

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



**USO DEL NITRÓGENO LÍQUIDO (CRIOGENIZACIÓN) COMO  
FIJADOR FÍSICO, EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE RIÑÓN  
DE CONEJO, CAJAMARCA**

**T E S I S**

**Para optar el Título Profesional de  
MÉDICO VETERINARIO**

**Presentada por el Bachiller:**

**MARCO ANTONIO SÁNCHEZ HUARIPATA**

**ASESOR**

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

**CAJAMARCA – PERÚ**

**2014**

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



**USO DEL NITRÓGENO LÍQUIDO (CRIOGENIZACIÓN) COMO  
FIJADOR FÍSICO, EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE RIÑÓN  
DE CONEJO, CAJAMARCA**

**TESIS**

Para Optar el Título Profesional de  
**MÉDICO VETERINARIO**

Presentada por el Bachiller  
**MARCO ANTONIO SÁNCHEZ HUARIPATA**

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

**CAJAMARCA- PERÚ**  
**2014**



## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca, siendo las nueve y cinco minutos de la mañana del dieciocho de setiembre 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: **“USO DEL NITRÓGENO LÍQUIDO (Criogenización) COMO FIJADOR FÍSICO, EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE RIÑÓN DE CONEJO, EN CAJAMARCA”**, presentada por el Bachiller en Medicina Veterinaria: **Marco Antonio Sánchez Huaripata.**

Acto seguido el Presidente del Jurado procedió a dar por iniciada la sustentación, y para los efectos del caso se invitó al 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 **CATORCE ( 14 )**.

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. WILDER QUISPE URTEAGA  
PRESIDENTE

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

Dra. CECILIA ELIZABETH PAJARES ACOSTA  
VOCAL

## **DEDICATORIA**

A mis padres **CARLOS** y **MARÍA**, por haberme conducido por un camino de rectitud. Por haberme inculcado responsabilidad y respeto conmigo mismo y hacia los demás. Gracias por su apoyo económico y espiritual, sin ellos no hubiese culminado mis estudios universitarios.

A mi esposa **KARLA**, compañera ejemplar y gran amiga. Gracias por su paciencia y su cariño desinteresado, fuente de estimación y confianza.

**MARCO**

## **AGRADECIMIENTO**

Mi agradecimiento y reconocimiento al M.V. M. Cs. Jorge Bernardo Gamarra Ortiz, catedrático de la Facultad de Ciencias Veterinarias de esta prestigiosa universidad, por la dirección y asesoramiento de mi trabajo de tesis.

A todos los docentes de la Facultad de Ciencias Veterinarias y personal administrativo, por sus enseñanzas y consejos durante mis estudios universitarios, para todos ellos mi agradecimiento sincero por haberme forjado durante mis estudios en esta universidad.

A mis compañeros de promoción, mi sincero reconocimiento y agradecimiento, sin ellos, no hubiese podido compartir momentos agradables como estudiantes, como hermanos, de nosotros es la Universidad de Cajamarca, para siempre la tendremos en nuestros corazones.

**MARCO**

## **RESUMEN**

El presente trabajo de investigación, se realizó en la Provincia de Cajamarca. Con el objetivo de determinar las propiedades de fijación del tejido renal de conejo, utilizando el método de criogenización con nitrógeno líquido. Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Universidad Nacional de Cajamarca. La fijación se hace de la sección congelada. La fijación óptima con nitrógeno líquido se obtuvo entre los días 17 al 22. Se trabajó mediante la Técnica de Inclusión en parafina, coloración Hematoxilina-Eosina.

Palabras clave: Nitrógeno líquido, conejo, riñón.

## **ABSTRACT**

The present work of investigation it was realized in the Province of Cajamarca. With the aim of the properties determine fixation of the renal fabric of rabbit, the samples were processed in the Laboratory of Embryology and Histology of Cajamarca's National University. Using the method of criogenizacion in liquid nitrogen. The fixation does to itself of the frozen, the ideal fixation with liquid nitrogen obtained between the days 17al 22. One was employed by means of the Technology of Incorporation at paraffin, coloration Hematoxilina-Eosina.

Key words: Liquid nitrogen, rabbit,renown.

## ÍNDICE

DEDICATORIA  
AGRADECIMIENTO  
RESUMEN  
ABSTRACT

<b>CAPÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
I. INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
II. MARCO TEÓRICO	3
III. MATERIALES Y MÉTODOS	20
IV. RESULTADOS	24
V. DISCUSIÓN	31
VI. CONCLUSIONES	34
VII. REFERENCIAS	35
ANEXO	37



## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

La fijación en el proceso de preparación de muestras histológicas, es un recurso destinado a conservar estáticamente cierta estructura o función de una célula o tejido. Endurecerlos para facilitar su corte, estabilizar los componentes estructurales para conservarlos lo más parecidos posible a las condiciones in vivo y mejorar el efecto de los colorantes por su acción mordiente. Para asegurar convenientemente este proceso, los profesionales de las ciencias médicas hacen uso de los fijadores químicos, como el, formaldehído bufferado, glutaraldehído, alcohol etílico, ácido acético, etc. En concentraciones de acuerdo a la densidad del tejido (Greep, 1987).

Actualmente, los criogenicistas, en su afán de mantener a un cuerpo legalmente muerto, tanto humano como animal, usando el nitrógeno líquido para obtener el descenso de la temperatura bajo el punto de congelación (-190°C), han demostrado a través de esta técnica, que los tejidos orgánicos, sometidos a bajas temperaturas (criogenización), estabilizan sus constitutivos estructurales, y se conservan sin mostrar descomposición por largos periodos de tiempo, razones admitidas científicamente, para reemplazar en las técnicas histológicas a fijadores químicos con procedimientos físicos (Greep, 1987). En este caso, determinamos las propiedades de fijación del tejido renal de conejo, utilizando el método de criogenización con nitrógeno líquido.

## **OBJETIVOS DEL TRABAJO**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar las propiedades de fijación de tejidos renales de conejo, utilizando el nitrógeno líquido (criogenización).

### **OBJETIVO ESPECÍFICO**

Establecer el viraje de la fijación dentro de la técnica de inclusión en Parafina, reemplazando la fijación química, con el nitrógeno líquido (criogenización) como fijador físico en tejidos renales de conejo.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### **Criogenización**

Entendida como la técnica que permite mantener a un cuerpo legalmente muerto, tanto humano como animal, bajo condiciones de congelación, con la esperanza de que en cualquier momento de su conservación, sirva para estudiar las causas que causaron su muerte pasada. De hecho la criogenización tiene como objetivo primordial ganarle la partida al tiempo, y con esto permitir que en cualquier momento del tratamiento, se sepa que aun los cuerpos permanecen conservados e intactos mediante frio extremo (-190°C). Etimológicamente, la criogenización tiene su raíz en el término griego "criónica" que significa criopreserva, es decir, evitar el desgaste progresivo de un organismo sin vida, desde el punto de vista legal pero no biológico. En el caso del cerebro, el principal argumento en el que se basan los criogenicistas para defender el posible éxito de la prueba, es que conseguirán mantener las funciones vitales de la estructura biológica cerebral, considerada como la más relevante para la instancia de reanimación. Agregan que esto se logra administrando y provocando el tránsito y acumulación de grandes concentraciones de crioprotectores, lo que sería suficiente para proteger la estructura cerebral de las lesiones que irremediamente se producen en un estado de muerte natural (Bascuas y Asta 1987).

La criogenización es una alternativa más que se abre al morir. Yo creo que la ciencia está muy próxima a conseguir la recuperación de cuerpos fallecidos si son conservados en buen estado. Tan sólo es una cuestión de

tiempo. Al morir, las posibilidades del cuerpo son ser enterrado o incinerado. Existe una tercera posibilidad: conservar el cuerpo sometido a muy bajas temperaturas para una eventual recuperación el día de mañana de hecho las posibilidades de que eso ocurra son, científicamente, casi del 100%. En otras palabras, es un problema que los científicos no dan por solucionado todavía, aunque muchos se declaran convencidos de que la solución está próxima. La ciencia médica del futuro, además de recuperar la vida de pacientes debidamente conservados, podrá curar sus enfermedades y frenar el envejecimiento. Los problemas, más que científicos, son de otro tipo que la empresa de criogenización se hunda, que un juez ordene una autopsia, que la familia del candidato no le deje criogenizarse, que las leyes cambien desfavorablemente (<http://www.tendencias21.net/La-criogenizacion>).

### **Criogenización en nitrógeno líquido**

El tubo o termo Dewar, no es la única maquinaria necesaria para llevar a cabo un experimento de criogenización, hoy en día, han aparecido tubos de diferentes capacidades, se trate de cuerpos enteros u órganos independientes, indudablemente la conservación de un cuerpo en dichas cápsulas, requiere de un componente fundamental para alcanzar el frío extremo necesario para el mantenimiento de tejidos, células y órganos a lo largo del tiempo. Este componente no es otro que el afamado e hiperutilizado nitrógeno líquido. El nitrógeno líquido es un gas inerte que desplaza al oxígeno y puede mantener temperaturas incluso muy por debajo del punto de congelación; es transportado en grandes cantidades y se lo utiliza para múltiples e importantes funciones, tales como preservar células de laboratorio, conservar y transportar alimentos, tratar y eliminar cánceres de piel, verrugas o hemorroides, entre otros. Sin embargo otro estímulo procriogenización es que los resultados de los experimentos basados en la criogenización con animales como ratas y anfibios, tuvieron resultados positivos, y no ven por qué no puede ocurrir lo mismo con seres humanos. El contraste es que el organismo de estas especies y de muchas otras, aporta un anticongelante fisiológico a su sangre que no posee la sangre humana. El

nitrógeno líquido, hoy en día se está utilizando en el estudio de la vida a bajas temperaturas (Criobiología). La crioscopia, fenómeno que consiste en el descenso del punto de congelación de un líquido cuando tiene un sólido en disolución. Parte de la física que estudia este fenómeno. La crioterapia, es un método curativo basado en el fuerte enfriamiento de una parte del cuerpo. Es la aplicación del frío con finalidad terapéutica. La crioterapia general consiste en baños fríos administrados en recipientes refrigerantes adecuados con doble pared, entre las que circula una sustancia que se evapora rápidamente. La crioterapia local se aplica con mucha más facilidad, al tiempo que es mucho más utilizada que la anterior. El efecto, consiste en la aplicación de bolsas de tela impermeabilizadas o de goma rellena de hielo, que se aplica en diversas partes del cuerpo. Las indicaciones de la crioterapia son bastante extensas: sobre el abdomen en algunas enfermedades infecciosas, en la peritonitis aguda, en las hemorragias por lesiones de órganos abdominales, sobre el tórax en el caso de hemoptisis, sobre la cabeza en caso de insolación, traumas craneales, etc. La criometría es la medida de las temperaturas bajas. El criómetro, es el termómetro destinado a medir temperaturas muy bajas (Bravo, 1987).

### **Propiedades de los fijadores**

Las pequeñas porciones obtenidas de un tejido animal o vegetal, deben prepararse para el estudio microscópico, en condiciones de conservación y excelentemente fijación. Esta fijación debe coagular los soles y conservarlos en su lugar dentro de un tejido, como también conservar las estructuras de su entorno. La fijación suele lograrse sumergiendo pequeñas porciones de un tejido en determinadas soluciones químicas. Una solución amortiguada de formaldehído al 10% es la más empleada. La fijación puede lograrse incluso con ebullición. Por ejemplo, la clara del huevo es una proteína sol, pero si se hierva el huevo se convierte de manera irreversible en gel suficientemente duro para poder cortar en rebanadas, lo mismo ocurre con los soles de las células si se someten a ebullición. 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 (Márquez, 1995).

### **Fijadores químicos**

En los preparados de muestras de tejidos para el estudio microscópico de los constitutivos estructurales que conforman la arquitectura de los órganos animales y del hombre, dentro de una técnica de elección, la fijación, es el resultado de someter al tejido dentro de una sustancia química que tenga propiedades especiales para conservarlo y evitar su destierro, guarde ciertas condiciones especiales que garanticen seguir con los procedimientos que demande la técnica histológica elegida. Dentro de los fijadores químicos más usados por investigadores y técnicos médicos encontramos: formaldehído bufferado, tetraóxido de osmio, líquido de Zenker, glutaraldehído, paraformaldehído, alcohol etílico, ácido acético, ácido pícrico, bicromato de potasio, el cloruro de mercurio y los ácidos crómico y ósmico, entre los más usados, con el único fin de matar a las células pero conservar su estructura. Hasta la actualidad, los estudios de investigadores especialistas, dedicados a los procedimientos de las diferentes técnicas histológicas con el único interés de conocer la constitución de los tejidos, y como estos, se perturban en la enfermedad, se sigue utilizando sustancias químicas como fijadores, con el afán de detener la autólisis post mortem del tejido, y desnaturalizar las proteínas para inactivar las enzimas que originan cambios autolíticos en las muestras, condición estrictamente necesaria para llegar a una fijación homogénea del tejido y seguir su procesamiento en cualquier técnica histológica. El éxito del trabajo de laboratorio, dentro de una técnica específica, sea esta de inclusión en parafina o inclusión en plástico, la buena fijación, lleva a obtener resultados satisfactorios para el investigador, y prometer un diagnóstico real de lo observado. Si este es el propósito de los

fijadores químicos, la criogenización como método físico de fijación, cumple con la misma función de conservación, matar a las células pero conservando su estructura (Rázuri, 1987).

### **La fijación dentro de la técnica histológica**

La fijación es un recurso destinado a conservar estáticamente cierta estructura o función de interés en una célula o tejido. Se realiza por lo común, sumergiendo el tejido en una solución química que mantiene su estructura biológica, y sometida a una técnica de tinción especial, se obtengan muestras de excelente calidad para su estudio correspondiente. Es importante señalar, que a pesar que existe fijadores de uso general, todos ellos, asemejan los mismos resultados. 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 evitará el empleo de alcohol u otros productos orgánicos que extraigan los lípidos del tejido. Se emplean fijadores que estabilizan o coagulan las proteínas, para preservan 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, permite alta resolución sin producir distorsión aparente de las estructuras. Determina una fijación tan fina que es el fijador más usado para el estudio microscópico. El ácido fosfotúngstico, en cambio, es un precipitante proteico grosero, que produce en las células gruesos cordones grumosos con espacios artificiales entre ellos. Por tanto, el ácido fosfotúngstico es poco empleado para técnicas generales de estudios microscópicos. Es importante destacar que la fijación es a menudo un proceso químico, con efectos de esta índole sobre el tejido. Así los fijadores que contienen metales pesados, como el líquido de Zenker, portador de bicloruro de mercurio, pueden

reaccionar con grupos carboxilos de proteínas del tejido e influir en la coloración posterior. 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 mediante la congelación y 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. La fijación puede ser química, por la inmersión del tejido en una solución de agentes químicos siendo esta la forma más común, o física, sometiendo a la muestra a frío extremo, desnaturalización por calor, o el secado por aire seco (Greep, 1987).

No existe un fijador universal, ni un método de fijación único. Incluso podemos usar varios fijadores secuencialmente según nuestras necesidades. La elección depende de las características fijadoras que necesitemos. Por ejemplo, si queremos estudiar actividades enzimáticas debemos usar un fijador que no nos altere el centro activo de las enzimas en las que estamos interesados, y quizá para ello tengamos que sacrificar en cierta medida la morfología tisular. Si queremos estudiar la ultraestructura celular debemos usar fijadores que la preserven y que protejan a las membranas celulares durante el procesamiento de inclusión en resinas, y quizá esto altere su apetencia por los colorantes generales. Si queremos teñir un determinado componente celular difícilmente teñible quizá debamos usar un fijador que lo modifique para que sea reconocido más fácilmente por los colorantes en cualquier caso hay características de los fijadores que tenemos que tener en cuenta antes de su uso:

Velocidad de penetración. El proceso de fijación ha de ser rápido y la velocidad de difusión de la sustancia fijadora en los tejidos es un factor



determinante. Este parámetro condiciona el tamaño de la pieza que queramos fijar, más pequeña cuanto menor sea la velocidad de difusión del fijador empleado, y también determina el tiempo de fijación, mayor cuanto menor tiempo de difusión.

Velocidad de fijación. Esta característica no depende de la velocidad de difusión sino de las propiedades químicas del fijador y condiciona el tiempo que debe permanecer el tejido en contacto con el fijador.

Endurecimiento. Los fijadores generalmente endurecen los tejidos, lo cual depende del tipo de fijador y del tiempo que el tejido haya estado expuesto a él.

Ósmosis y pH. Es indispensable evitar cambios de volumen en las células producidos por una osmolaridad del fijador diferente a la del tejido. Por tanto, hay que equilibrar la osmolaridad de las soluciones fijadoras y la de los tejidos a fijar. No es necesario añadir sustancias complejas. Por ejemplo, para los tejidos de animales terrestres basta con añadir 0.9 % de cloruro sódico. Son sales que no afectan a la capacidad del fijador. Normalmente se suelen usar soluciones tamponadoras a un pH semejante al del tejido e isoosmóticas con dicho tejido.

**Efecto mordiente.** Algunas estructuras tisulares son difíciles de teñir puesto que tienen poca apetencia por los colorantes. Esta apetencia puede ser incrementada con un tratamiento previo. Algunos fijadores, además de fijar, modifican químicamente a ciertas estructuras celulares para que posteriormente puedan unirse a ellas los colorantes. Este tipo de modificación química se le denomina efecto mordiente (Greep, 1987).

Los procesos de fijación pueden acarrear alteraciones tisulares como variaciones morfológicas, cristalización de compuestos, desplazamiento de

sustancias, etcétera. Estos cambios pueden producirse por las características del fijador o por un mal uso de éste. En cualquier caso deben tenerse en cuenta para no describir como características tisulares lo que es un artefacto introducido durante la fijación (Universidad Católica del Perú - 2011).

Los fijadores físicos se basan o bien en una congelación muy rápida del tejido o bien en la aplicación de calor elevado. Se utilizan cuando los fijadores químicos alteran las estructuras que queremos observar, cuando necesitamos una fijación muy rápida, o cuando el tipo de tejido y la técnica que usaremos lo requiera. La congelación rápida es un buen método de preservación de las características moleculares y es conveniente que sea rápida puesto que así se impide la formación de grandes cristales de hielo que nos destrozarian la estructura del tejido. Existen variantes de esta técnica como son la criodesecación o liofilización y la criosustitución. La criodesecación parte de tejido previamente congelado al que posteriormente se le sublima el hielo, es decir, el agua pasa de estado sólido a gaseoso sin pasar por estado líquido. Al eliminar el agua se impide que se den reacciones químicas, por lo que, además de la fijación, este método preserva el tejido en el tiempo. La criosustitución también parte de tejido congelado pero en este caso se produce una sustitución lenta del hielo por una solución fijadora. Con ello se posibilita una fijación química sobre un material que no ha sufrido deterioro puesto que está congelado. Los métodos de fijación por calor no son frecuentemente usados, excepto para el estudio de microorganismos (Rázuri, 1987).

Los métodos químicos utilizan soluciones acuosas compuestas por moléculas fijadoras que establecen puentes entre las moléculas del tejido, manteniéndolas en sus lugares originales e impidiendo su degradación. Hay dos métodos básicos de fijación con fijadores líquidos: inmersión y perfusión. En cualquier caso el fijador debe llegar a todas las partes del tejido lo más rápidamente posible (Rázuri, 1987).

La congelación de los tejidos previamente fijados permite la obtención de secciones que pueden ir desde unas 50  $\mu\text{m}$  hasta nm de grosor, para lo que se utilizan diferentes aparatos: micrótomo de congelación para secciones de decenas de  $\mu\text{m}$ , criostato para secciones de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$  y ultracriotomo para secciones ultrafinas del orden de nm. Para evitar los daños que se producen durante los procesos de congelación, como la formación de cristales de hielo que nos agujerean los tejidos, se pueden usar: a) Anticongelantes que impidan la formación de cristales. El crioprotector más usado es la sacarosa al 30 %, aunque también se usa el dimetil sulfóxido, el glicerol, etilén glicol y otros. La elección de uno u otro depende del tipo de muestra y de la técnica que se vaya a usar. b) Una congelación lo más rápida posible, por ejemplo, con nitrógeno líquido. Cuanto más rápida es la congelación menores son las dimensiones de los cristales de agua formados (Rázuri, 1987).

### **Fundamentación de la técnica de inclusión en parafina**

**Toma de la muestra.** 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. El uso de cuchillos, tijeras u otros instrumentos de corte grosero, evitarlos definitivamente, son instrumentos que llevan a obtener la muestra con graderías, bordes irregulares y que también llevan artefactos. La muestra a obtener debe medir aproximadamente  $1\text{cm}^3$ , suficiente para obtener rebanadas delgadas en el micrótomo. **Fijación.** 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.** Sometidas 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. **Impregnación.** Llenar con parafina los espacios dejados del agua, grasa, para facilitar el

corte. *Inclusión*. El tejido incluye en parafina líquida para formar los tacos, de parafina para pegarlos al micrótomo para su corte en rebanadas finas. *Microtomía*. Corte de rebanadas finas en el micrótomo entre 4-8 micras de espesor (Han, 1998).

### **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, núcleo) y extracelulares (fibras reticulares, elásticas, colágenas). Algunas no son selectivas y tiñen los componentes 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, 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).

### **Los Riñones**

Los riñones filtran la sangre del aparato circulatorio y eliminan los desechos (diversos residuos metabólicos del organismo, como son la urea, el ácido úrico, la creatinina, el potasio y el fósforo) mediante la orina, a través de un complejo sistema que incluye mecanismos de filtración, reabsorción y excreción. Diariamente los riñones filtran unos 200 litros de sangre para producir hasta 2 litros de orina. La orina baja continuamente hacia la vejiga a

través de unos conductos llamados uréteres. La vejiga almacena la orina hasta el momento de su expulsión (Greep, 1987).

El peso de los riñones equivale al 1 % del peso corporal total de una persona. Los riñones tienen un lado cóncavo mirando hacia adentro (intermedio). En este aspecto intermedio de cada riñón hay una abertura, llamada hilio, que admite la arterial renal, la vena renal y el uréter. La porción externa del riñón se llama corteza renal, que descansa directamente debajo de la cápsula de tejido conectivo blando del riñón. Profundamente en la corteza lóbulo renal. La extremidad de cada pirámide (llamada la papila) se vacía en un cáliz, y los cálices se vacían en la pelvis renal. La pelvis transmite la orina a la vejiga urinaria vía el uréter (Greep, 1987).

### **Corteza renal**

Es la parte externa del riñón y tiene aproximadamente 1 cm de grosor, de coloración rojo parduzca y fácilmente distinguible al corte de la parte interna o medular. Forma un arco de tejido situado inmediatamente bajo la cápsula renal. De ella surgen proyecciones que se sitúan entre las unidades individuales de la médula y se denominan columnas de Bertin, contiene el 75 % de los glomérulos, los túbulos proximales y distales, recibe el 90 % del flujo sanguíneo renal y su función es la filtración, la reabsorción y la secreción (Greep, 1987).

### **Médula renal**

Las pirámides renales (también llamadas pirámides de Malpighi) son tejidos del riñón con forma de cono. La médula renal está compuesta de 8 a 18 de estas subdivisiones cónicas. La amplia base de cada pirámide hace frente a la corteza renal, y su ápice, o papila, apunta internamente, descargando en el cáliz menor (que a modo de embudo confluye en la pelvis renal). Las pirámides parecen rayadas porque están formadas por segmentos paralelos rectos de túbulos renales (Greep, 1987).

## **Suministro de sangre**

Cada riñón recibe su flujo de sangre de la arteria renal, dos de ellas se ramifican de la aorta abdominal. Al entrar en el hilio del riñón, la arteria renal se divide en arterias interlobulares más pequeñas situadas entre las papilas renales. En la médula externa, las arterias interlobares se ramifican en las arterias arqueadas, que van a lo largo de la frontera entre la médula y la corteza renal, todavía emitiendo ramas más pequeñas, las arterias corticales radiales (a veces llamadas las arterias interlobulillares). Las ramificaciones de estas arterias corticales son las arteriolas aferentes que proveen los tubos capilares glomerulares, que drenan en las arteriolas eferentes. Las arteriolas eferentes se dividen en los tubos capilares peritubulares que proporcionan una fuente extensa de sangre a la corteza. La sangre va a la médula (las que pertenecen a las nefronas yuxtamedulares), formando la vasa recta. El suministro de sangre está ligado a la presión arterial (Greep, 1987).

## **Nefrona**

A nivel microscópico, el riñón está formado por 1 a 3 millones de unidades funcionales, que reciben el nombre de nefronas. Es en la nefrona donde se produce realmente la filtración del plasma sanguíneo y la formación de la orina; la nefrona es la unidad básica constituyente. Las nefronas regulan en el cuerpo el agua y la materia soluble (especialmente los electrolitos), al filtrar primero la sangre bajo presión, y enseguida reabsorbiendo algún líquido y moléculas necesarios nuevamente dentro de la sangre mientras que excretan otras moléculas innecesarias. La reabsorción y la secreción son logradas con los mecanismos de cotransporte y contratransporte establecidos en las nefronas y conductos de recolección asociados. La filtración de la sangre ocurre en el glomérulo, un apilotamiento de capilares que se encuentra dentro de una cápsula de Bowman. Se puede decir que el proceso de la nefrona está dividido en tres pasos fundamentales (Greep, 1987).

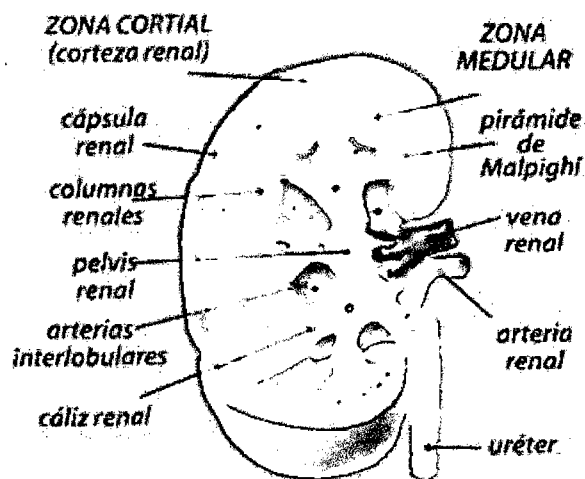
### **Filtración renal**

Consiste en filtrar cierta cantidad de sangre a través de una membrana que existe entre la cápsula Bowman y el glomérulo. Esta filtración glomerular se da gracias a que existe una diferencia de presiones entre la presión sanguínea y la presión que hay dentro del glomérulo (55 mmHg – 45 mmHg), esta diferencia de presiones favorece que la sangre se filtre hacia dentro del glomérulo para que se de la formación de orina primaria (Greep, 1987).

### **Reabsorción real**

Se da a nivel del túbulo contorneado proximal, específicamente en el asa de Henle, en donde a través del cerebro se dan órdenes al riñón para que absorba contenidos necesitados por el cuerpo. Secreción es lo contrario a la Reabsorción; en esta etapa los componentes sanguíneos en exceso son eliminados por secreciones al túbulo contorneado distal, la secreción no es lo mismo que una excreción, en la secreción se secretan sustancias a la luz del túbulo contorneado distal para que sean excretadas finalmente en la orina. Sistema de conductos recolectores. El líquido fluye de la nefrona al sistema de conductos recolectores. Este segmento de la nefrona es crucial para el proceso de la conservación del agua por el organismo. En presencia de la hormona antidiurética (ADH; también llamada vasopresina), estos conductos se vuelven permeables al agua y facilitan su reabsorción, concentrando así la orina y reduciendo su volumen. Inversamente, cuando el organismo debe eliminar exceso de agua, por ejemplo después beber líquido en exceso, la producción de ADH es disminuida y el túbulo recolector se vuelve menos permeable al agua, haciendo a la orina diluida y abundante. La falla del organismo en reducir la producción de ADH apropiadamente, una condición conocida como síndrome de secreción inadecuada de la hormona antidiurética (SIADH), puede conducir a retención de agua y a dilución peligrosa de los fluidos corporales; que a su vez pueden causar daño neurológico severo. La falta en producir ADH (o la inhabilidad de los

conductos recolectores de responder a ella) puede causar excesiva orina, llamada diabetes insípida (DI). Una segunda función importante del sistema de conductos recolectores es el mantenimiento de la homeostasis ácido-base, después de ser procesado a lo largo de los túbulos y de los conductos recolectores, el fluido, ahora llamado orina, es drenado en la vejiga vía el uréter, para finalmente ser excluido del organismo (Greep, 1987).



Estructura del riñón de conejo (Bravo, 1987).

### Histología del riñón

El riñón es una glándula tubular compuesta de túbulos uriníferos, se divide en lóbulos y lobulillos, en algunas especies hay un solo lóbulo (hombre, rumiantes pequeños), en otros la lobulación puede persistir o puede existir una fusión secundaria (rumiantes). Un lóbulo consta de componentes corticales y medulares. La porción medular tiene una pirámide, cuya base ancha está en contacto con la corteza. Una o más pirámides se pueden unir para formar una papila, la porción apical y redondeada de la pirámide o pirámides que se proyecta dentro del cáliz menor. La punta de la papila es fenestrada (área cribosa), las perforaciones corresponden a las aberturas de



los túbulos uriníferos en los cálices o la pelvis renal. Una papila se proyecta en un cáliz menor, los cálices son continuos en la pelvis renal. Los riñones unilobulares o unipiramidales son característicos de los carnívoros, pequeños rumiantes y caballos. El riñón tiene un solo lóbulo originado de la fusión de varios lóbulos durante el desarrollo. Una papila única de base amplia forma la cresta renal que está en relación íntima con la porción expandida del uréter en la pelvis renal. El túbulo urinífero del riñón consiste de una neurona y un sistema de conductos colectores. La neurona es la porción del lóbulo urinífero que produce orina y consta de cápsula de Bowman, túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal. El glomérulo red de capilares arteriales y la cápsula de Bowman forma el corpúsculo renal. El sistema de túbulos colectores, que colecta, concentra y transporta la orina, consta de túbulos colectores arqueados, túbulos colectores rectos, y conductos papilares de Bellini. Cada riñón tiene dos zonas diferenciadas, una corteza, externa, y una medula, interna (Banks, 1989).

La corteza forma una cubierta externa y también unas columnas (las denominadas columnas de Bertin), que están situadas entre las unidades individuales de la medula.

La medula está formada por una serie de estructuras cónicas (pirámides medulares), cuya base está en continuidad con el límite interno de la corteza y cuya punta protruye hacia el sistema colector de la orina (el sistema calicial) en el hilio del riñón. A esta punta de la pirámide medular se la denomina papila.

Cada riñón humano contiene 10-18 pirámides medulares, por lo que hay 10-18 papilas que protruyen en los cálices colectores.

Cada pirámide medular, con su cubierta de corteza asociada, constituye un lóbulo funcional y estructural del riñón. Esta arquitectura lobular es claramente visible en el riñón fetal, pero se va haciendo menos manifiesta a medida que el riñón aumenta de tamaño al avanzar la edad (Rázuri, 1987).

## **Función Renal**

La orina es producida en el riñón mediante la eliminación selectiva de sustancias del plasma sanguíneo. Una posterior reabsorción controlada de agua, iones, sales, azúcares y otros hidratos de carbono, así como proteínas de bajo peso molecular, permite al riñón producir una orina con una composición adecuada para el medio ambiente interno y las necesidades del organismo en cada momento.

Así, por ejemplo, si se produce un aumento del volumen plasmático y la consecuente dilución por una ingesta considerable de agua, el riñón excretará el exceso de agua produciendo grandes cantidades de orina diluida. A la inversa, si hay una restricción en la ingestión de líquidos, el riñón producirá una pequeña cantidad de orina altamente concentrada.

Cualesquiera que sean la cantidad y la concentración de la orina, ésta contiene la cantidad de productos de degradación e iones adecuada para mantener la homeostasia bioquímica interna.

La incapacidad para producir una orina concentrada o diluida es una característica importante de la insuficiencia renal, como pone de manifiesto la excreción inadecuada de productos de degradación nitrogenados y otras sustancias, por ejemplo los iones potasio.

Es importante tener presente que los riñones difieren de la mayor parte de los demás órganos en un aspecto importante. En la mayoría de los órganos, la irrigación vascular sirve a los tejidos parenquimáticos, proporcionando oxígeno y otras materias primas que son necesarias para los procesos metabólicos del tejido y extrayendo de los órganos los productos de síntesis celular y los materiales de desecho. Sin embargo, en el riñón, los componentes parenquimáticos del órgano sirven a la irrigación sanguínea, puesto que la función del riñón es, en términos generales, la de filtración y limpieza de la sangre.

Así pues, la unidad parenquimática del riñón, la nefrona, que está formada por el glomérulo y los sistemas tubulares cortical y medular, puede ser considerada un complemento del sistema vascular renal, que está unida a él para prestarle un servicio. No es de extrañar, pues, que el sistema vascular renal sea cuantitativa estructuralmente inusual, como consecuencia de su función central. Hay que tener presente que ambos riñones reciben el 25 % del total del flujo sanguíneo que sale del corazón. Por consiguiente, la mayor parte de las enfermedades renales importantes y frecuentes se deben a una anomalía del componente vascular (universidadcatolicadelperu, 2011).

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Localización

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el distrito de Cajamarca. El estudio histológico se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. La coloración de las muestras se realizó en SENASA – Lima.

#### Datos Geográficos y Meteorológicos (\*)

Altitud	2650 msnm
Temperatura máxima	0°C
Temperatura media	11°C
Temperatura mínima	7°C
Humedad relativa promedio anual	75%
Precipitación pluvial promedio	578 mm
Insolación promedio anual	3-6 horas/día

---

(\*) Fuente: SENAMHI – Cajamarca 2014-primer trimestre

## **MATERIALES**

### **Biológico**

Diez conejos adultos

### **Equipos de laboratorio**

Microscopio Compuesto con cámara incorporada

Micrótomo de rotación para parafina

Láminas porta y cubre objetos

Baño maría

Estufa

Tanque criogénico con nitrógeno líquido de 3 kilos

Cuchillo

### **Reactivos**

Gelatina al 5%

Alcohol ácido

Etanol absoluto

Fosfato buferado salino (fbs)

Solución de formol al 10%

Xilol

Parafina 56°

Parafina 58°

Set de coloración (Hematoxilina- Eosina)

Albúmina glicerizada

Bálsamo de Canadá

**Material de campo**

Mandil

Guantes de jebe

**Material De escritorio**

Papel bond

Libreta de apuntes

CD's.

**METODOLOGÍA****Selección de conejos**

Se utilizaron 10 conejos adultos de ambos sexos de la raza californiana para el presente estudio, los cuales fueron adquiridos de la granja Santa Bárbara.

**Fijación con nitrógeno líquido**

1. Una vez obtenida la muestra de tejido renal de conejo (bloque de 1 cc), se colocó en una bolsa pequeña de plástico transparente.
2. Inmediatamente, la bolsa de plástico que contenía la muestra, se colocó en un tanque criogénico con nitrógeno líquido para su fijación a  $-190^{\circ}\text{C}$ .
3. A los 4 días de permanencia de las muestras en el nitrógeno líquido, fueron sacadas para observarlas y determinar el grado de fijación que presentaba el tejido.
4. A partir de la fecha, los bloques de tejido fueron revisados todos los días, hasta que sus características físicas mostraron condiciones óptimas para seguir con la deshidratación según los pasos de la técnica de inclusión en parafina.

5. A partir del día 17 hasta el día 22, se determinó el tiempo ideal de fijación, todo el bloque mostró una coloración oscura homogénea y un endurecimiento del tejido para facilitar su corte.

## **6. Trabajo de laboratorio (histología)**

### **Método de Inclusión en Parafina**

1. Toma de muestra de tejido renal de conejo (1 cc).
2. **Fijación.** La fijación de las muestras fueron en nitrógeno líquido hasta que el tejido esté fijado homogéneamente.
3. **Deshidratación.** Seguidamente, las muestras fueron sometidas a concentraciones crecientes de alcohol etílico en soluciones de 80°, 95° y alcohol absoluto hasta la deshidratación total.
4. **Aclaramiento.** Efecto de aclaramiento de las muestras se llevó a cabo con xileno en tres baños en vasos Coplin.
5. **Impregnación.** Terminado el proceso de aclaramiento por tres horas, las muestras se colocaron en soluciones de concentración creciente de parafina. Permanecieron durante todo el proceso (6 horas) a temperatura de derretimiento (60°C).
6. **Inclusión.** Las muestras se las incluyó en bloques de parafina diluida, obteniendo tacos de parafina que contenían las muestras correspondientes. Se las dejó enfriar al aire libre por 24 horas, y para permitir un proceso satisfactorio, luego permanecieron por 72 horas en refrigeración.

La Microtomía y la coloración según el método de Hematoxilina Eosina, se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología SENASA-Lima.

## **TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Para el siguiente trabajo se utilizó Estadística Descriptiva

## CAPÍTULO IV

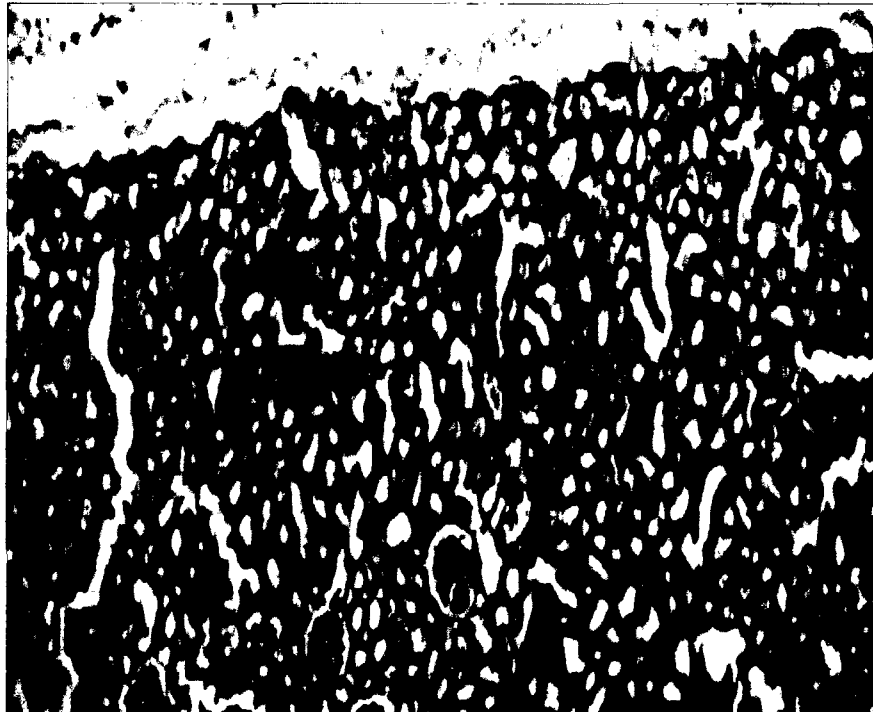
### RESULTADOS

**TABLA 1.** Descripción del viraje, producido en el Tejido Renal de conejo, sometidas a la Fijación por Criogenización.

<b>Cambios Físicos de la cápsula, corteza, y medula del riñón de conejo (Tamaño, Forma, Color, Consistencia)</b>						
<b>1-3 Días</b>	<b>4 Días</b>	<b>7 Días</b>	<b>12 Días</b>	<b>17 Días</b>	<b>22 Días</b>	<b>27 Días</b>
Bloque de Tejido renal sin cambios físicos aparentes	+Tamaño y forma normal del bloque +Consistencia blanda del bloque +Cápsula y corteza oscura +Médula color roja	+Tamaño reducido +Consistencia blanda del bloque +Cápsula y corteza oscura +Médula roja	+Tamaño reducido +Consistencia blanda del bloque +Cápsula, corteza y médula oscura	+Forma aplanada +Consistencia endurecida del bloque +Cápsula, corteza y médula oscuro homogéneo	+Tamaño reducido +Consistencia endurecida del bloque +Color oscuro homogéneo	+Separación de la cápsula +Bloque de tejido muy endurecido



**DESCRIPCIÓN DE LOS HALLAZGOS HISTOLÓGICOS ENCOTRADOS EN TEJIDO RENAL DE CONEJO SOMETIDOS A LA FIJACIÓN POR CRIOGENIZACIÓN.**



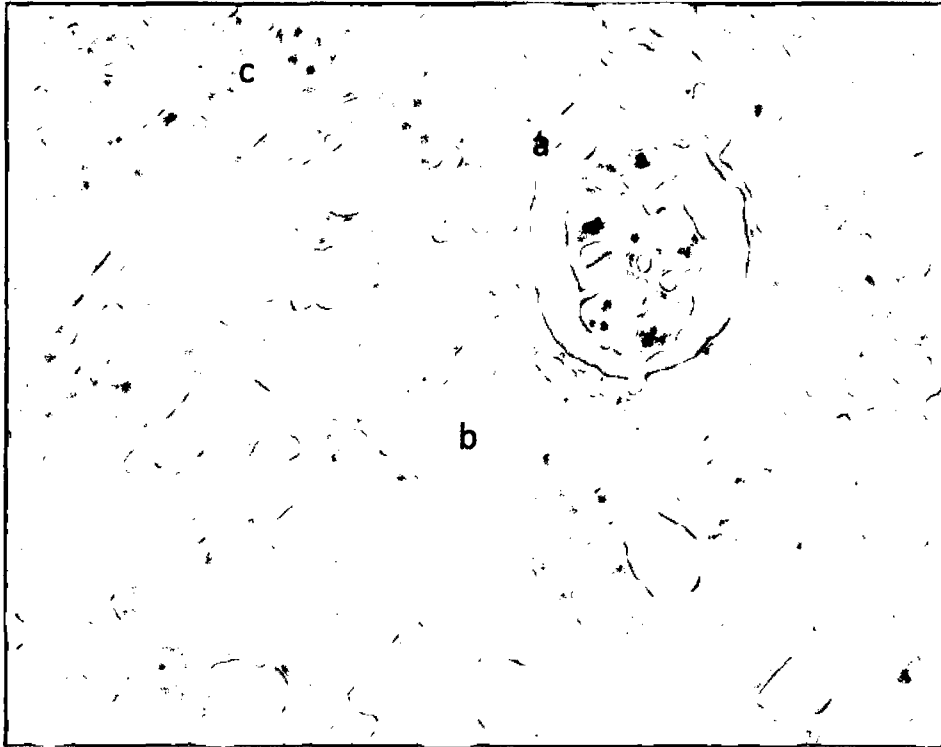
(Coloración: hematoxilina-eosina 40x)

**Fig 1.** Tejido renal de conejo. Cápsula y corteza renal. (a) Cápsula renal formada por fibras de tejido conectivo denso de un color rosa, (b) Corteza renal, claramente separado del tejido capsular, de un color morado oscuro, (c) Vasos sanguíneos corticales sin coloración aparente.



(Coloración: hematoxilina-eosina 40x)

**Fig 2.** Corteza renal de conejo. (a) Corpúsculos renales esféricos que detallan en su interior la red capilar, (b) Túbulos renales del parénquima renal, (c) Vasos sanguíneos corticales sin coloración aparente.



(Coloración: hematoxilina-eosina 40x)

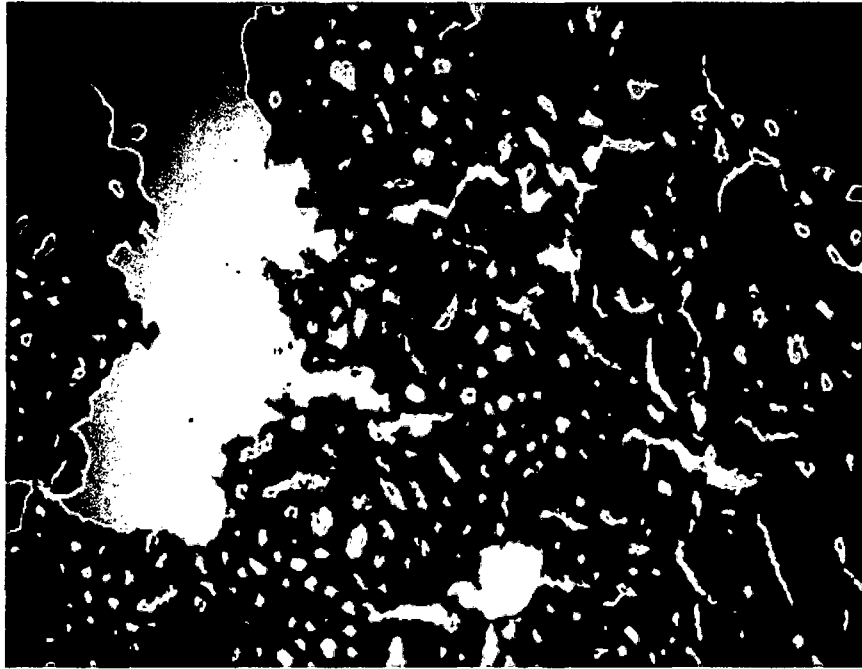
**Fig 3.** Médula renal de conejo. (a) Corpúsculo renal de la corteza de un epitelio plano simple, en su interior alberga la red capilar, (b) Túbulos renales recubiertos del epitelio de revestimiento. (c) Coloración rosa en el intersticio debido a sustancias posiblemente proteicas.



(Coloración: hematoxilina-eosina 40x)

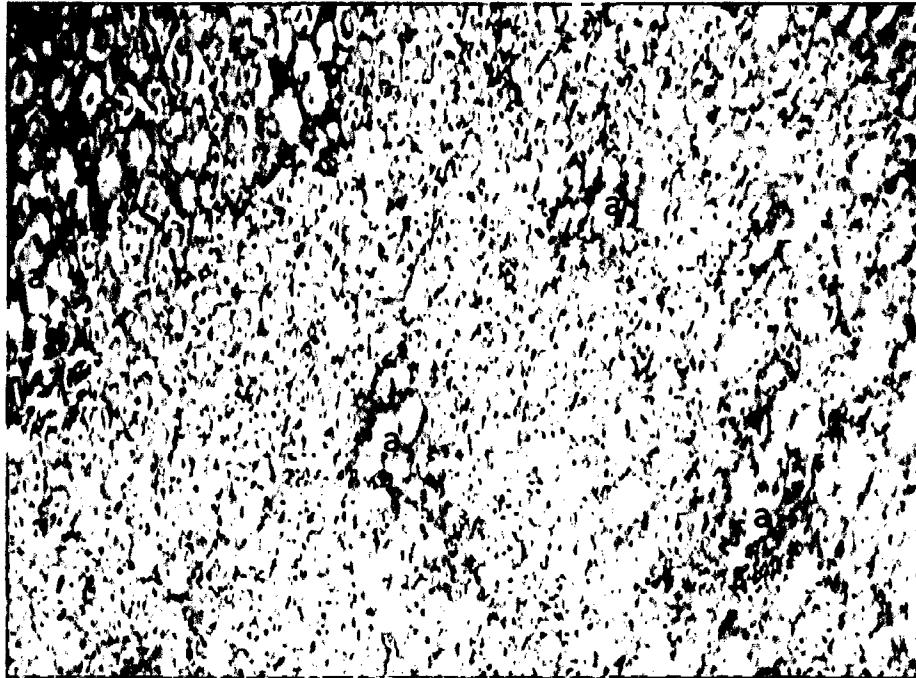
**Fig 4.** Pelvis renal de riñón de conejo. (a) Papilas renales (b) Numerosos vasos sanguíneos, (c) Porción medular profunda, Túbulos delgados del asa de Henle.

**CUADROS HISTOPATOLÓGICOS ENCONTRADOS EN TEJIDO RENAL  
DE CONEJO FIJADOS CON EL MÉTODO DE CRIOGENIZACIÓN.**



(Coloración: hematoxilina-eosina 40x)

**Fig 5.** Zona cortical. (a) Necrosis renal. (b) Corpúsculos renales pequeños.



(Coloración: hematoxilina-eosina.40x)

**Fig 6.** Zona medular profunda. (a) Pequeñas zonas hemorrágicas alrededor de los túbulos renales.

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

Habiendo terminado con la parte experimental de las muestras de tejido renal de conejo sometidas a la fijación mediante el método de criogenización con nitrógeno líquido. En la Tabla 1, se describen los diferentes cambios de conservación que experimentaron los bloques del tejido. Las características físicas favorables de fijación fueron encontradas entre los 17 al 22 días, después de este tiempo el tejido renal se encontró muy endurecido y con desprendimiento capsular, características que no garantizaban una buena fijación y que no favorecían a una buena coloración. Bravo (1987), refiere que la criogenización de cuerpos enteros u órganos independientes cuando alcanzan el frío extremo, mantienen las células, tejidos y órganos a lo largo del tiempo.

Este componente de conservación, no es otro, que el nitrógeno líquido, ya que el frío extremo en este caso se alcanzó a los 17-22 días al igual que el autor pudimos comprobar que se observan las estructuras bien definidas a la observación microscópica.

En la Fig 1 y Fig 2, observamos que los tejidos renales sometidos a la fijación con nitrógeno líquido, beneficiaron a la coloración, en este caso, a la Hematoxilina-Eosina, se advirtieron características de contraste de coloración entre los componentes del estroma frente a los constitutivos funcionales, la cápsula de color rosa formada por tejido conectivo fibroso, frente a los constitutivos del parénquima de un color violeta. Greep (1987), manifiesta que los fijadores mantienen la estructura biológica para ser

sometidos a una técnica de tinción especial y obtener muestras de excelente calidad. Se puede preservarse la actividad enzimática congelando los tejidos frescos en ciertas condiciones, o mediante la congelación. Márquez (1990), resalta las propiedades de los fijadores en cuanto a que estos: impiden la autólisis, endurecen los tejidos para facilitar su corte, mejoran el efecto de los colorantes por su acción mordiente, estabilizan los componentes estructurales para su conservación como se pudo observar en nuestra Fig 3 y Fig 4.

Se logró establecer el viraje de la fijación dentro de la técnica de inclusión en Parafina, reemplazando la fijación química, con el nitrógeno líquido (criogenización) como fijador físico en tejidos renales de conejo. Dando a conocer una técnica alternativa para el estudio histológico de las diferentes muestras en órganos o especies que requieran este tipo de estudios.

Observamos que los tejidos renales sometidos a la fijación con nitrógeno líquido, beneficiaron a la coloración, en este caso, a la Hematoxilina-Eosina, se advirtieron características de contraste de coloración entre los componentes del estroma frente a los constitutivos funcionales, la cápsula de color rosa formada por tejido conectivo fibroso, frente a los constitutivos del parénquima de un color violeta. Rázuri (1987), manifiesta, que los fijadores mantienen la estructura biológica para ser sometidos a una técnica de tinción especial y obtener muestras de excelente calidad. Al igual que las coloraciones para estudios histopatológico también obtuvimos muestras de buena calidad como se observan en las Fig 5, se pudo observar: **(a)** Necrosis renal. **(b)** Corpúsculos renales pequeños. Y en la Fig 6, se pudo observar en la Zona medular profunda. **(a)** Pequeñas zonas hemorrágicas alrededor de los túbulos renales.

Dentro de los fijadores químicos más usados por investigadores y técnicos médicos encontramos: formaldehído bufferado, tetraóxido de osmio, líquido de Zenker; glutaraldehído, paraformaldehído, alcohol etílico, ácido acético, ácido pícrico, bicromato de potasio, el cloruro de mercurio y los ácidos



crómico y ósmico. El éxito del trabajo de laboratorio, dentro de una técnica específica, sea esta de inclusión en parafina o inclusión en plástico, es la buena fijación (Rázuri, 1987).

La criogenización como método físico de fijación, cumple con la misma función de conservación, lo que nos llevó a obtener los mismo resultados, teniendo en cuenta los resultados fueron satisfactorios, y un diagnóstico real de lo observado. El tiempo óptimo de la fijación por criogenización del tejido renal, es mucho mayor con una técnica física, se produce a partir del día 17 al 22, luego de este tiempo, los bloques de tejido se endurecen y existe separación capsular. Obedeciendo así al objetivo planteado que era de determinar las propiedades de fijación utilizando una técnica física.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES

Después de haber analizado los resultados del presente trabajo de investigación, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Que la técnica de criogenización, utilizando nitrógeno líquido a una temperatura de  $-190^{\circ}\text{C}$ , como fijador de tejido renal de conejo, conserva en óptimas condiciones las estructuras estromales y parenquimatosas del órgano.
2. El tiempo óptimo de la fijación por criogenización del tejido renal, se produce a partir del día 17 al 22, luego de este tiempo, los bloques de tejido se endurecen y existe separación capsular.
3. Existe afinidad de los tejidos renales fijados por criogenización, hacia los colorantes, en este caso hacia la Hematoxilina-Eosina. (Tanto para un estudio histológico o un estudio histopatológico como pudimos observar en el estudio realizado).
4. El tiempo de fijación mediante esta técnica es mucho mayor en comparación a los métodos químicos existentes, pero eficiente si se tiene el tiempo adecuado.

## **CAPÍTULO VII**

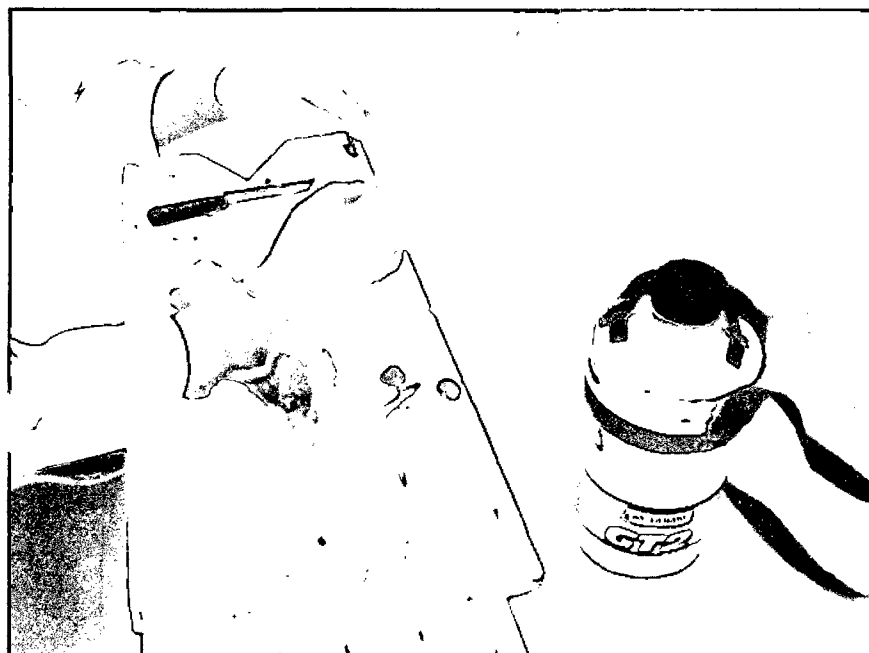
### **REFERENCIAS**

1. Bravo R. 1987. Tratado de Física Medica. Primera Edición. Editorial Interamericana San Francisco Estados Unidos.
2. Bascuas K y Asta P. 1989. Biofísica General. Segunda Edición. Editorial Acribia. Buenos Aires-Argentina.
3. Banks W. J. 1989. Histología. Primera Edición. Editorial Panamericana. Bogotá Colombia.
4. Han R. 1998. Histología General. Primera Edición. Editorial Labor S. A. Barcelona España.
5. Greep R. O. 1987. Histología. Primera Edición. Editorial Salvat Editores S. A. Barcelona España.
6. Márquez L. K. 1995. Tratado de Histología. Primera Edición. Editorial Salvat Editores Barcelona España.
7. Rázuri P. 1987. Histología. Primera Edición. Editorial Mediterráneo Santiago de Chile.
8. Romero E. 2002. Patología General y Fisiopatología. Primera Edición. Editorial ALHAMBRA, S. A. Madrid España.

9. La criogenización en: [www.tendencias21.net/histologiaanimal](http://www.tendencias21.net/histologiaanimal)  
(Consultado el 20.06.2014).
10. Atlas histología vegetal y animal en: [www.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijacion.php](http://www.uvigo.es/mmegias/6-tecnicas/2-fijacion.php).  
(Consultado el 20.05.2014).
11. Histología veterinaria en: [www.ucsg.edu.ec/catolica/histologia8.htm](http://www.ucsg.edu.ec/catolica/histologia8.htm)  
(Consultado el 20.05.2014).

**ANEXO****ANEXO 1. FOTOGRAFÍAS QUE MUESTRAN LOS PASOS DE LA METODOLOGÍA.**

**Fotografía 1.** Inmediatamente después del sacrificio del conejo, se coloca sobre una mesa acanalada de cúbito dorsal. Se disecciona por la línea media y se exponen los dos riñones (Izquierdo y derecho).



**Fotografía 2.** Toma de la muestra de tejido renal de conejo. De cada uno de los riñones (Riñón derecho e izquierdo) se toma un bloque de tejido de 1 centímetro cúbico aproximadamente, el cual es depositado en una bolsa pequeña de plástico transparente donde permanecerá durante el tiempo de fijación.



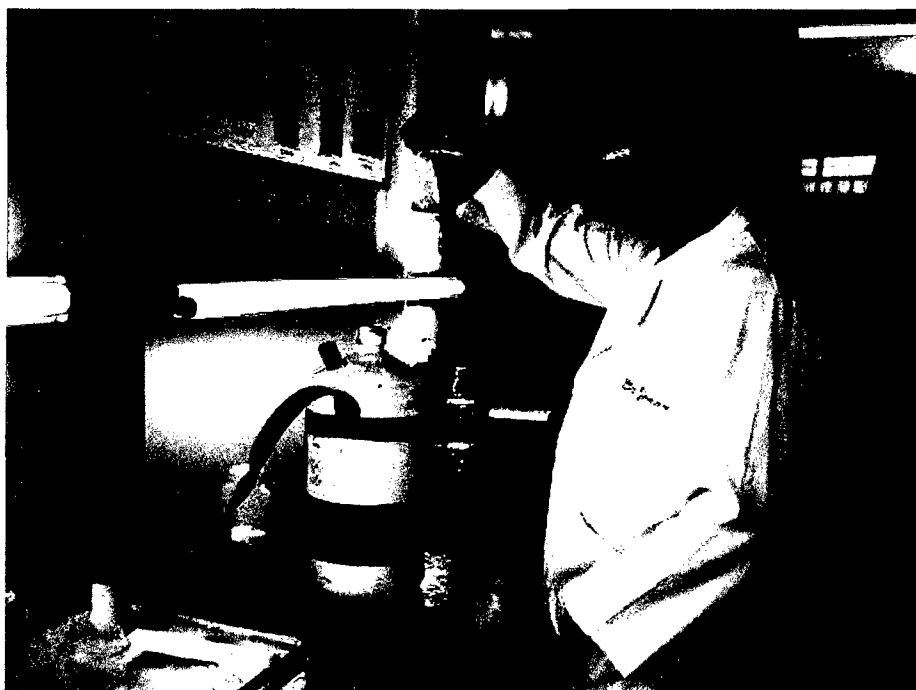
**Fotografía 3.** La bolsa plástica que contiene el bloque de tejido renal, se coloca en el tanque que contiene nitrógeno líquido como fijador físico (Criogenización), a una temperatura de  $-190^{\circ}\text{C}$ .

## **ANEXO 2.**

- 1. Microtomía.** Obtenido el endurecimiento y enfriamiento de los tacos de parafina, se los montó al micrótopo de rotación, para obtener rebanadas de tejido a 5 – 8 micras de grosor. Estos cortes se extendieron en Baño María (37°C – 40°C), que previamente contiene gelatina adhesiva. Se recupera el corte con una lámina portaobjetos, se las deja secar al aire libre hasta el momento de colorearlas.
- 2. Coloración.** Una vez seca la muestra. Se la lleva a cabo la coloración con Hematoxilina-Eosina.
- 3. Montaje.** Finalmente, se realizó el montaje, adicionando 1 gota de Bálsamo de Canadá, como pegamento, se colocó una laminilla cubreobjetos, evitando por presión la formación de burbujas de aire.



**ANEXO 3. TÉCNICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA. LABORATORIO DE EMBRIOLGÍA E HISTOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS.**



**Fotografía 5. Fijación:** Observación periódica del bloque de tejido renal de conejo, criogenizado, para observar si la muestra reúne las condiciones anatómicas y físicas para seguir con la Técnica de Inclusión en Parafina.



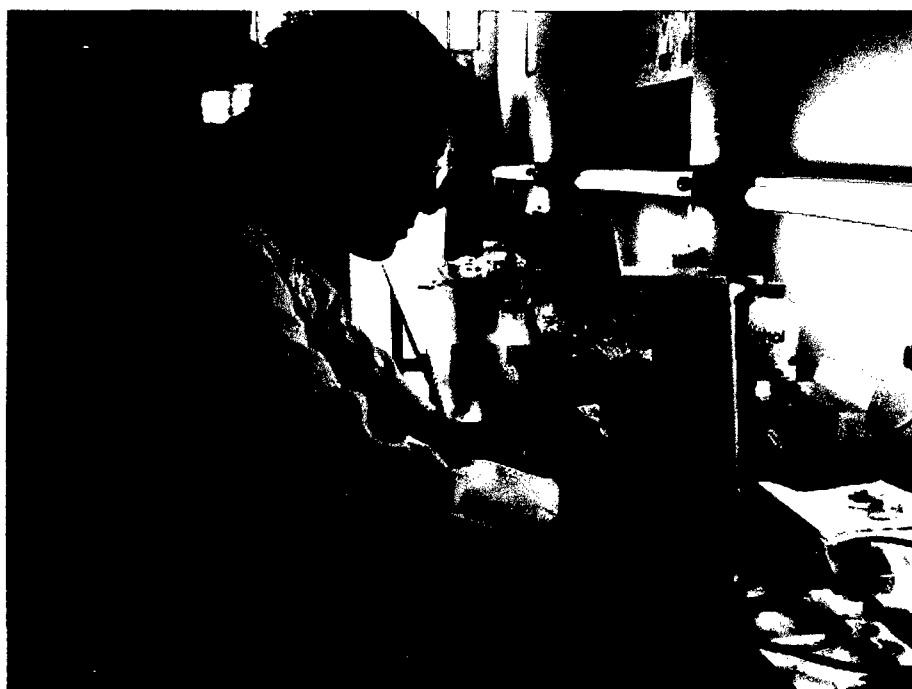
**Fotografía 6.** El bloque de tejido renal a la observación y palpación (color oscuro homogéneo y consistencia dura), entre los 17-22 días de criogenización, se encuentra en condiciones para proseguir con la técnica.



**Fotografía 7. Deshidratación:** El bloque de tejido renal de conejo, entra al primer baño de alcohol etílico 80°C, para luego seguir con los baños de alcohol de concentración ascendente. **Aclaramiento:** Luego de la deshidratación, los bloques de tejido renal entran a tres baños de Xilol.



**Fotografía 8. Confección de tacos de parafina.** La muestra de tejido renal de conejo es colocada en moldes metálicos que contienen parafina diluida para formar los tacos correspondientes.



**Fotografía 9.** Diagnóstico histológico de las muestras de tejido renal de conejo.



**Fotografía 10.** Toma de Microfotografías de cortes histológicos de tejido renal de conejo.

**ANEXO 11. PREPARACIÓN DE FOSFATO BUFFERADO SALINO (FBS)**

**FBS = 0,15 M CLORURO DE SODIO Y 0,01 M FOSFATO MISHEL and STANLEY.**

1. Dentro de un beaker con capacidad para un litro, se coloca una barra imantada.
2. El beaker es llenado con 800 ml de agua recientemente destilada.
3. Se coloca así el beaker sobre el plato del agitador magnético, agitando lentamente.
4. Se adiciona 1,194 g de fosfato sódico bibásico anhidro y 0,256 g de fosfato sódico monobásico monohidratado. Se continua agitando hasta que disuelva (se puede someter a calor si es necesario).
5. Si ha usado calor se espera a que enfrié y se mide el pH en un peachímetro ajustando si es necesario con 1,0 N di hidróxido de sodio hasta que el pH se encuentre entre 7,2 y 7,4.

**Nota:** La preparación del 1,0 N de hidróxido de sodio se hace disolviendo en un beaker con capacidad para 100 ml 4 g de NaOH en 80 ml de agua destilada, se transfiere esta solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agrega 20 ml de agua destilada agitando la solución.

6. Se continúa agitando la solución y se agrega 8,766 g de NaCl esperando que disuelva.
7. Se transfiere la solución hacia u frasco volumétrico de 1 litro y se adiciona 200 ml de agua destilada agitando constantemente.

**ANEXO 12. SOLUCIÓN DE FORMOL BUFFERADO NEUTRAL AL 10%.**

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

**ANEXO 13. GELATIVA ADHESIVA AL 5%**

Gelatina farmacéutica.....	5 g.
Agua destilada.....	100 ml.

Disolver con ayuda de calor. Adicionar varios cristales de timol para preservar. Para uso, mezclar completamente tres cucharadas de la solución de la gelatina al 5% por 1000 ml, en el baño de flotación.



**ANEXO 14. HEMATOXILINA DE HARRIS.****STOCK DE EOSINA AL ALCOHOL AL 1%.**

Eosina (amarillenta), agua soluble.....1g.  
Agua destilada.....20 ml.  
Disolver y adicionar.  
Alcohol 95%.....80ml.

**SOLUCIÓN DE EOSINA PARA TRABAJO**

Stock de eosina alcohólica al 1%.....1 parte.  
Alcohol 80%.....3 partes.  
Justo antes de usar, adicionar 0.5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante y remover.

**ANEXO 15. ALCOHOL ÁCIDO.**

Alcohol 70%.....100 ml.  
Ácido clorhídrico concentrado.....1 ml.

**CARBONATO DE LITIO SATURADO AL 1%**

Carbonato de litio.....1g.  
Agua destilada.....100 ml.

## ANEXO 16. TÉCNICA DE DESHIDRATACIÓN, ACLARAMIENTO, IMPREGNACIÓN E INCLUSIÓN (TACOS) DE MUESTRA ENVIADOS AL LABORATORIO.

### DESHIDRATACIÓN

1. Lavado en agua corriente.....5'-10'
2. Alcohol 80%.....1 hora
3. Alcohol 95%.....1 hora
4. Alcohol 95%.....1 hora
5. Alcohol 100%.....1 hora
6. Alcohol 100%.....1 hora
7. Alcohol 100%.....1 hora

### ACLARAMIENTO

8. Xilol.....1 hora
9. Xilol.....1 hora
10. Xilol.....1 hora

### IMPREGNACIÓN

11. Parafina 56°-58°.....2 horas
12. Parafina 56°-58°.....2 horas
13. Parafina 56°-58°.....2 horas

### INCLUSIÓN

14. Confección de tacos

## ANEXO 17. TÉCNICA DE COLORACIÓN DE HEMATOXILINA-EOSINA

### TIEMPO DE DURACIÓN.

1. Xilol .....3 minutos
2. Xilol..... 3 minutos
3. Alcohol absoluto al 100 % .....3 minutos
4. Alcohol absoluto al 100%.....3 minutos
5. Alcohol absoluto al 95% .....3 minutos
6. Alcohol absoluto al 95% .....3 minutos
7. Alcohol absoluto al 70 % .....3 minutos
8. Agua destilada .....3 – 5´
9. Agua destilada .....5 minutos
10. Hematoxilina .....5 – 10´
11. Agua destilada .....3 – 5´
12. Alcohol acido-enjuagar..... -----
13. Agua destilada-enjuagar ..... -----
14. Carbonato de litio al 1 % ..... 2 minutos
15. Lavado agua corriente .....10 minutos
16. Lavado agua destilada .....5 minutos
17. Alcohol absoluto al 70% .....3 minutos
18. Eosina .....1 – 5´
19. Alcohol absoluto al 70%.....3 minutos
20. Alcohol absoluto al 95% .....2 minutos
21. Alcohol absoluto al 95% .....2 minutos
22. Alcohol absoluto al 100% .....2 minutos
23. Alcohol absoluto al 100% .....2 minutos
24. Xilol .....3 minutos
25. Xilol .....3 minutos
26. Xilol .....3 minutos
27. Colocar una gota de bálsamo de Canadá sobre la lámina portaobjetos y cubrir con la lámina cubreobjetos.
28. Observar al microscopio.