estudio de los elementos constitucionales microscópicos, se siguen determinados pasos exigidos de acuerdo a una técnica específica de preparación y coloración, el profesional especialista en preparados histológicos o histopatológicos; en estos casos, debe estar plenamente capacitado para interpretar los resultados y emitir un diagnóstico del preparado o corte microscópico.

Es necesario explicar, que el cerebro y cerebelo están constituidos por estructuras que necesitan una técnica de coloración especial, en este caso, el colorante tricrómico de Masson que será utilizado en conejos tiene buenos resultados de coloración.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la afinidad tintorial del tejido cerebral y cerebelar de conejo, con los colorantes usados en la coloración tricrómica de Masson.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Diferenciar los elementos estructurales del tejido cerebral y cerebelar del conejo, que tienen afinidad al colorante tricrómico de Masson.

HIPÓTESIS

Los elementos estructurales del tejido nervioso del cerebro y cerebelo de conejo, tienen afinidad al colorante tricrómico de Masson.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Histología del cerebro

La corteza cerebral tiene varias cualidades únicas que le han permitido desarrollar rápidamente en un corto espacio de tiempo evolutivo, sin alterar el resto del sistema nervioso. En particular, su papel es analizar los sentidos y dirigir la actividad del resto del sistema nervioso, sin estar involucrado en la limpieza básica y regulación corporal. La palabra corteza significa una capa externa como la corteza de un árbol. La corteza cerebral es una lámina de neuronas y glía que cubren el cerebro, una de las características más llamativas de la corteza cerebral es lo poco que su estructura celular varía de región a región, incluso entre las áreas que se ocupan de diferentes tipos de información sensorial. Esto refleja la naturaleza abstracta del procesamiento cortical. La corteza del cerebro está constituida por neuronas piramidales, prolongaciones nerviosas y elementos de la glía de soporte. La organización general neuronal de la corteza es, comenzando por la periferia, la siguiente: capa molecular (I), capa granular externa (II), capa piramidal externa (III), capa granular interna (IV), capa piramidal interna (V) y capa multiforme (VI). Las neuronas de tipos similares tienden a ocupar la misma capa de la corteza cerebral, aunque cada una de éstas se compone de diferentes tipos celulares. Para facilitar la descripción, las neuronas a menudo se clasifican en dos grandes grupos: células piramidales y células estrelladas o no piramidales. Los somas de las células piramidales tienen forma de pirámide con una larga dendrita apical, generalmente orientada

hacia la superficie de la corteza cerebral y atravesando las capas un único axón penetra en la sustancia blanca subyacente. Estas células se observan en las capas II, III y V y en menor número en la capa (VI). En la capa piramidal interna (V) del lóbulo frontal existen grandes neuronas piramidales (células de Betz). El soma de las células estrelladas (no piramidales) no es piramidal y no poseen dendrita apical. Ellas aparecen en todas las capas de la corteza cerebral, concentrándose en la capa granular interna (IV). Los impulsos que llegan a la corteza, alcanzan inicialmente a las células estrelladas, de las que se transmite a las células piramidales por medio de los axones verticales de las células no piramidales. Los axones de las células piramidales salen de la corteza, dirigiéndose a otras zonas cerebrales y a la médula espinal. El trabajo principal de la corteza cerebral es analizar, predecir y responder a los acontecimientos ambientales (Watson *et al.*, 2010).

La Fijación dentro de la técnica histológica

La fijación es el paso fundamental detrás del estudio de la patología y esencialmente existe para prevenir la autólisis y la degradación de los componentes del tejido, de tal manera que se pueden observar tanto anatómicamente y microscópicamente después de seccionamiento. Existe un gran número de fijadores que se usan durante décadas, o en el caso de formaldehído más de un siglo, mientras que otros sólo se han creado en los últimos 10 años. Para tratar de clasificar los fijadores se pueden colocar en dos categorías: físicos y químicos (oxidantes y reductores). De tal modo, si un investigador desea estudiar la estructura de gotas de grasa, fijará los tejidos en formaldehído u otros agentes químicos que estabilicen las grasas y evitar el empleo de alcohol u otros productos orgánicos que extraigan los lípidos del tejido. Se emplean fijadores que estabilizan o coagulan las proteínas, para preservar la estructura general del núcleo y del citoplasma, que lógicamente contienen sustancias proteicas. Por otro lado, se obtiene

mayor resolución y menor distorsión de las estructuras celulares cuando se utilizan fijadores que producen coágulos finos, eludiendo aquellos que lo hacen en forma grosera. El formaldehído, suscita una precipitación proteica que permite una alta resolución sin producir distorsión aparente de las estructuras. Actualmente se dispone de métodos de coloración para detectar la actividad enzimática, el fijador empleado para este propósito ha de ser muy suave, pues la mayoría de los fijadores químicos tienden a dañar las enzimas hasta inactivarlas, siendo por tanto imposible detectarlas. Puede preservarse la actividad enzimática congelando los tejidos frescos en ciertas condiciones, o el tratamiento posterior muy breve con formaldehído diluido u otros agentes fijadores. Por lo tanto, la fijación puede definirse como un procedimiento mediante el cual una estructura celular se conserva o se estabiliza, para su posterior observación en preparaciones microscópicas. (Howat y Wilson, 2014)

Fijadores químicos

Los fijadores tienen por finalidad detener la vida de las células e impedir las modificaciones post mortem que pueda sufrir la célula (procesos autolíticos), manteniendo la estructura morfológica de células y tejidos sin que ocurran cambios notables en ellos. Esto se consigue inmovilizando (por coagulación o precipitación) las moléculas proteínicas e inhibiendo principalmente las enzimáticas haciéndolas insolubles. Esta acción garantiza la integridad de las células y tejidos. Existen fijadores a base de alcohol, por ejemplo el karnoy el cual es un buen fijador para el glucógeno, para los hidratos de carbono y para las proteínas fibrosas. Es bueno para visualizar los ácidos nucleicos, aunque no la morfología nuclear. Puede producir retracciones tisulares; está formado por etanol absoluto 60 %, cloroformo 30 % y ácido acético glacial 10 %. Otro ejemplo tenemos el líquido de bouin que está formado por ácido pícrico, formaldehído y ácido acético glacial. Es una solución muy utilizada para el procesamiento de

tejidos que se incluirán en parafina y a cuyas secciones se le pueden aplicar un amplio espectro de tinciones. Es muy útil para tejidos blandos y embriones, preserva bien el núcleo y el glucógeno. Antes de la inclusión en parafina es conveniente eliminar el ácido pícrico mediante lavados en alcohol de 70°, porque puede hacer que no se produzca una buena inclusión o que las tinciones no sean adecuadas. Pero sin duda, el fijador más investigado por su mecanismo de acción es el formaldehído, el cual actúa mediante la formación de puentes entre las moléculas tisulares. Se utiliza a concentraciones próximas al 4 %. Es un fijador ampliamente usado por la buena preservación del tejido, actúa como conservante, produce poca retracción tisular, es un buen fijador para lípidos, es compatible con la mayoría de las tinciones histológicas, incluidas las de inmunocitoquímica e hibridación de ácidos ribonucleicos. Las propiedades más resaltantes de los fijadores son: 1) Impiden la autólisis; 2) Endurecen los tejidos para facilitar su corte; 3) Mejora el efecto de los colorantes por su acción mordiente; 4) Minimiza el filtrado de muchos elementos resultantes del procesamiento histológico; 5) Estabiliza los componentes estructurales para conservarlos lo más parecidos posible a las condiciones in vivo; 6) Como efecto antiséptico protege a las personas que manipulan las muestras (Montalvo, 2010).

Histología del cerebelo

El cerebelo es un órgano impar y medio, perteneciente al SNC, alojado en la cavidad craneana, más concretamente en la fosa posterior. El patrón histológico de la corteza, es básicamente igual en todas las áreas y se puede considerar que es la suma de multitud de unidades histofuncionales conocidas como laminillas. El cerebelo es una estructura que presenta un eje de sustancia blanca central rodeado por la sustancia gris periférica que se denomina corteza y que acaba en la superficie del órgano revestido por las meninges. En la corteza podemos diferenciar dos capas de morfología muy diferente, que desde la sustancia blanca hasta las meninges son: la

capa granulosa, granular o de los granos y la capa molecular o plexiforme. En el límite entre las dos capas, llama la atención la disposición de los somas de unas neuronas grandes: las células de Purkinje, que se sitúan alineados y algo separados entre sí y que ocasionaron que la mayoría de los tratados lo consideren una capa individualizada. Estas células son posiblemente las más importantes de la corteza. En la inmensa mayoría de los tratados se describen tres capas en la corteza cerebelosa: granulosa, de las células de Purkinje y molecular, aunque también se puede considerar la existencia de la primera y la última, puesto que los somas de las células de Purkinje no forman una capa continua. La capa granulosa está ocupada por innumerables somas redondos de células pequeñas, cuyos núcleos presentan cromatina relativamente densa, lo que les confiere un aspecto linfocitoide. El elemento celular predominante es el grano del cerebelo. Junto a ellas existen otros elementos conocidos como células estrelladas grandes. Por otro lado la capa molecular fundamentalmente está constituida por un plexo muy tupido de axones y dendritas, entre el que se distribuyen como salpicados los somas de los únicos elementos neuronales que residen en ella y que son las células estrelladas pequeñas, que pueden ser superficiales (células estrelladas de la terminología actual) y profundas (células en cesta). Las células estrelladas son neuronas de soma pequeño, poligonal o estrellado, que alberga un núcleo de cromatina laxa y un citoplasma con pocos organoides. Las dendritas que se ramifican en el plano transversal, parten de cinco o seis troncos dendríticos principales y generan un plexo circunscrito de ramas varicosas provistas de espinas. Las células en cesta son elementos cuyo soma está justo por encima de la hilera de somas de Purkinje, presenta morfología triangular o estrellada. Tienen un núcleo lobulado y excéntrico, además su citoplasma posee escasos organoides concentrados en el polo que deja libre el núcleo; los grumos de Nissl son pequeños y escasos, el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático liso son poco prominentes. Las dendritas que se ramifican en el plano transversal pueden ser cortas y descendentes, pero lo habitual es que asciendan hasta el tercio superior de la capa plexiforme. Existen dos tipos de

fibras aferentes que llegan a la corteza cerebelosa: Las fibras musgosas y las fibras trepadoras, ambas ingresan en la corteza desde la sustancia blanca y van a conectar con elementos neuronales de la misma. Las fibras musgosas son gruesas fibras mielínicas que penetran en el cerebelo por cualquiera de los pedúnculos y que después de dividirse profusamente en la sustancia blanca, dan ramas que terminan en los núcleos grises. Y las fibras trepadoras son fibras de menor diámetro que las musgosas que penetran a través de los pedúnculos cerebelosos, éstas atraviesan la capa granulosa de forma casi rectilínea alcanzan el nivel del soma de las células de Purkinje, la fibra pierde la mielina y da colaterales ascendentes que trepan a modo de lianas por los troncos dendríticos principales. (Fernández, 2014)

Tinción tricrómica de Masson

La técnica histoquímica de coloración tricrómica de Masson diferencia mediante tres colorantes distintos, tres tipos de estructuras, como son los núcleos, el citoplasma y el tejido conjuntivo. Ésta técnica se aplica a biopsias fijadas en formol tamponado al 10 %, por lo cual será necesario desparafinar e hidratar. Además, cada paso que lleva la técnica requiere tiempos largos, de tal manera que el tiempo total necesario para su realización es de 60 minutos. Fundamento: En primer lugar se tiñe las secciones con un tinte ácido tal como escarlata de Biebrich. Todos los elementos acidófilos del tejido tales como el citoplasma, el músculo y el colágeno se unirán a los tintes ácidos. Las secciones entonces se tratan con ácido fosfotúngstico y/o fosfomolibdico, ya que el citoplasma es mucho menos permeable que el colágeno; los ácidos fosfotúngsticos permiten que la escarlata de Biebrich se difunda hacia afuera del colágeno, pero no del citoplasma. Los ácidos fosfotúngsticos y/o fosfomolibdicos tienen numerosos grupos ácidos que probablemente actúen como medio de unión entre el colágeno y el azul de la anilina que es el tinte de colágeno. Probablemente el pH de la solución fosfotúngstico y fosfomolibdico también aumente la coloración y ayude al

colágeno en la difusión o el retiro de los colorantes. Cualquier tejido con componente conjuntivo, en especial con contenido en fibras colágenas, puede servir como control o ser un tejido diana. Cualquier fijador es válido, si bien es de elección la solución de Bouin. El colorante tricrómico de Masson da buenos resultados al investigar los elementos de constitución de los tejidos: cartilaginoso, renal, muscular, hígado, epidídimo, suprarrenal, piel, cristalino, sistema nervioso central, ganglio parasimpático, etc. Los resultados son igual de válidos que la técnica realizada en biopsias fijados con formol e incluidos en parafina. Obtenemos como conclusión que ésta técnica es aplicable a todo tipo de biopsias sin fijar y cortadas mediante congelación, es una técnica muy útil para comprobar el grado de fibrosis en una biopsia, pudiendo dar el diagnóstico en un tiempo muy corto (Pizago *et al.*, 2006).

Fundamento de la técnica de inclusión en parafina

La inclusión es el procedimiento más utilizado que se realiza para poder cortar los tejidos tratados en secciones suficientemente delgadas que permitan el paso de la luz, de modo que los detalles finos puedan ser observados con distintos microscopios en sus diversas capas. Aunque los tejidos adquieren cierta consistencia al ser sometidos a la fijación, por lo general continúan siendo demasiado blandos para poder cortarlos en láminas delgadas; por lo tanto es necesario que la porción de tejido a estudiar infiltre y englobe dentro de sí una sustancia líquida o semilíquida, de modo que una vez solidificada adquiera la suficiente dureza para formar bloques que puedan cortarse. La parafina es un hidrocarburo saturado de cadena lineal, es un residuo del petróleo obtenido por destilación del crudo de color blanquecino, insoluble en agua, soluble en cloroformo y en xilol. Es muy estable químicamente, a temperatura ambiente se solidifica y funde a temperaturas comprendidas entre 33 y 60°C, se emplea para elaborar productos de laboratorio, farmacéuticos, cosméticos, fabricación de aislantes e impermeabilizantes. Tiene amplias aplicaciones industriales, se puede

mezclar con otros materiales que le proporcionan una gama de funciones deseables. *Toma de la muestra.* La muestra debe ser tratada en forma cuidadosa con el instrumental, para evitar lesiones traumáticas de los tejidos. Para la toma de la muestra se debe utilizar escarpelos en buen estado de corte con la finalidad que durante el proceso no se presenten los artefactos. La muestra a obtener debe medir aproximadamente 1 cm cúbico, suficiente para obtener rebanadas delgadas en el micrótopo. *Fijación.* Es el procedimiento de la técnica histológica que tiene como finalidad conservar de manera permanente una estructura lo más semejante al estado que tenía in vivo. Inmediatamente obtenida la muestra debe colocarse en un frasco de vidrio transparente y colocarlo en el tanque de inseminación artificial que contiene nitrógeno líquido hasta su homogenización total de la muestra. *Deshidratación.* Es el proceso que tiene por finalidad la remoción o eliminación completa del agua contenida en los tejidos o muestra tisular, para que se pueda embeber adecuadamente en un medio de inclusión no hidrosoluble, para que se solidifique y así permitir el corte de los tejidos. Las muestras se someten a concentraciones crecientes de alcohol etílico, con el fin de eliminar el agua de las células para que estos espacios sean reemplazados con parafina. *Aclaramiento.* Son sometidos a xilol con la finalidad de eliminar la grasa de las células y aclarar el tejido. *Inclusión.* El tejido se incluye en parafina líquida para formar los tacos de parafina, para pegarlos al micrótopo para su corte. *Microtopía.* Corte de rebanadas finas en el micrótopo entre 4-8 micras de espesor (Alzola, 2001).

Principios de tinción

Todos los componentes estructurales de las células poseen densidades ópticas parecidas, que sería imposible diferenciarlas. Las tinciones son el único modo de lograrlo. Hoy en día se cuenta con miles de tinciones y combinaciones de las mismas, su reacción con las células y los tejidos varía mucho. Algunos colorantes son muy selectivos para ciertos componentes

celulares o titulares. El rojo S de alizarina y la oxitetraciclina tiene capacidad para los sitios de formación de la matriz ósea. Hay otras especiales para algunos materiales celulares (mitocondrias, aparato de Golgi y núcleo) y extracelulares (fibras reticulares, elásticas y colágenas). Algunas no son selectivas y tiñen a los componentes celulares y extracelulares. La hematoxilina (H) y eosina (E) son inespecíficos y se usan con mucha frecuencia en histología. La eficacia de una coloración ácida o básica radica en la distribución de las cargas aniónicas y catiónicas relacionadas con las proteínas y complejos proteínicos (lipoproteínas y glicoproteínas) en las células y en los tejidos. La carga neta sobre estas sustancias está en función del número total y la naturaleza de sus radicales ionizables y del pH de su medio (Romero, 2002).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca; los cortes histológicos y la tinción se realizó en el Laboratorio de Patología de la Universidad Peruana Cayetano Heredia - Lima.

Características geográficas y meteorológicas (*):

- Altitud	:	2678 msnm
- Latitud sur	:	07 ° 9' 8''
- Temperatura promedio anual	:	14.75 °C
- Temperatura mínima promedio anual	:	8.63 °C
- Temperatura máxima promedio anual	:	21.45 °C
- Precipitación pluvial anual	:	80.18 mm
- Humedad relativa promedio anual	:	68.92 %
- Clima	:	Templado seco

(*)Fuente: SENAHMI, Boletín Meteorológico Nacional 2013.

3.2 MATERIALES

3.2.1 Material experimental

- Diez conejos de distinta edad y sexo.

3.2.2 Material de laboratorio

- Microscopio compuesto con cámara incorporada
- Láminas porta y cubre objetos
- Baño María
- Estufa
- Refrigeradora

3.2.3 Reactivos

- Etanol absoluto
- Xilol
- Parafina
- Set de coloración tricrómica de Masson
- Albúmina glicerinada
- Bálsamo de Canadá
- Solución de escarlata-fucsina ácida
- Líquido de Bouin
- Solución de ácido fosfomolibdico - fosfotúngstico
- Colorante azul de anilina
- Ácido acético al 1 %
- Solución de hematoxilina férrica

3.2.4 Material de campo

- Guantes quirúrgicos
- Mandil
- Equipo de disección
- Frascos de vidrio para recolección de muestras
- Formol bufferado al 8%

- Cámara fotográfica
- Libreta de apuntes

3.2.5 Material de escritorio

- Papel bond
- Computadora
- Impresora
- Lapiceros
- Lápices
- Folders
- Memoria USB
- Material bibliográfico

3.3 METODOLOGÍA

A. Selección de los conejos

Los conejos que se utilizaron durante la fase experimental del proyecto fueron 10, de distinta edad y sexo, los cuales se compraron de diversos puntos de venta de la ciudad, aparentemente sanos.

B. Toma de la muestra

- 1) Para la toma de la muestra los conejos fueron sacrificados por degüello.
- 2) Posterior al sacrificio de los conejos, se realizó la disección del cráneo de los animales, haciendo incisiones en cruz, se levantaron los huesos parietales hasta el borde del hueso occipital.
- 3) Se inspeccionó el cerebro y cerebelo por encima de las meninges
- 4) Seguidamente, se tomó la muestra de cerebro y cerebelo.
- 5) Inmediatamente la muestra tomada se depositó en un frasco de vidrio con el fijador formaldehído bufferado al 8%.

C. Método de inclusión en parafina

- 1) **Deshidratación.** Las muestras fueron sometidas a alcohol etílico de concentración ascendente a 80°C, durante una hora, a 90°C durante una hora, a 100°C, durante una hora, con la finalidad de deshidratar a los elementos celulares, para que en algún momento de la técnica los espacios de líquido de las células sean reemplazados con parafina líquida con la finalidad de facilitar el corte (Alzola, 2001).

- 2) **Aclaramiento.** Las muestras de tejido cerebral y cerebelar deshidratadas fueron sometidas a tres baños de xilol, con la finalidad de aclarar las estructuras celulares para facilitar la afinidad a la técnica de coloración (Alzola, 2001).
- 3) **Impregnación.** Terminado el proceso de aclaramiento por tres horas, las muestras se colocaron a soluciones de concentración creciente de parafina líquida a 60°C, con el fin de rellenar los espacios vacíos de los elementos celulares, con el objetivo de facilitar el corte histológico (Alzola, 2001).
- 4) **Confección de tacos.** Las muestras fueron puestas en bases metálicas, luego se le agregó la parafina líquida y se las dejó enfriar al aire libre por 24 horas para obtener los tacos, luego permanecieron por 72 horas en refrigeración para su posterior corte y coloración. (Alzola, 2001)

D. Microtomía y técnica de coloración: Los cortes histológicos y la técnica de coloración se realizó en la Universidad Peruana Cayetano Heredia - Lima, según la técnica de coloración tricrómica de Masson (Pizago *et al.*, 2006).

E. Lectura de láminas e interpretación: Se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

3.4 DISEÑO ESTADÍSTICO

En el presente trabajo de investigación, se hizo uso de las diferentes herramientas para el trabajo descriptivo, como es la confección de tablas con la finalidad de evaluar la calidad de tinción de un colorante,

a fin de poder realizar la descripción de las microfotografías histológicas.

3.5 CRITERIOS PARA EVALUAR LA CALIDAD DE TINCIÓN DEL COLORANTE TRICRÓMICO DE MASSON.

BUENA

- Coloración homogénea.
- Sin presencia de precipitados de colorante.
- Nitidez notable, lo que facilita la identificación de los diferentes componentes y estructuras histológicas.

REGULAR

- Moderada afinidad del tejido hacia el colorante
- Estructuras histológicas poco visibles.
- Coloración opaca, lo que dificulta la identificación de estructuras histológicas.

MALA

- Leve grado de afinidad del tejido hacia el colorante, por lo que las estructuras histológicas no son muy visibles.
- Estructuras histológicas no identificables.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

TABLA 1. Efecto de la afinidad tintorial de la coloración tricrómica de Masson sobre los elementos estructurales del tejido cerebral de conejo.

CEREBRO	CALIDAD DE TINCIÓN		
	BUENA	REGULAR	MALA
CORTEZA CEREBRAL		Células piramidales basófilas con núcleos centrales dentro de una sustancia fibrilar homogénea	
SUSTANCIA BLANCA			Tejido parenquimatoso fibrilar sin afinidad al colorante, muestra una coloración homogénea rosa pálido
PLEXOS COROIDEOS		Células cúbicas basófilas con núcleos prominentes de color azul oscuro y citoplasma rosa. Corion con presencia de células conectivas	

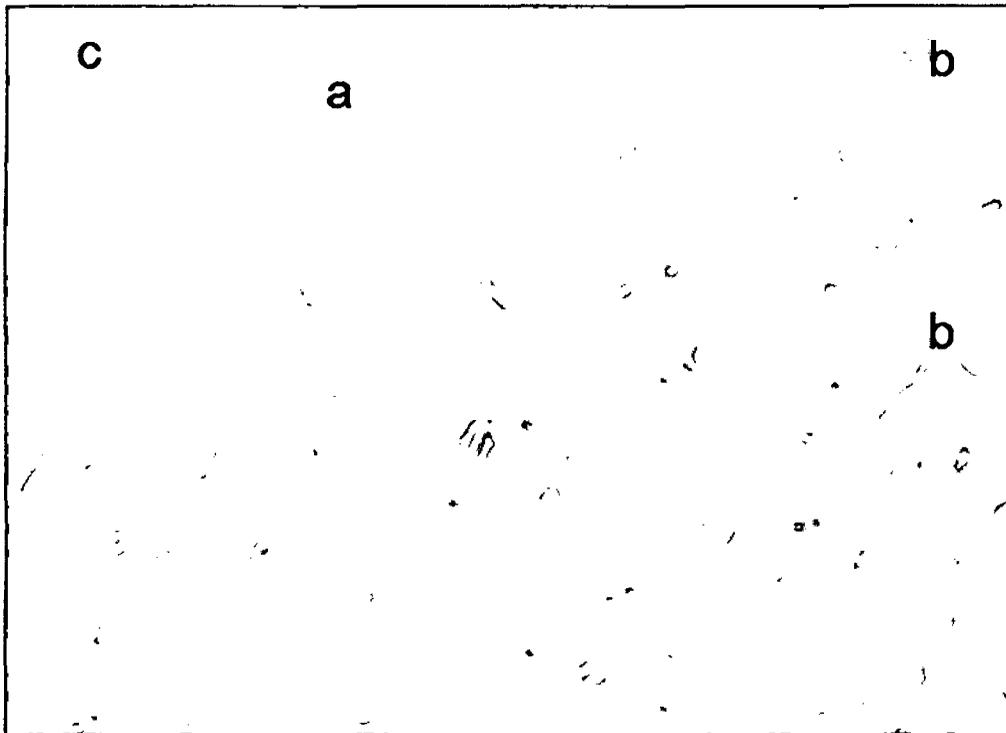
Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

TABLA 2. Efecto de la afinidad tintorial de la coloración tricrómico de Masson sobre los elementos estructurales del tejido cerebelar de conejo.

CEREBELO	CALIDAD DE TINCIÓN		
	BUENA	REGULAR	MALA
CORTEZA CEREBELAR		Células granulares basófilas de la corteza cerebelosa poco definidas. Células de Purkinje de color rosa pálido	Capa molecular y prolongaciones dendríticas sin afinidad al colorante. Se aprecia pocas células estrelladas dentro de un tejido homogéneo
SUSTANCIA BLANCA			Las fibras mielínicas sin afinidad al colorante. Se muestran como una sustancia homogénea de color rosa pálido

Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

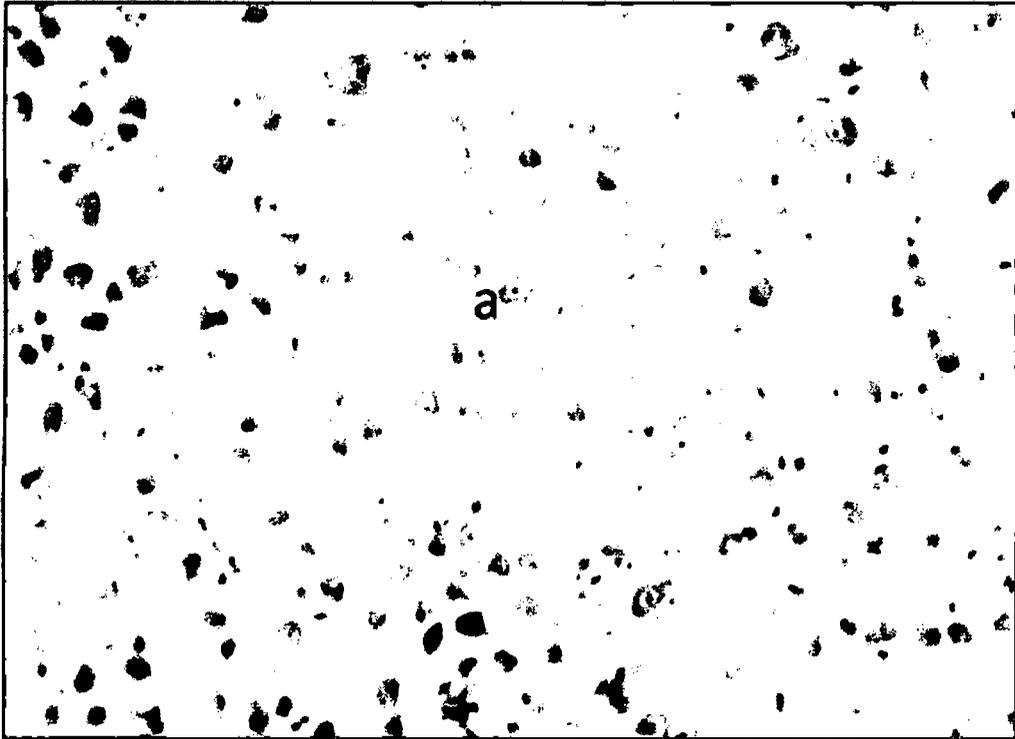
DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA DE LOS ELEMENTOS ESTRUCTURALES DEL TEJIDO CEREBRAL Y CEREBELAR DE CONEJO.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Tejido cerebral: Capa molecular. Coloración tricrómica de Masson (100x).

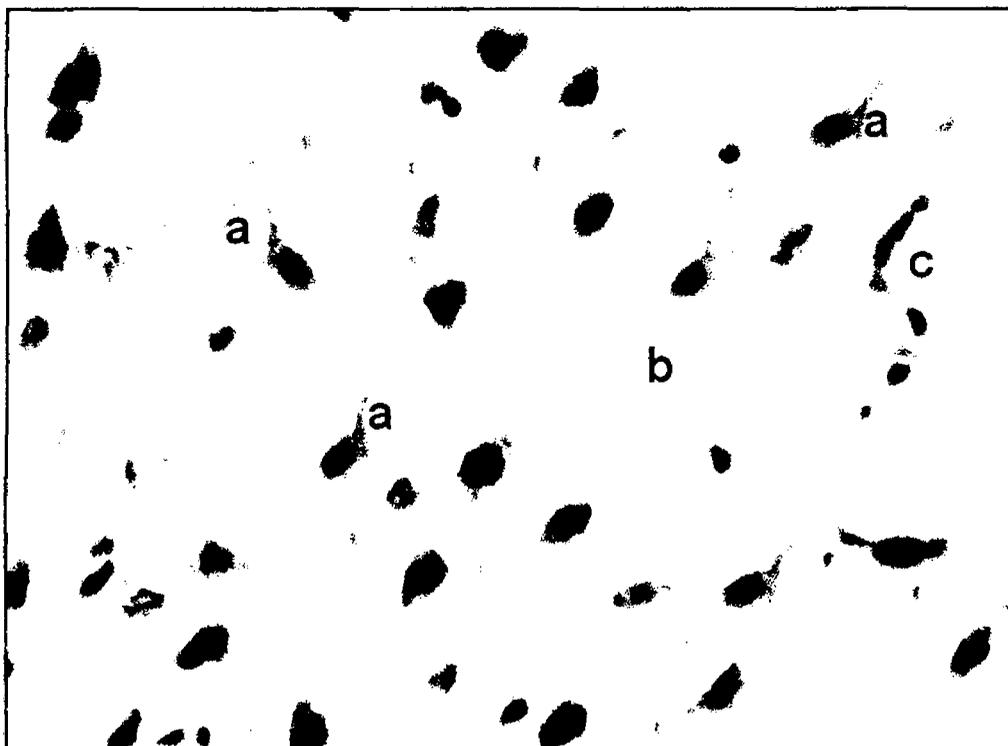
Microfotografía 01. (a) Fibras nerviosas horizontales teñidas de color rosa pálido, **(b)** Pequeños capilares sin notoriedad endotelial, **(c)** Delgada capa de la piamadre.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Corteza cerebral: Capa granulosa externa o de las pirámides pequeñas. Coloración tricrómica de Masson (100x).

Microfotografía 02. (a) Células piramidales basófilas con pequeños núcleos centrales.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Corteza cerebral: Capa ganglionar (estrato interno de las células piramidales). Coloración tricrómica de Masson. (100x)

Microfotografía 03. (a) Células piramidales grandes basófilas con tallo ascendente, (b) Tejido parenquimatoso fibrilar coloreado homogéneamente de color rosa pálido, (c) Vasos sanguíneos sin notoriedad de revestimiento endotelial.

La Microfotografía 02 muestra el tejido parenquimatoso de la corteza cerebral. Por debajo de una delgada capa molecular aparecen las primeras células piramidales pequeñas de color rosa, pertenecientes a la capa granular externa. Del mismo modo en la Microfotografía 03 se observa la extensión de la capa piramidal externa (de las células piramidales) coloreadas de rosa pálido, donde se detalla la presencia de células piramidales con prolongaciones dendríticas ascendentes (capa piramidal interna o de las grandes células piramidales). Las neuronas están

distribuidas entre muchas células neurogliales, el cuerpo celular está teñido con fuerza de color rosado, con núcleo redondo y de tinción pálida. Apreciaciones que se comparte con López, (1982) y Motta (1974), quienes manifiestan que cuando se utiliza el colorante tricrómico de Masson, identifica constitutivos celulares y estructuras fibrilares en órganos parenquimatosos, especialmente en cerebro, cerebelo, tejido renal, hipófisis, epífisis. A la observación microscópica se observan los elementos celulares con núcleos rosado pálido o azul violáceos. Dependiendo del tiempo de coloración las fibras nerviosas pueden ser observadas de color azul claro y las conectivas de color rosa. Si la muestra es tratada por tiempo prolongado, los elementos fibrilares pueden tener la tonalidad azul oscuras, núcleos de color rojo pálido, fibras colágenas de color verde amarillentas. Igualmente, Motta, (1974), señala que a la observación microscópica de una lámina histológica del tejido nervioso coloreada con el colorante tricrómico de Masson, el núcleo puede observarse fácilmente de color rojo oscuro y el citoplasma de color rosa débil. Bacha, (2001), manifiesta que usando la técnica de hematoxilina eosina tiñe todos los elementos nerviosos en diferentes intensidades de rosa y los núcleos celulares de color violeta. Pero no se pueden ver neuronas completas, aunque si se pueden diferenciar los somas neuronales. El resto de elementos de todas esas neuronas (dendritas, axones) no pueden ser individualizados y forman una matriz que se conoce como parénquima nervioso y que con esta técnica se tiñe de color rosa.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Corteza cerebral. Coloración tricrómica de Masson (100x).

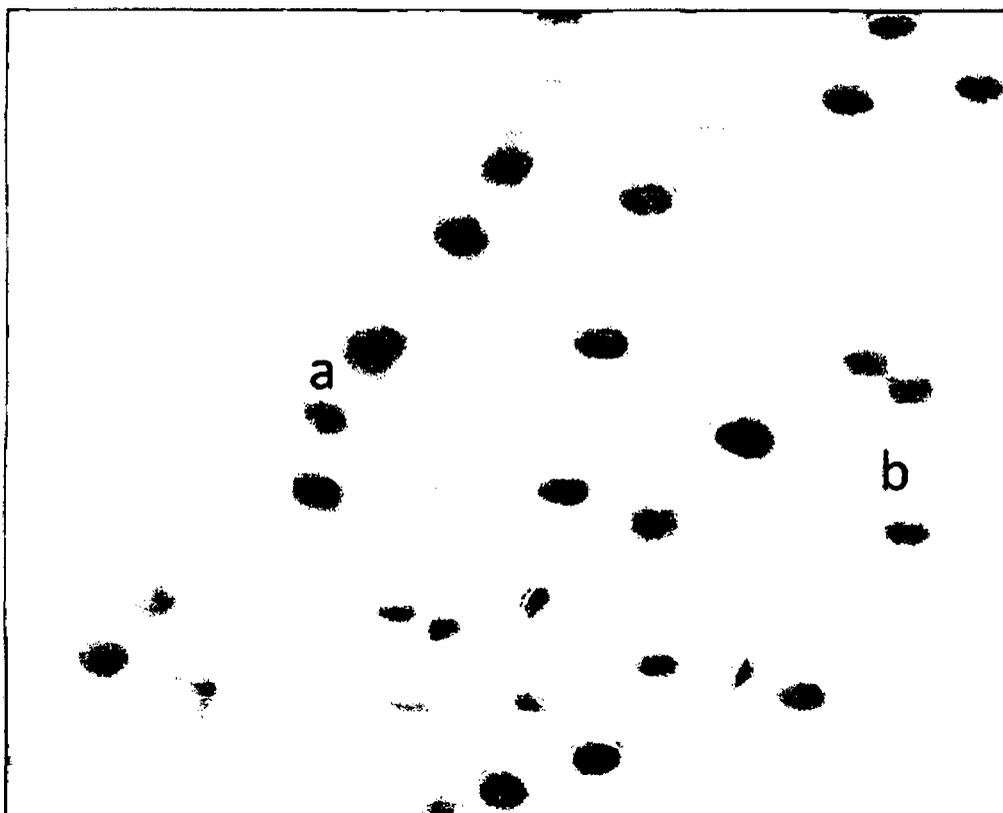
Microfotografía 04. (a) Capa de las células piriformes y polimorfas; (b) Zona medular. Fibras medulares.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

**Cerebro: Sustancia blanca. Coloración tricrómica de Masson.
(100x).**

Microfotografía 05. (a) Fibras mielínicas aparecen dentro de una sustancia homogénea de color rosa pálido, (b) Vasos sanguíneos dentro del parénquima fibrilar, (c) Células conectivas estromales, presencia de múltiples axones.



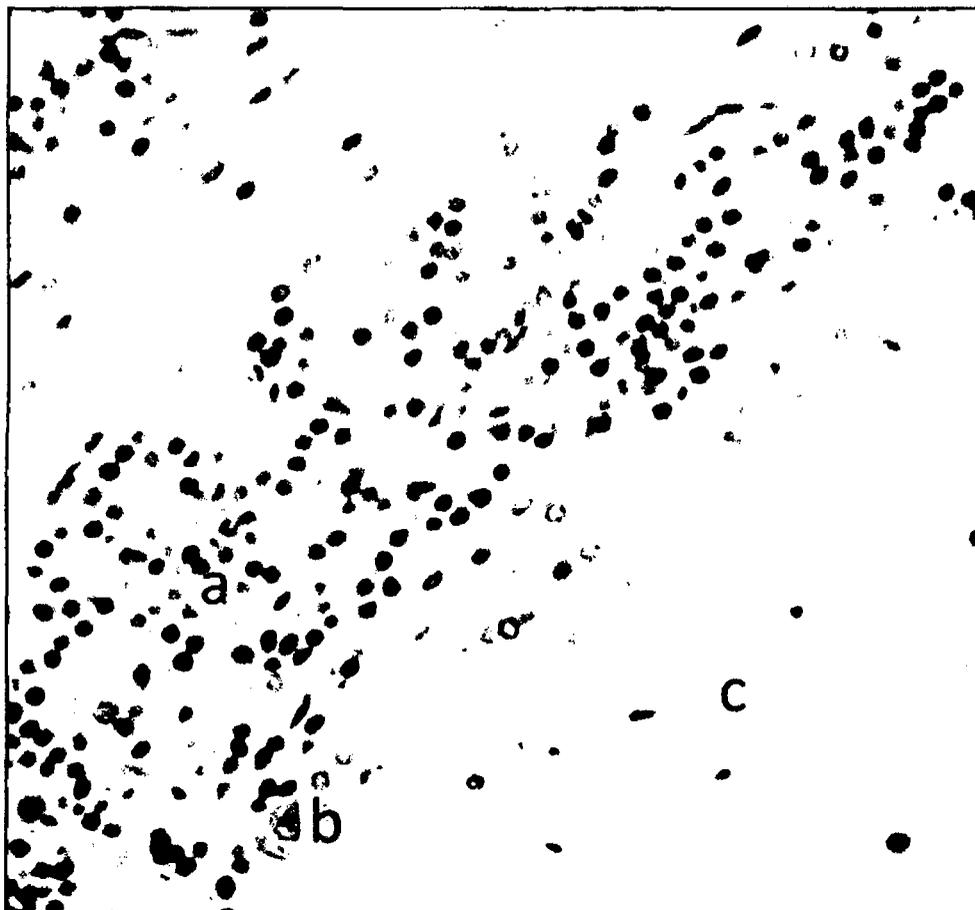
Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Vellosidad corial del plexo coroideo ventricular. Coloración tricrómica de Masson (400x).

Microfotografía 06. (a) Revestimiento epitelial mostrando un epitelio cúbico simple con microvellosidades, núcleos basales de color azul oscuro y citoplasma rosa, (b) Vellosidad corial.

En la microfotografía 06, se puede observar el revestimiento epitelial mostrando un epitelio cúbico simple con microvellosidades, núcleos basales de color azul oscuro y citoplasma rosa, así también en la parte b, se observa el corion de la vellosidad con células conectivas. Estas apreciaciones encontradas en el presente trabajo también lo describe Ramírez, (1996), quien en su estudio de los constitutivos estructurales del cerebro describe que el plexo coroideo es un penacho de vasos en forma de coliflor revestido por células cúbicas con microvellosidades, estas

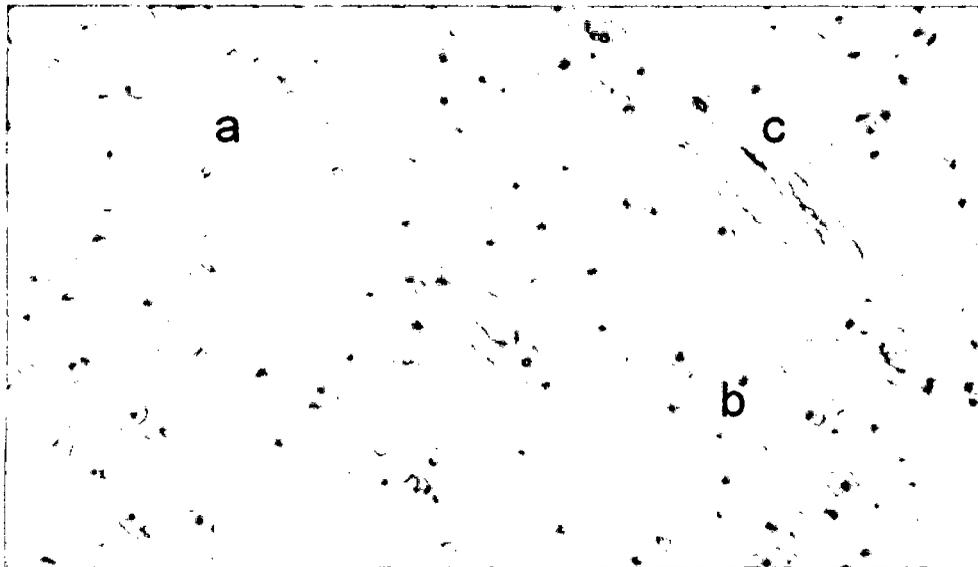
células elaboran el líquido cefalorraquídeo y están situados en los cuatro ventrículos, principalmente en los dos ventrículos laterales. Las vellosidades que conforman el plexo coroideo del sistema nervioso central, histológicamente están conformadas por un revestimiento de células cúbicas con un núcleo esférico u oval central con especializaciones de membrana denominadas microvellosidades. Miles de vellosidades anidan en la tela conectiva coroidea de los ventrículos laterales del cerebro. Estas afirmaciones coinciden con los resultados detallados en la microfotografía 06, donde se aprecia que las vellosidades de los plexos coroideos ventriculares presentan un revestimiento de células cúbicas con microvellosidades, núcleos esféricos de color azul oscuro y citoplasma rosa.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Corteza Cerebelosa. Coloración tricrómica de Masson (100x).

- Microfotografía 07.** (a) Estrato granuloso de la corteza cerebelosa, con afinidad al colorante tricrómico de Masson, se distinguen granos cerebelosos basófilos, (b) Capa de las células de Purkinje, con núcleo pequeño central y citoplasma acidófilo de color rosa pálido, (c) La capa molecular con presencia de pocas células.



Fuente: Trabajo de investigación de la autora.

Cerebelo: Sustancia blanca. Fibras mielínicas sin afinidad al colorante. Coloración tricrómica de Masson (100x).

Microfotografía 08. (a) Tejido fibrilar sin apetencia tintorial, donde se muestra como una sustancia homogénea de color rosa pálido, (b) Presencia de múltiples axones (puntos negros), (c) Presencia de vasos sanguíneos dentro del tejido fibrilar.

La microfotografía 07, muestra las tres capas de la corteza cerebelosa. La capa molecular más superficial con presencia de cuerpos de las células estrelladas, no están manifiestas las ramificaciones dendríticas de las células de Purkinje. En la parte a, se observa nítidamente la capa granulosa, se aprecian los granos cerebelosos pequeños y sumamente numerosos. En la parte b, se detalla a la capa de las células de Purkinje de color rosa pálido, en algunas de ellas se distinguen los núcleos pequeños, no se manifiestan las prolongaciones dendríticas, menos los axones. En tanto que en la microfotografía 08 se puede observar la sustancia blanca formada por fibras mielínicas que no tiene afinidad al colorante tricrómico de Masson. Estos hallazgos en el trabajo realizado empleando la coloración tricrómica de

Masson en tejido nervioso, no revela con claridad las prolongaciones celulares, menos la apariencia histológica de las células neuroglicas. Estas apreciaciones encontradas en el presente trabajo también lo describe Nistal, (1987), quien manifiesta que el tejido nervioso se organiza en una sustancia gris y una sustancia blanca, la primera lo caracteriza la presencia de neuronas, neuroglías y fibras nerviosas amielínicas, mientras que la segunda está exclusivamente formada por fibras nerviosas mielínicas. Usando la coloración de Nissl, Hematoxilina Eosina o tricrómico de Masson, las neuronas no muestran definitivamente sus prolongaciones, ni son observables las células de la glia. Torres (2002), manifiesta que la Técnica de Golgi se usa exclusivamente en el estudio del sistema nervioso. Se basa en dos hechos propios de esta técnica; el primero es el grosor de corte (100-150 μm), que permite que una neurona completa se aloje en el corte, por lo que permite el estudio de neuronas completas; el otro hecho característico es debido al método de impregnación Argéntica que esta técnica usa y que hace que solamente una muy pequeña proporción de neuronas se impregnen, lo que permite visualizar neuronas individuales. Esta técnica se utiliza para el estudio de neuronas completas (con el árbol dendrítico) y su clasificación morfológica.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

Al finalizar con la parte experimental del trabajo, empleando la técnica de coloración tricrómica de Masson en preparados de cerebro y cerebelo de conejo, se llegó a la siguiente conclusión:

- ❖ Con el colorante tricrómico de Masson, se pudo apreciar estructuras tales como: células piramidales, células cúbicas del plexo coroideo, células granulares, células de Purkinje y células estrelladas.

CAPITULO VI

LISTA DE REFERENCIAS

1. Alzola R. 2001. Curso de Histología, Embriología y Teratología. Universidad Nacional del centro de la provincia de Buenos Aires. UNCPBA. Departamento de Ciencias Biológicas. Pág. 9-12. [Internet]. Consultado. [03 de Noviembre del 2014]. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/HistEmbrTera/2009/Tecnicashistologicas.PDF>
2. Bacha W. 2001. Atlas color de histología veterinaria. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. 2° Edición Editorial Inter-Médica. Pág. 304. [Internet]. Consultado. [09 de Diciembre del 2014]. Disponible en: <file:///E:/bacha%20ATLAS%20DE%20HISTOLOGIA%20VETERINARIA.pdf>
3. Fernández H. 2014. Estructura histológica de la corteza cerebelosa. En: VI Congreso Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Área de histología, Biología celular y Anatomía Patológica Departamento de ciencias de la salud. Universidad Rey Juan Carlos. Madrid. España. [Internet]. Consultado. [14 de Octubre del 2014]. Disponible en: http://conganat.uninet.edu/6CVHAP/conferencias/conf_hector.html

4. Howat William J, Wilson Beverley A. 2014. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods Journal*. Volume 69, issue 3, pages 205-334. Relieve [internet], [09/10/14] available: <http://ac.elscdn.com/S1046202314000607/1s2.0S1046202314000607main.pdf?tid=a35a35da5593119cf300000aab0f02&acdnt=14135055117e8c5ca85cb63159e9a309f6112ee88d>
5. López M y col. 1982. *Técnicas de histología y citología*. Chile. 2º Edición. Editorial Labor S. A. Dpto. de Biología Celular y Genética. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Pág. 242.
6. Montalvo Arenas C. 2010. *Técnica histológica*. Madrid. España. Pág. 2-5 [Internet]. Consultado. [25 de Octubre del 2014]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/recursos%20instructores/APUNTE%20DE%20TECNICA%20HISTOLOGICA%20Dr.%20Montalvo.pdf>
7. Motta P. 1974. *Atlas Fotográfico en Color de Anatomía Microscópica*. Barcelona España. Editorial científico-Médica. Pág. 567.
8. Nistal M. 1987. *Introducción a la Histología Animal Comparada*. Barcelona. España. Editorial Labor S. A. Pág. 438.
9. Pizago J, Muñoz R, González M, Ortega F. 2006. Modificación de la técnica del Tricrómico de Masson para tejido colágeno. En: VIII Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Río Hortera. Valladolid. España [Internet]. Consultado [16 de Octubre del 2014]. Disponible en: <http://conganat.cs.urjc.es/ojs/index.php/conganat/article/viewFile/129/129-1993-1-PB.pdf>
10. Ramírez A. 1996. *Tratado de Histología*. Barcelona España. 5º edición. Editorial Interamericana. Pág. 564.

11. Romero G. 2002. Histología Médica. México. 2º Edición. Editorial. Trillas. Pág. 640
12. Senamhi. 2013. Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú. Novena Edición. Boletín Hidrometeorológico mensual a nivel regional de Cajamarca. Pág. 12. [Internet]. Consultado [22-10-2014]. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe/load/file/03701SENA-30092013.pdf>
13. Torres F. 2002. Manual de técnicas en histología y anatomía patológica. Barcelona España. 3º Edición. Editorial interamericana. Pág. 144. [Internet]. Consultado. [09 Diciembre del 2014]. Disponible en: <http://www.atlasdehistologia.com.ar/fotografias.html>
14. Watson Ch, Kirkcaldie M, Paxinos G. 2010. Chapter 7 - The human cerebral cortex. Academic Press. San Diego. Pages 97-108. ISBN 9780. (03 November 2014). Relieve [internet], [09/10/14]. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123738899500073>

ANEXO**ANEXO I****REACTIVOS DE LA TÉCNICA TRICRÓMICA DE MASSON**

Solución de hematoxilina férrica de Weigert

1. Solución de escarlata de Biebrich-fucsina ácida
 - 1) 90 cc de escarlata de Biebrich al 1% en agua destilada
 - 2) 9 cc de fucsina ácida al 1% en solución acuosa
 - 3) 1 cc de ácido acético glacial

2. Solución acuosa de ácido fosfomolibdico (utilizar ácido fosfotúngstico en la misma proporción, si se va a teñir con verde luz)
 - 1) 5 g de ácido fosfomolibdico
 - 2) 200 cc de agua destilada

3. Solución de azul de anilina
 - 1) 2,5 g de azul de anilina
 - 2) 2 cc de ácido acético glacial al azul
 - 3) 98 cc de agua destilada

4. Solución de verde luz al 2% (alternativa al azul)
 - 1) 2 g de verde luz al 2% (alternativa al azul)
 - 2) 99 cc de agua destilada
 - 3) 1 cc de ácido acético glacial

5. Solución diferenciadora; Solución acuosa de ácido acético glacial al 1%.

TÉCNICA DE COLORACIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

1. Toma de muestra de cerebro y cerebelo de conejo 1cm³.
2. Fijación en formaldehído bufferado al 8%.
3. Desparafinar e hidratar hasta el agua destilada de manera habitual.
4. El material fijado en soluciones de formaldehído se recomienda hacer un mordenaje previo con líquido de Bouin durante 1 hora a 56-60°C o toda la noche a temperatura ambiente.
5. Enfriar y lavar en agua destilada hasta que desaparezca el color amarillo.
6. Teñir con hematoxilina férrica durante 10 minutos. Lavar en agua corriente durante 10 minutos.
7. Lavar en agua destilada.
8. Teñir con Solución de escarlata-fucsina ácida durante 2-5 minutos.
9. Lavar en agua destilada.
10. Tratar con la Solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10-15 minutos si se va a colorear con la solución de azul de anilina, o en la Solución acuosa de ácido fosfotúngstico al 5% durante 15 minutos si se desea teñir con verde luz.
11. Teñir con Solución de azul de anilina 15 minutos o con Solución verde de luz 5 minutos.
12. Lavar en agua destilada.
13. Diferenciar en la Solución de ácidoacético al 1% durante 3-5 minutos.
14. Deshidratar, aclarar y montar.

SOLUCIÓN DE FORMOL BAFERADO NEUTRAL AL 8 %

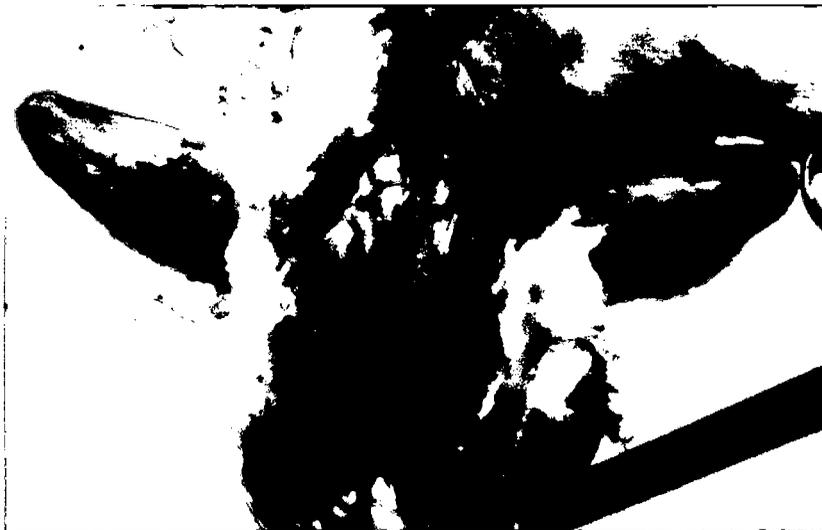
Formol 40 %.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml
Fosfato sódico monobásico.....	4 g
Fosfato sódico dibásico anhidro.....	6, 5g

ANEXO II

METODOLOGÍA



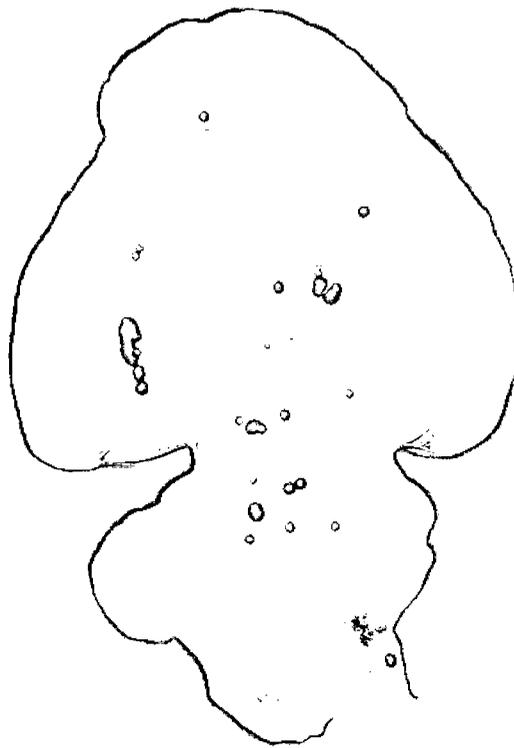
Fotografía 1. Disección del cráneo de conejo, posterior al sacrificio por degüello.



Fotografía 2. Cráneo de conejo vista dorsal. Disección de la piel de la cabeza para mostrar los cortes a través de la cresta sagital externa de los huesos parietales y frontal para exponer el cerebro y cerebelo.



Fotografía 3. Exposición del cerebro y cerebelo de conejo luego de la disección.



Fotografía 4. Cerebro y cerebelo de conejo extraídos luego de la disección.



Fotografía 5. Toma de la muestra de cerebro y cerebelo.



Fotografía 6. Inmediatamente la muestra tomada se depositó en un frasco con el fijador formaldehído bufferado al 8%.

ANEXO III**LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA**

Fotografía 7. Técnica de Inclusión en Parafina. Deshidratación y aclaramiento.



Fotografía 8. Técnica de Inclusión en Parafina y formación de tacos.