

SOCIEDAD ARGENTINA DE HISTOTECNOLOGÍA

30SAH

ANIVERSARIO NÚMERO 30 | 1989-2019

XXIV Congreso Argentino de Histotecnología.

INTERPRETACIÓN MICROSCÓPICA DE COLORACIONES ESPECIALES

Curso Pre-Congreso

Septiembre, 2019. Rosario. Santa Fe

TRICRÓMICOS

Leeuwenhoek fue probablemente la primera persona en emplear colorantes en muestras biológicas, en 1714 coloreó con azafrán disuelto en vino, muestras de músculo. Geppert y Cohn en 1849 utilizaron el carmín. Por su parte, en 1863, Waldeyer utiliza la hematoxilina y finalmente en 1876 cuando se introduce la técnica H&E, es que también se introduce el término de coloraciones especiales.

Las técnicas especiales, nos permiten conocer la presencia o ausencia de algunas moléculas, su ubicación y cierto grado de cuantificación.

Las principales aplicaciones, tanto en el área de diagnóstico como en la investigación, corresponden a la determinación de ácidos nucleicos, modos

de acción de drogas, presencia o ausencia de hormonas y de potenciales sustancias tóxicas; bases biológicas de algunos tumores; detección temprana de invasión de tumores; demostración de organismos: bacterias, hongos; demostración de sustancias: mielina, colágeno, elastina, mucinas, glucógeno, amiloides y también de depósitos de elementos (ej.: hierro). Los tricrómicos son considerados técnicas especiales, métodos de coloración frecuentemente utilizados. Se refieren a aquellos métodos de tinción que utilizan dos o más colorantes ácidos de tonos contrastantes.

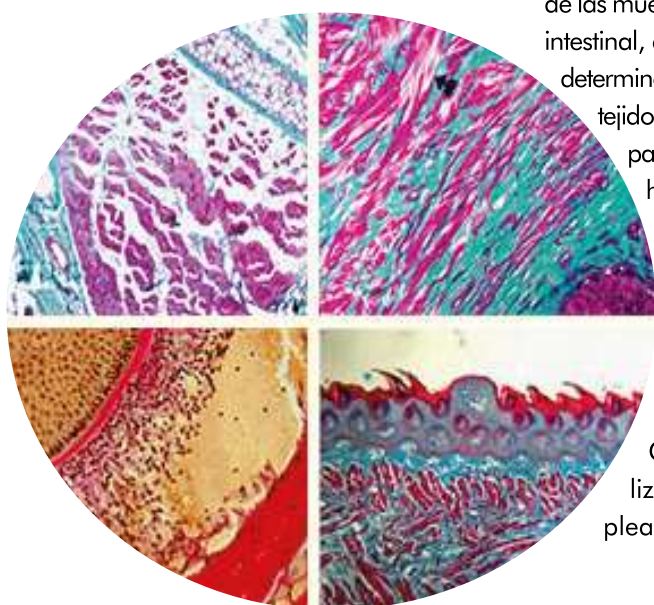
Estas coloraciones, generalmente se utilizan para la demostración de componentes básicos del tejido, para demostrar colágeno con frecuencia en contraste con el músculo liso en la mayoría de las muestras (de tejido hepático, renal, intestinal, cardíaco, muscular y nervioso), determinar y cuantificar el aumento del tejido conectivo en determinadas patologías como en la cirrosis hepática, en algunas afecciones renales o en enfermedades neuromusculares, y también pueden ser utilizado para enfatizar la presencia de fibrina en contraste con los eritrocitos.

Gibbs en 1880 ya había utilizado coloraciones que empleaban tres colores en tejido

animal, con picrocarmin, iodo y verde de malaquita. Pero no fue hasta que Frank Burr Mallory desarrolló el método específico para la demostración del tejido conectivo que recibe el nombre de tricrómico. Las secciones de tejido eran coloreadas de con fucsina ácida, azul de anilina-Orange G, lo que permitió observar las fibras de tejido conectivo en azul, neuroglia y fibras musculares en rojo y las fibras elásticas en rosa al amarillo.

Los factores que influyen en este tipo de método son: el espesor de corte y el fijador utilizado; los colorantes empleados (concentración, tiempo en que se colorea el corte, etc.). También depende de la permeabilidad del tejido (el colágeno es más permeable que el citoplasma de la fibra muscular).

Estos métodos invariablemente utilizan colorantes disueltos en solventes de pH ácido, generalmente el ácido acético glacial. Normalmente, la concentración de ácido acético coincide con la concentración de colorante (1% de colorante en 1% de ácido, 2% de colorante en 2% de ácido, etc.). Esto no es necesario, pero es una práctica común. El pH ácido en sí es una condición necesaria para maximizar la cantidad de colorante que se adhiera a los grupos amino del tejido, es decir, es un acentuador.



Este pH bajo tiene un efecto sobre la tinción nuclear con hematoxilina, por ello se utilizan hematoxilas cuyo mordiente sea a base de hierro (Weigert o Heidenhain), para obtener mejor contraste ya que las demás se decoloran tras el tratamiento ácido que requiere la técnica.

Estas técnicas colorean generalmente el citoplasma rojo, mientras el colágeno es generalmente teñido con un colorante verde o azul. Colorantes "amarillos" de bajo peso molecular se incluyen a veces para teñir eritrocitos y pueden incluir la fibrina.

Las fibras colágenas son clasificadas en 16 tipos diferentes en función de su estructura y su ubicación requiere otro tipo de metodología ya que los tricrómicos sólo permite identificarlas del resto de las fibras. El colágeno es intermedio entre las proteínas globulares y la elastina en cuanto a la tinción. Con este tipo de coloración se demuestra la presencia de colágeno en la capa subepitelial de la mucosa del colon, para confirmar la colitis microscópica, incluida la colitis linfocítica y la colitis colagenosa, por ejemplo.

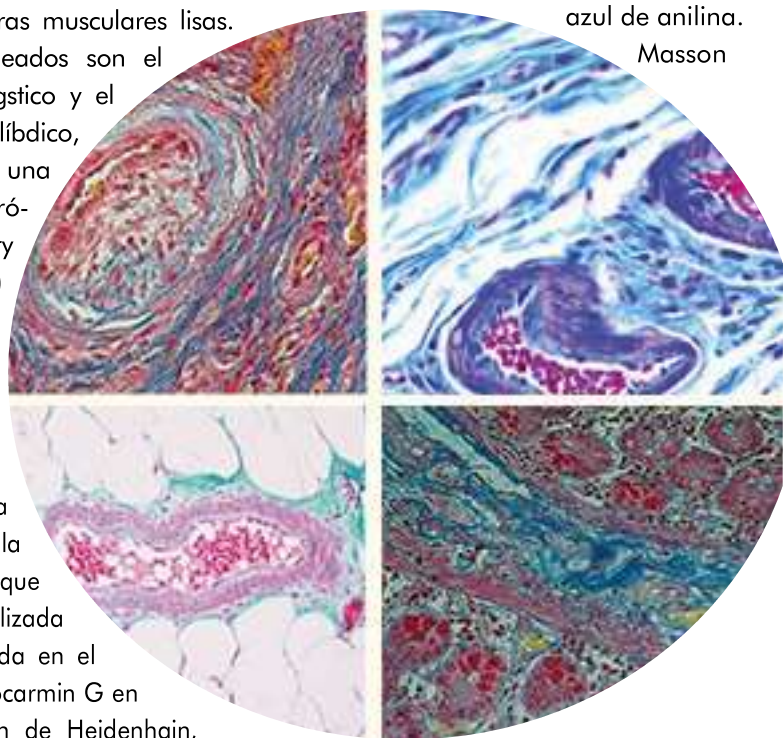
Los tricrómicos se clasifican en: Múltiples pasos o en Paso único.

En particular, los tricrómicos de varios pasos o múltiples, son aquellos en los que se aplican los colorantes secuencialmente. Algunos autores consideran que, en este tipo de procedimiento, es más importante la secuencia en la que se aplican, mientras que otros opinan que es el tamaño de las moléculas que se utilizan lo que importa. Pero todos concuerdan en que la utili-

Pero todos concuerdan en que la utilización de sustancias denominadas "poliácidos" es lo que permiten aumentar el contraste entre el colágeno y las fibras musculares lisas. Los más empleados son el Ácido fosfotúngstico y el Ácido fosfomolibdico, aunque hay una variante del tricrómico de Mallory (picro-Mallory) que emplea el Ácido tricloroacético.

Generalmente, esa secuencia comienza con la tinción nuclear que puede ser realizada con fucsina ácida en el Mallory o el azocarmin G en el método azán de Heidenhain, aunque lo más común es el empleo de la hematoxilina férrica de Weigert ya que tolera sin alterarse los pasos sucesivos de la técnica. El método de Mallory comienza con un colorante ácido, la fucsina ácida, luego de un lavado breve se expone a una solución de azul de anilina (methyl blue) y Orange G. La desventaja de esta técnica es que, al aplicar la fucsina ácida en una solución acuosa sin el agregado de ácido acético como acentuador, la coloración se pierde en los sucesivos lavado, por lo que será difícil diferenciar el músculo liso del tejido conectivo. Masson, posteriormente genera su variante, con la incorporación del ácido acético glacial a la solución colorante. Hay varias variantes de este método, algunos utilizan fucsina

ácida sola, otro emplea una solución de fucsina ácida con ponceau de xilidine y otra usa ponceau de xilidine solamente. Pero todos ellos emplean azul de anilina. Masson



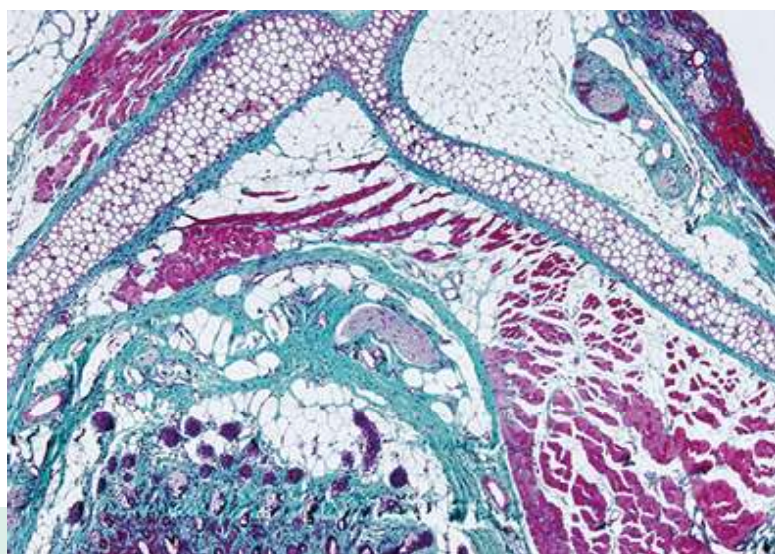
publicó dos variantes, ambas usaban fucsina ácida pero el colágeno en una de las variantes es coloreado por 0.5% de azul de anilina con ácido fosfomolibdico y la otra usa en lugar del azul de anilina, usa el metanil yellow. Los tricrómicos de un solo paso, se refieren a aquellos en los que se combinan todos los colorantes y otros reactivos en una sola solución y se aplica durante un tiempo especificado. Estos métodos incluyen los métodos de Van Gieson y el de Gomori.

Particularmente, el tricrómico de Van Gieson emplea una molécula de bajo peso molecular, amarilla, ácida en combinación con la fucsina ácida u otro colorante similar (Squires en 1892 sugería una combinación de 0,3% de

fucsina ácida en 2% de Orange G), lo que permite la coloración diferencial de los eritrocitos. Pero el más populares, es el tricrómico de Gomori, que emplea una solución de colorantes: Cromotrope 2R (CI 16570), Fast Green FCF o Light green (para teñir fibras colágenas) y como poliácido utiliza el ácido fosfotúngstico.

Método de un solo paso:

TRICRÓMICO DE GOMORI



Oreja de rata.

<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-t-Gomori.php>

SOLUCIONES

1. Celestine Blue:

5% sulfato férrico de amonio
(iron alum): 100 ml.

Celestine Blue (CI 51050): 0,5g

Agregar el Celestine Blue a la solución de sulfato férrico de amonio, hervir por 3 min. Filtrar una vez frío y guardar en heladera.

2. Tricrómico de Gomori:

Agua destilada: 200 ml.

Chromotrope 2R (CI 16570): 1,2g

Light green Sf (CI 42095): 0.6g

Ácido fosfotúngstico: 1,6g

Ácido Acético glacial: 2 ml

Disolver cada reactivo separadamente en alícuotas de 50ml de agua destilada, y luego mezclar las cuatro soluciones. Guardar en heladera overnight, filtrar y guardar.

PROCEDIMIENTO

- 1.Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
- 2.Coloración con Celestine Blue, 5 min.
- 3.Lavar con agua destilada.
- 4.Coloración nuclear con hematoxilina.
- 5.Virado con agua corriente.
- 6.Colorear con solución de Gomori, 15 min.
- 7.Lavar con agua destilada.
- 8.Deshidratar, aclarar y montar.

Requiere control bajo microscopio

RESULTADOS:

Fibras musculares-----rojas

Fibras colágenas-----verdes.

Núcleos-----negro azulado.

REFERENCIAS

Gomori G, (1950), Am. J. Clin. Path

TRICRÓMICO DE VAN GIESON

SOLUCIONES

1. Celestine Blue

5% de sulfato férrico de amonio (alumbre de hierro): 100 ml

Celestine Blue (CI 51050): 0,5 g

Agregue el azul celeste al sulfato férrico de amonio y hierva por 3 minutos.

Filtrar cuando esté frío. Almacenar refrigerado.

2. Solución de Curtis:

ácido pícrico acuoso saturado: 90.0 ml

1% ponceau S: 10 ml

ácido acético glacial: 10 ml

3. 1% Ponceau S

Ponceau S (CI 27195): 1 g

agua destilada: 100.0 ml

PROCEDIMIENTO:

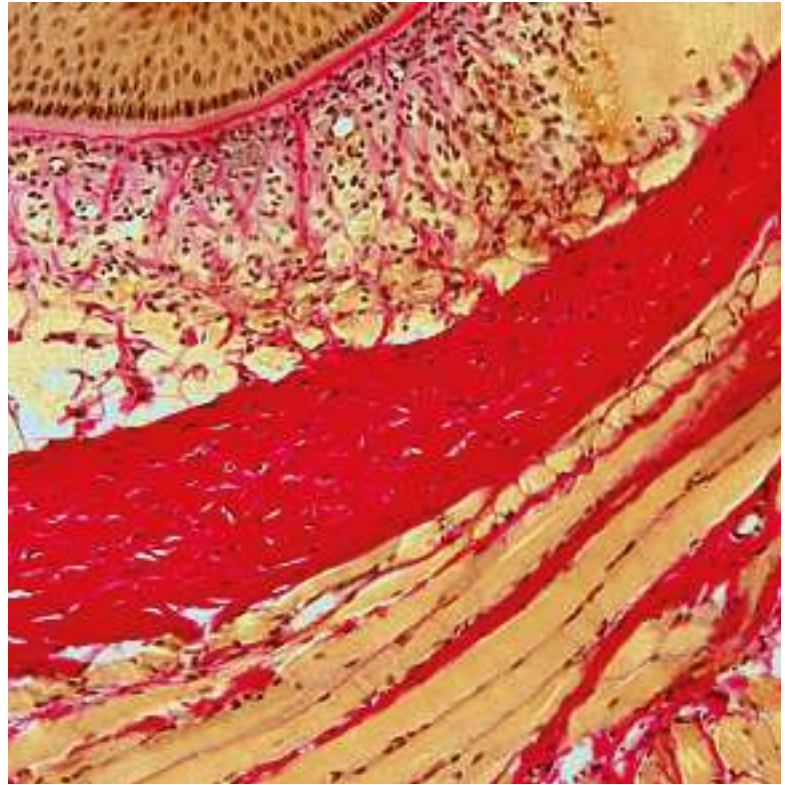
1. Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
2. Teñir los núcleos con Celestine blue, 5 minutos
3. Enjuagar en agua destilada
4. Colorear con hematoxilina 5 minutos
5. Virar bien con agua corriente por 5 minutos
6. Teñir con solución de Curtis 5 minutos
7. Drenar el exceso
8. Deshidratar rápidamente en alcoholes, aclarar y montar

REFERENCIAS

Manual de técnicas histológicas. Bancroft, J.D. y Cook, H.C. (1984), Churchill Livingstone.

Método de coloración selectivo del tejido conjuntivo.

Curtis F., C R soc Biol 1905; 58: 1038-40



Zona profunda de la dermis

RESULTADOS:

Núcleos -----azul

Colágeno -----rojo brillante

Citoplasma, músculo, fibrina y
glóbulos rojos-----amarillo



Piel

Método de pasos múltiples

TRICRÓMICO DE MALLORY

SOLUCIONES

1. Solución A:

Fucsina ácida: 1gr
Agua destilada: 100 ml

2. Solución B:

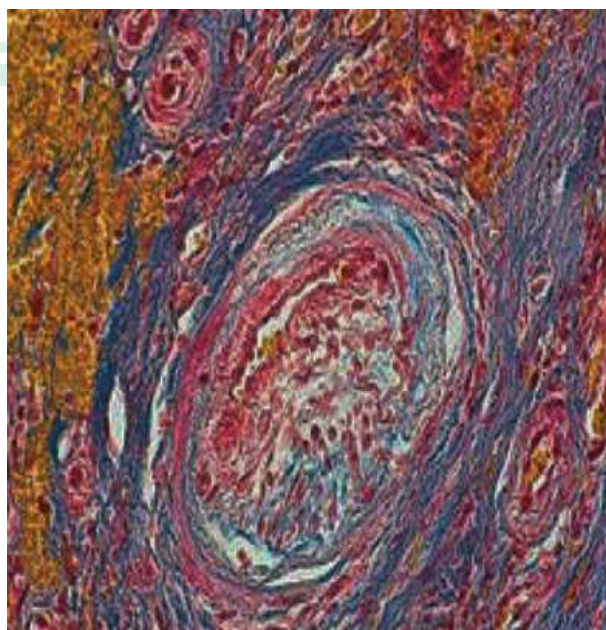
Ácido fosfomolibdico: 1gr
Agua destilada: 100 ml

3. Solución C:

Organge G: 2 gr
Azul de metilo: 0.5 gr
Ácido oxálico: 2gr
Agua destilada: 100 ml

Nota:

El ácido fosfomolibdico puede ser sustituido por ácido fosfotúngstico.



RESULTADOS:

Fibras musculares.....rojo.
Fibras colágenas.....azul.
Núcleos.....rojos
Eritrocitos.....naranja.

PROCEDIMIENTO

- 1-Desparafinar e hidratar hasta agua destilada
- 2-Coloración con solución A durante 2 minutos.
- 3-Lavar con agua destilada.
- 4-Coloración con solución B durante 2 min.
- 5-Lavado rápido con agua destilada.
- 6-Colorear con solución C, 15 min.
- 7-Lavar con agua destilada.
- 8-Deshidratar, aclarar y montar.

REFERENCIAS

Formulario y guía del microtomista. Gray, Peter. (1954) (Ed. The Blakiston Co.- Robert E. Krieger Publishing Co.) Citando: Mallory, (1901) y Mallory, (1936)
Journal of Experimental Medicine, v.5, pp.15 Tecnología de tinción ,v.11, pp.101

TRICRÓMICO DE MASSON

SOLUCIONES:

1. Solución de Bouin:

Ácido pícrico (saturado): 75 ml
 Formaldehído (37-40%): 25 ml
 Ácido acético glacial: 5 ml
 Mezclar bien. Optativo

2. Solución de hematoxilina de hierro de Weigert:

Solución de stock A:

Hematoxilina: 1 g
 95% de alcohol: 100 ml

Solución B de stock:

29% de cloruro férrico en agua: 4 ml
 Agua destilada: 95 ml
 Ácido clorhídrico conc.: 1 ml

Solución de trabajo de hematoxilina de hierro de Weigert:

Mezcle partes iguales de la solución madre A y B. Esta solución de trabajo es estable durante 3 meses.

3. Solución de fucsina de ácido escarlata de Biebrich:

Biebrich escarlata, 1% ac: 90 ml
 Fucsina ácida, acuosa al 1% : 10 ml
 Ácido acético, glacial: 1 ml

4. Solución de ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico:

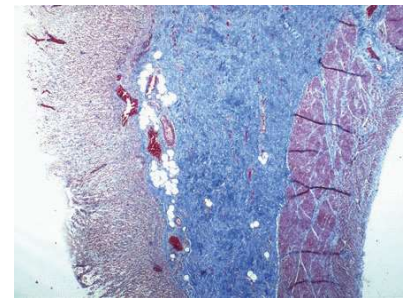
5% de ácido fosfomolibdico : 25 ml
 5% de ácido fosfotúngstico : 25 ml

5. Solución de anilina azul:

Azul anilina: 2.5 g
 Ácido acético glacial: 2 ml
 Agua destilada: 100 ml

6. Solución de ácido acético al 1%:

Ácido acético, glacial: 1 ml
 Agua destilada : 99 ml



PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Lavar en agua destilada.
3. Para el tejido fijado con formalina, vuelva a fijar en la solución de Bouin durante 1 hora a 56 ° C para mejorar la calidad de la tinción.
4. Enjuagar el agua corriente durante 5-10 minutos.
3. Colorear con la solución de trabajo de hematoxilina de hierro de Weigert durante 10 minutos.
4. Enjuagar con agua corriente tibia durante 10 minutos.
5. Lavar en agua destilada.
6. Teñir en una solución de fucsina de ácido escarlata Biebrich durante 10-15 minutos.
7. Lavar en agua destilada.
8. Diferenciar en solución de ácido

fosfomolibdico-fosfotúngstico por 10-15 minutos o hasta que el colágeno no esté rojo.

9. Transferir las secciones directamente (sin enjuague) a una solución de azul de anilina durante 5-10 minutos. Enjuagar brevemente en agua destilada y diferenciar en solución de ácido acético al 1% durante 2-5 minutos.

10. Lavar en agua destilada.

11. Deshidratar muy rápidamente (este paso eliminará la tinción de fucsina de ácido escarlata de Biebrich), aclarar y montar.

Controles positivos: Piel, pulmón, estómago, intestino.

RESULTADOS:

Colágeno -----azul
 Nucleos -----negro
 Músculo, citoplasma, queratina-----rojo

Notas

1.Desde que Masson dio detalles de su método original, se han publicado numerosas variaciones. Una variante común es la de Lillie, un método a menudo erróneamente llamado tricrómico de "Masson". Estas variantes difieren en los detalles de los colorantes utilizados, la concentración de los colorantes y poliacidos y los tiempos para los que se aplican.

2.Los tiempos dados aquí deben considerarse una guía, aunque generalmente se encontrarán satisfactorios si el procedimiento se sigue por completo, incluida la refijación de secciones en el fluido de Bouin.

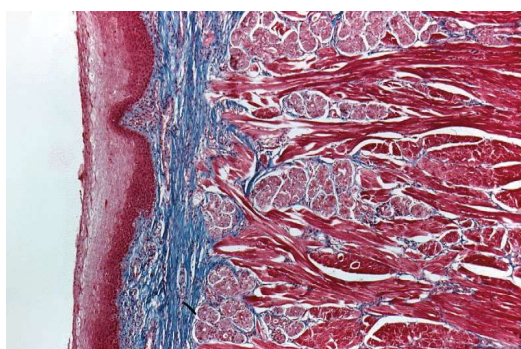
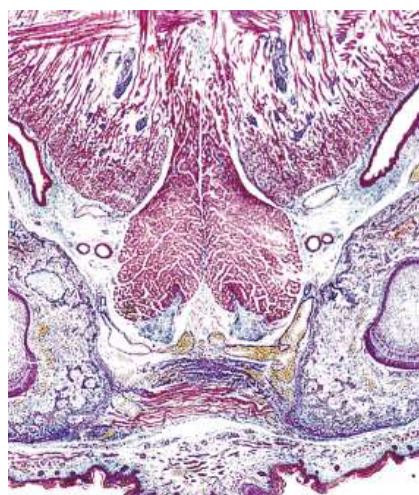
3.Al volver a fijar las secciones en el líquido de Bouin, se intensifican los colores y aumenta el contraste entre los componentes del tejido. A veces se denomina incorrectamente mordiente, pero no tiene un efecto mordiente real. Cabe señalar que

la fijación primaria en el líquido de Bouin se recomienda para este método.

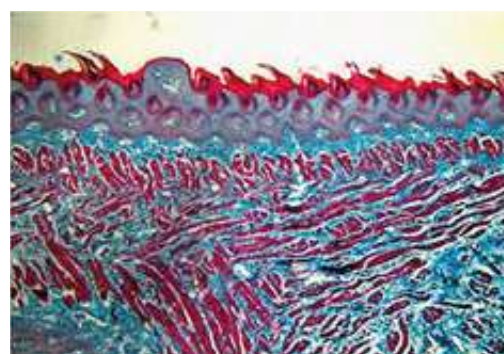
4.Los colorantes en la solución A tiñen el músculo, la fibrina, el citoplasma y los eritrocitos, y la solución a veces se denomina tinción plasmática. La fucsina ácida y la ponceau de xilidina son los colorantes recomendados originalmente. Se han sugerido muchos otros colorantes ácidos rojos. Biebrich escarlata, por ejemplo, siendo utilizada por Lillie.

5.La solución C a veces se llama mancha de fibra. Se usa para colorear el colágeno. Algunos otros materiales también serán coloreados. El light green se usa comúnmente, pero el fast green da un verde más esmeralda.

6.El azul de anilina, o el azul de metileno se pueden sustituir solos o en combinación si se prefiere el colágeno teñido de verde, usando verde luz al 2%.



Corte transversal de la lengua
 Departamento de Biología Celular y
 Tisular, Facultad de Medicina. Universi-
 dad Nacional Autónoma de México



Corte transversal de la superficie dorsal de
 la lengua

Comparison of three types of histochemical stain-
 ing in histological sections of palate and tongue
 of Wistar rat.

L.Salazar, F. Moreno

Salutem Scientia Spiritus 2016; 2(2):12-23.

VARIANTES DEL TRICRÓMICO DE MASSON

SOLUCIONES:

Hematoxilina de hierro de Régaud o equivalente

Solución A	var 1	var 2	var 3	var 4
Fucsina ácida	0.5 gr	0,35gr	-	1gr
Ponceau 2R	-	0,65gr	1gr	1gr
Ácido acético glacial	0.5 ml	1ml	1ml	1ml
Agua destilada	100ml	100ml	100ml	100ml

Solución B

Ácido fosfomolibdico: 1gr

Agua destilada 100 ml

Solución C

Ácido acético, glacial: 2.5 ml

Agua destilada: 97,5 ml

Azul anilina: A saturación

Mezclar el ácido acético y el agua.

Solución D

Ácido acético, glacial: 1 ml

Agua destilada: 99 ml

Solución E

Ácido acético, glacial: 1ml

Etanol absoluto: 99 ml

RESULTADOS

Núcleos-----negro

Colágeno-----azul

Hueso-----azul oscuro

Epitelios-----rojo claro

Músculo-----rojo claro

Eritrocitos-----naranja

Tejido nervioso-----violeta

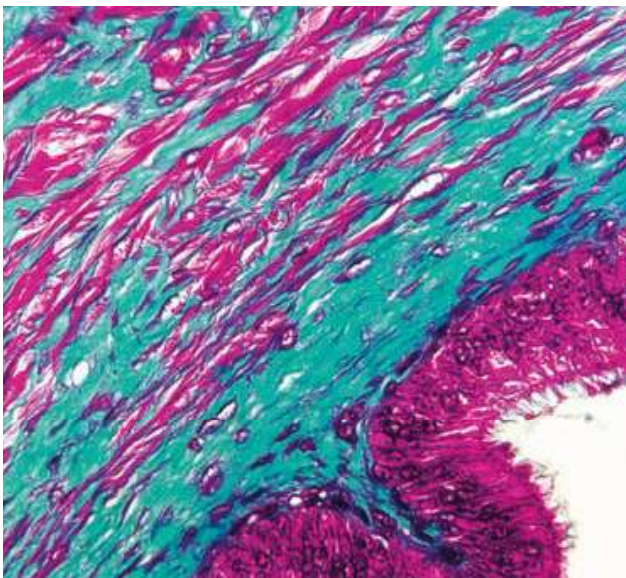
REFERENCIAS

Teoría y práctica de técnicas histológicas, Bancroft, JD y Stevens, A. (Ed. Churchill Livingstone, Londres.)

Formulario y guía del microtomista. Gray, Peter. (1954)

(Ed. The Blakiston Co. y Robert E. Krieger Publishing Co.)

www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/masson_trichrome.htm



Corte transversal del segmento epididimario del conducto deferente.

MORFOLOGÍA DEL CONDUCTO DEFERENTE EN EL CONEJO (Oryzomys cuniculus) Int. J. Morphol., 21(1):15-21, 2003.

HISTOQUIMICA

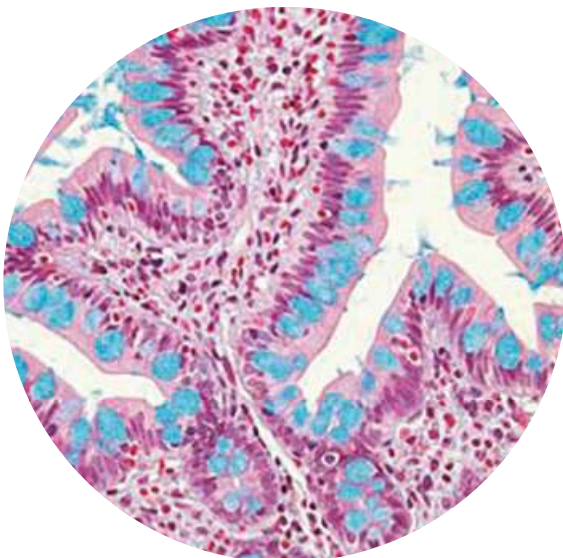
ALCIAN BLUE

Es una Ftalocianina, colorante básico polivalente soluble en agua. El tono corresponde a la presencia de un átomo de cobre en el centro de su molécula. Contiene cuatro (4) moléculas de isotiouronio (que confiere las cargas +).

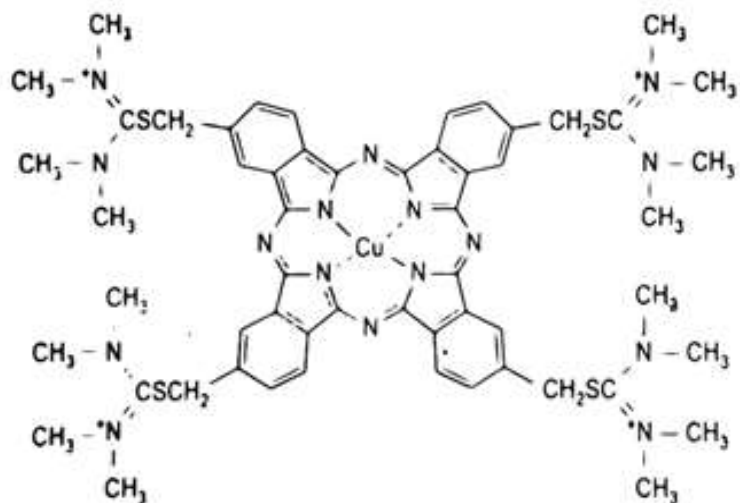
La solución colorante preparada a diferentes pH permite determinar mucopolisacáridos ácidos sulfatados y carboxilados y glicoproteínas. Se cree que forma enlaces salinos con los grupos ácidos de

los mucopolisacáridos ácidos. El Alcian blue colorea más intensamente si se prepara a un pH cercano al pH de ionización de los grupos reactivos. Por esto, si se prepara a pH 0,5 se colorean las macromoléculas con ésteres de sulfatados (que sólo estos ésteres se disocian quedando ionizados) y esto permite la diferenciación con los ésteres carboxilados que tienen una acidez menor y a este pH no se ionizan.

Mientras, a pH 2,5 (en una solución de ácido acético al 3%) colorean mucopolisacáridos ácidos sulfatados y carboxilados, siamucinas sulfatadas y carboxiladas (glicoproteínas). Además, si previamente a la reacción se someten los cortes a una metilación suave, sólo dan positivos los ésteres de sulfato ya que los carboxilados quedan bloqueados.



Alcian blue BG



SOLUCIONES:

según el pH que se quiera emplear.

pH 2,5:

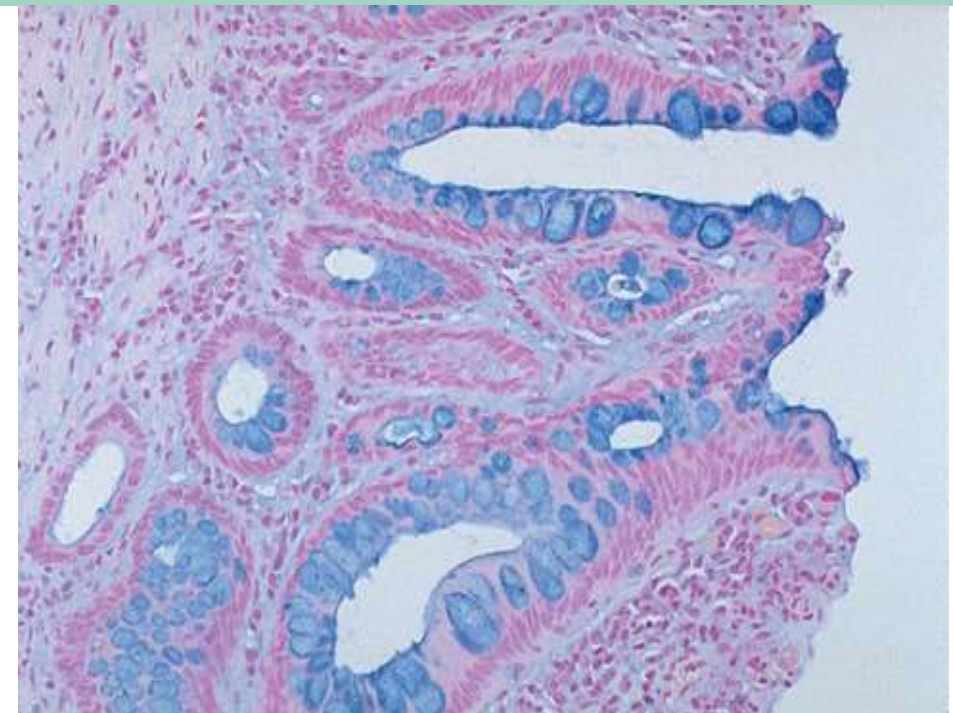
3% de ácido acético glacial
 3 ml de ácido acético glacial en 97 ml de agua destilada. Conservar en heladera, con tapón de seguridad, hasta un año.

pH 0,5:

0,2 M de HCL (prepararlo en el momento de uso),
 1gr de Alcian Blue 8GX
 Disolver en 100ml de solución ácida. Mezclar, ajustar el pH si es necesario, filtrar y guardar en heladera (hasta 6 meses)

0.1% Nuclear Fast Red:

Nuclear fast red: 0.1 g.
 Aluminum sulfate: 5g
 Agua destilada: 100 ml.
 Disolver aluminum sulfate en agua. Agregar el nuclear fast red y calentar con agitación hasta hervor. Enfriar. Filtrar y preservar con cristales de timol. Es estable por un año. Agitar antes de usar.



PROCEDIMIENTO:

- 1.Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.
- 2.Tratar con solución ácida, 10 min.
- 3.Lavar brevemente en agua destilada.
- 4.Colorear con solución de Alcian Blue (seleccionar correctamente el pH de la solución colorante necesaria), 30 min a temperatura ambiente o 30 seg en microondas (high power)
- 5.Lavar brevemente en agua corriente y luego por agua destilada.
- 6.Contrastar con Nuclear Fast Red, 5 min
- 7.Lavar con agua corriente y brevemente con agua destilada.
- 8.Deshidratar rápidamente, aclarar y montar.

Muestras control (+): Intestino delgado, apéndice o colon. Las muestras de tejido en las que se aprecia un exceso de mucosustancias ácidas no sulfatadas son, por ejemplo: mesoteliomas, lesiones por arterioesclerosis, algunos carcinomas principalmente adenocarcinomas, y en algunos tumores benignos como el mixoma, también en el mixedema (un tipo de edema con depósitos de mucinas en piel y otros órganos).

RESULTADOS:

Mucosustancias ácidas:-----azul-turquesa.
 Núcleos:-----rosa-rojizos.

TÉCNICA DE SCOTT. MÉTODO DE CONCENTRACIÓN DE ELECTROLITOS.

SOLUCIONES:

Rojo Neutro 0,5% (solución acuosa)

Alcian Blue pH 5,8:

Alcian blue: 0,05grs

Buffer Acetato pH 5,8: 100ml

Cloruro de Magnesio, según corresponda.

Preparación:

Agregue las siguientes cantidades de cloruro de magnesio a la solución de Alcian para obtener la molaridad del electrolito. Preparar en fresco.

0,06M	1.220	Todos los mucopolisacáridos ácidos
0.2 M	4.066	
0.3 M	6.099	Mucopolisacáridos ácidos sulfatados (+)
0.4 M	8.132	
0.5 M	10.165	Mucopolisacáridos ácidos sulfatados (+++)
0.6 M	12.198	
0.7 M	14.231	Heparina, Heparán sulfato, Queratán sulfato
0.8 M	16.264	
0.9 M	18.297	

Notas:

1. Las cantidades dadas para el cloruro de magnesio se basan en un peso de fórmula de 203.3 para el hexahidrato. Si la sal utilizada es diferente a esta, ajuste las cantidades agregadas a cada solución para obtener la molaridad correcta.
2. El cloruro de magnesio es higroscópico. Almacenar adecuadamente.
3. Las molaciones de los electrolitos para cada mucopolisacárido no se consideran absolutas,

y se requiere una estandarización y evaluación personal.

4. Este método generalmente se explica en base a los iones de magnesio que compiten con el azul de Alcian por los sitios de unión en los mucopolisacáridos. A medida que aumenta la concentración de iones de magnesio, se bloquea el acceso de los sitios de unión al azul alcian.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar hasta alcohol 70°.
2. Colocar en la solución colorante elegida, toda la noche.
3. Al día siguiente, lavar con agua destilada.
4. Contrastar /*con Rojo neutro.
5. Deshidratar, aclarar y montar.

RESULTADOS

0,06M	Todos los mucopolisacáridos ácidos	azul
0.2 M		
0.3 M	Mucopolisacáridos ácidos sulfatados (+)	azul
0.4 M		
0.5 M	Mucopolisacáridos ácidos sulfatados (+++)	azul
0.6 M		
0.7 M	Heparina, Heparán sulfato, Queratán sulfato	azul
0.8 M		
0.9 M		

Núcleos.-----rojo

REACCIÓN DE ÁCIDO PERYÓDICO-SCHIFF

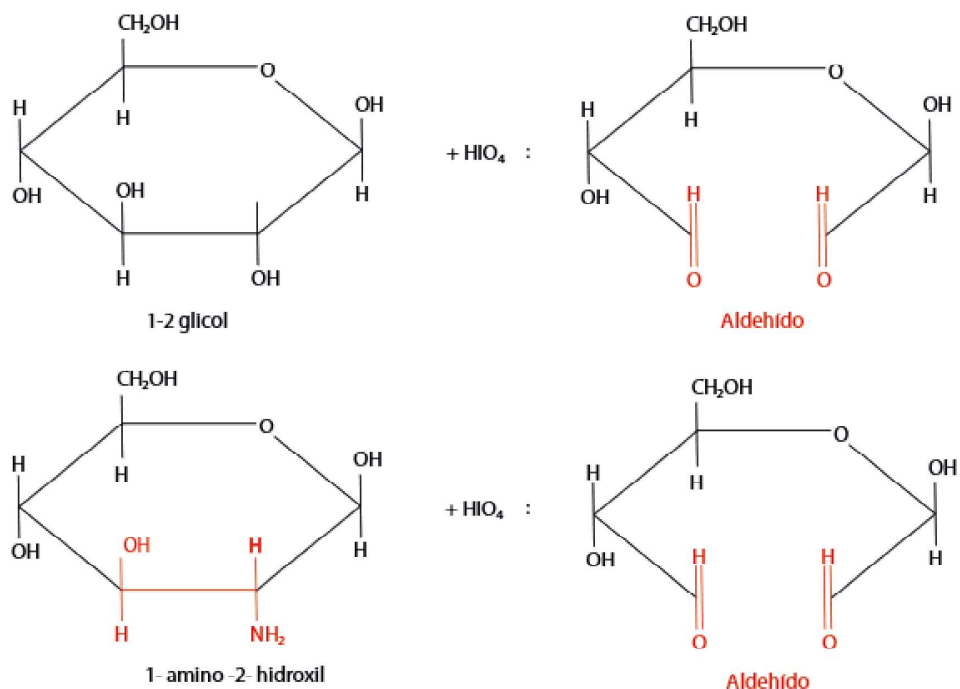
Es la técnica más versátil y ampliamente utilizada para la demostración de glucoproteínas, carbohidratos y mucinas en secciones de tejido, desarrollada por Hotchkiss en 1948.

La reacción se basa en la oxidación de algunos carbohidratos de los tejidos por medio del ácido periódico. Esto produce grupos aldehídos, que luego pueden demostrarse con el reactivo de Schiff

formando una coloración roja brillante y evidenciando el componente del tejido al que está unido el carbohidrato.

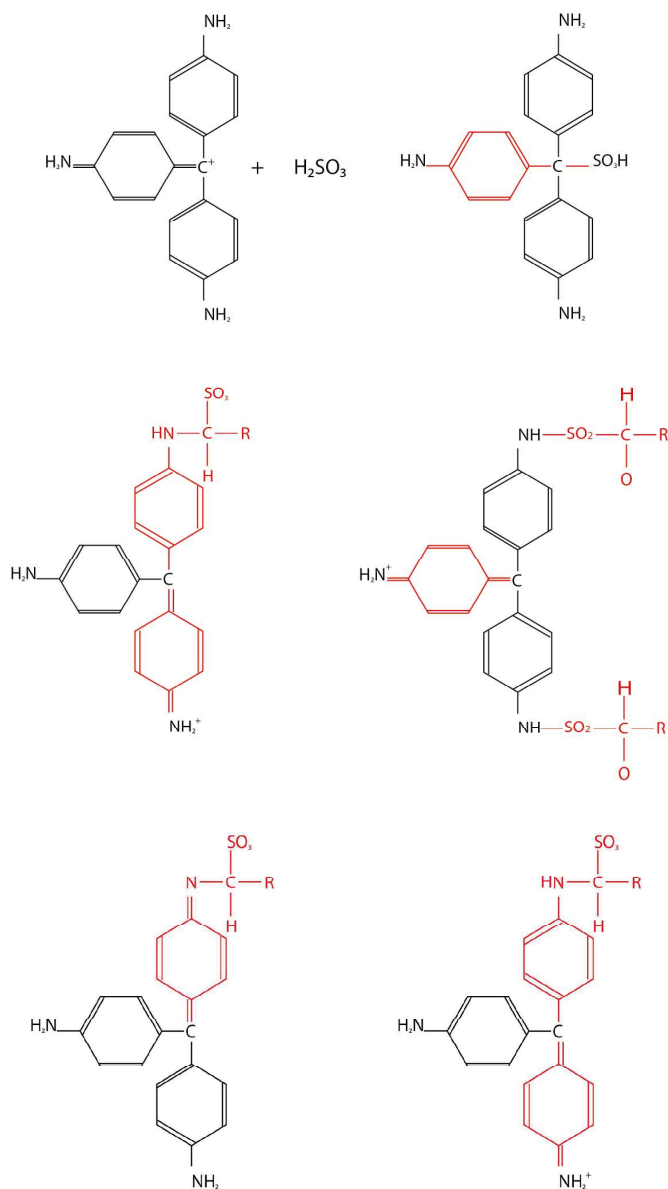
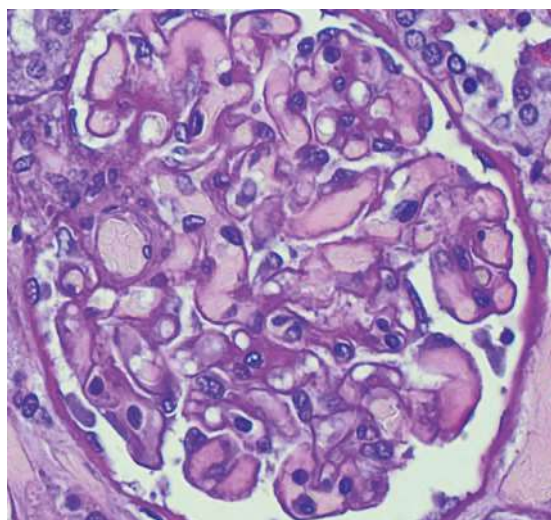
Entonces, el tratamiento con ácido periódico genera la oxidación de algunos grupos de los carbohidratos, los 1-2 glicoles a aldehídos. Por lo tanto, no es una reacción para demostración de todos los carbohidratos sino sólo de los que contienen 1-2 glicoles o en al-

gunos donde un hidroxilo es reemplazado por un grupo amino (fig 1). Los carbohidratos que se tiñen con esta reacción son: polisacáridos, mucopolisacáridos neutros y ácidos, glicoproteínas, glicolípidos, lipofuscinas presentes en gránulos de secreción, membranas basales, fibras reticulares del tejido conectivo, etc. Oxidación y generación de grupos aldehídos.



Generalmente se utiliza el ácido periódico, si bien es el más recomendado y efectivo, no es el único. También puede emplearse el ácido crómico utilizado para demostración de hongos y otros ácidos más pero que requieren determinados cuidados a la hora de su uso.

El reactivo de Schiff, se prepara con pararosanilina, el colorante es modificado con ácido sulfuroso (fig 2) (que se obtiene por la disolución de dióxido de azufre en agua o agregando metabisulfito de sodio o metabisulfito de potasio o sulfito de sodio). La modificación del cromóforo por su ruptura e incorporación del ácido sulfónico al carbono central.



Los grupos aldehídos en los tejidos se pueden demostrar por la oxidación con el ácido periódico, también por la transformación de la desoxirribosa del ADN (como en la reacción de Feulgen), o por acción del glutaraldehído.

El colorante empleado usualmente es la fucsina ácida (CI 42685), otros colorantes que pueden utilizarse son Azure A (CI 52005),

Cresyl violeta (CI 425555), Azul de metileno (CI 52015), entre otros.

Existen numerosos protocolos de preparación del colorante (ver más abajo). Específicamente el pararosanilina y la fucsina ácida contiene otras moléculas que deben extraerse con carbón activado, produciendo una solución colorante de color té con limón (una solución demasiado clara o transparente

podrá generar una reacción muy pálida).

La intensidad de la coloración depende de:

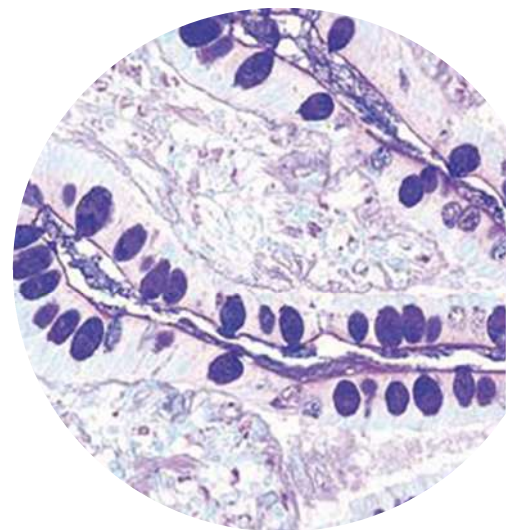
*La duración de la oxidación y la cantidad de aldehídos generados. (La mayoría de los protocolos los recomiendan que la oxidación con el ácido dure por lo menos 10min)

*El tiempo de exposición al reactivo de Schiff

*La calidad del reactivo de Schiff

Aumentar el tiempo de oxidación puede generar una coloración más intensa y dificultar el contraste con elementos que contienen menor cantidad de aldehídos. Con respecto al lavado tras la reacción puede realizarse tanto con

solución de sulfito (preparado con 90 ml de agua destilada, 5 ml metabisulfito de potasio al 10% y 5 ml de ácido clorhídrico 1N), como con agua corriente (aunque se pensaba que el cambio a un pH básico generaba falsos positivos, pero si el agua se renueva y los cortes no permanecen más que lo necesario, esto no ocurre.)



Colon, PAS/AB

PREPARACIÓN DEL REACTIVO DE SCHIFF

Según Alexander

Pararosanilina: 1 gr
Agua destilada: 200ml
Hidrosulfito de sodio: 1gr
Carbón activado: 1 gr

PREPARACIÓN

Llevar el agua a ebullición. Retire del fuego y agregue el colorante (tenga cuidado de la espuma). Filtrar mientras está caliente. Inmediatamente agregue el hidrosulfito y el carbón activado. Agitar bien y filtrar. Almacenar a 0-5 ° C en una botella bien tapada.

NOTAS

El hidrosulfito de sodio también se conoce como ditionito de sodio, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$.

Utilizar FUCSINA ÁCIDA en reemplazo de la pararosanilina

Según Lillie

Pararosanilina: 1 gr
Agua destilada: 100 ml
Metabisulfito de sodio: 2 grs
Ácido Clorhídrico 1N: 20ml
Carbón activado: 0,3 grs

PREPARACIÓN

Hervir el agua. Retirar del fuego y agregar el colorante (tener cuidado con la ebullición). Enfriar hasta 60°C y filtrar. Agregar el metabisulfito y el ácido clorhídrico. Mezclar bien. Colocar a 4°C hasta el día siguiente. Colocar el carbón activado. Mezclar bien y filtrar. Guardar en frasco color caramelo en heladera.

NOTAS

Lillie especificó bisulfito de sodio o potasio o metabisulfito. Según el Índice Merck, el bisulfito de sodio comercial se fabrica predominantemente de metabisulfito de sodio, y para la mayoría de los propósitos son intercambiables.

Según Tomasi

Pararosanilina: 1 gr
Agua destilada: 200 ml
Metabisulfito de Potasio: 1 gr
Ácido Clorhídrico 1N: 20ml
Carbón activado: 2 grs

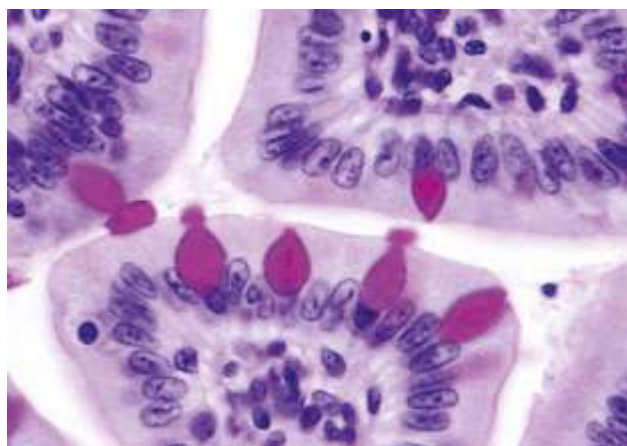
PREPARACIÓN

Caliente el agua destilada a ebullición en un Erlenmeyer. Retire del calor, e inmediatamente agregue el colorante. Agitar bien hasta que el tinte se disuelva. Enfriar a 50 ° C y luego agregar el ácido clorhídrico. Agitar bien para disolver. Enfriar a 25 ° C, y agregar el metabisulfito. Tapar bien y almacenar en la oscuridad durante uno o dos días. Si no se limpia con agua, agregue carbón activado y agite durante aproximadamente un minuto. Filtrar la solución. Almacenar a 0-5 ° C en una botella bien tapada.

REACCIÓN DEL ÁCIDO PERIÓDICO SCHIFF

PROTOCOLO:

- 1.Desparafinar e hidratar las secciones
- 2.Haga una digestión utilizando un procedimiento de diastasa, hialuronidasa o sialidasa.
- 3.Oxidar en ácido periódico 1% durante 10 minutos.
- 4.Enjuague breve en agua destilada.
- 5.Coloque en reactivo de Schiff durante 15 minutos.
- 6.Lavar en agua corriente durante 3
- 7.Contraste con uno de los siguientes:
A.Hematoxilina de Harris durante 1-2 minutos.
B.Solución de trabajo verde claro durante 10 segundos.
- 8.Deshidratar, aclarar y montar.



RESULTADOS

1-2-glicoles-----magenta
Núcleos-----azul violáceos
Fondo----- verde (si se usa verde claro)

NOTAS

- 1.El verde claro se usa mejor cuando se requiere la delineación de los hongos.
- 2.El agua corriente decolora el verde claro, así que proceda directamente a la deshidratación.

TIPS:

Conservar el reactivo en heladera, recipiente color caramelo. Pero debe llegar a temperatura ambiente antes de usar. El tiempo de la reacción con el reactivo de Schiff depende de la temperatura a la que se encuentre. El uso del microondas acorta notablemente el tiempo de tinción.

El reactivo de Schiff debe conservar un color amarillento o té con limón y hay que descartarlo si se vuelve de color rosad. Una manera de saber si aún es utilizable, es colocar una gota del reactivo en 1ml de formol, el cual se tornará fucsia intenso-rojizo; si esto no ocurre hay que descartar el reactivo.

ZIEHL NEELSEN

Es una tinción diferencial ideada por dos médicos alemanes, Franz Ziehl, un bacteriólogo, y Friedrich Neelsen, un patólogo. Su finalidad es la de identificar mycobacterias (fuertemente ácido-alcohol resistentes), nocardias (débilmente AAR), actinomicas (débilmente AAR) o parásitos como cryptosporidium.

Ante una sospecha de tuberculosis son necesarios procesos necesarios de cultivo y tinción. El *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol resistente, de extremos redondeados, que se tiñe de forma irregular. Su aspecto a veces es algo incurvado, tiene una longitud de 1 a 4 micrones, y un ancho de 0,3 a 0,6 micrones.

Dado que el *Mycobacterium tuberculosis* y otros organismos resistentes al ácido como el *Mycobacterium le-*

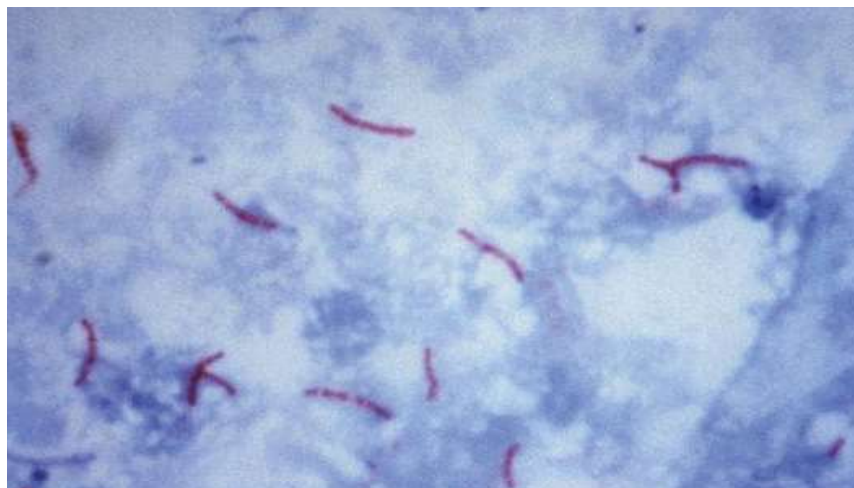
prae, no se colorean con la tinción de Gram, es necesario emplear uno de los diversos procedimientos para organismos ácidos resistentes. Las micobacterias se tiñen con el método de Ziehl Neelsen. Su ácido resistencia demostrable por esta tinción, se debe ante todo a los abundantes componentes lipídicos de su pared celular, formada principalmente por un tipo de ácidos grasos de cadenas muy largas denominados ácidos micólicos.

Las bacterias ácido-alcohol resistentes no pueden ser clasificados según la tinción de Gram, la técnica más común en la microbiología actual. Sin embargo, pueden ser teñidas con algunas tinciones combinadas con calor, como la de Ziehl-Neelsen. Una vez teñidas tienen la capacidad de resistir la decoloración

de una combinación de alcohol/ácido, el decolorante más común en los protocolos de tinción de bacterias.

En la práctica realizamos la tinción tradicional, aunque existen dos variantes más. Una de ellas es la denominada variante en frío o Tinción de Kinyoun. Y la otra es la variante histológica destinada a la búsqueda e identificación de microorganismos AAR en tejidos.

La propiedad de resistir la decoloración con ácidos fuertes, de las micobacterias, junto con su tamaño y forma característica, constituyen una ayuda valiosa para la detección temprana de infecciones y para el control del tratamiento de la enfermedad micobacteriana.



VARIANTE HISTOLÓGICA DE LA TÉCNICA:

REACTIVOS:

Ácido Peryódico 5%

Carbol fucsina de Ziehl (fucsina fenicada).

Preparar mezclando en el orden dado:

fucsina básica: 0,5 g

agua destilada: 50 ml

etanol absoluto: 5 ml

cristales de fenol: 28,5 g

Hematoxilina

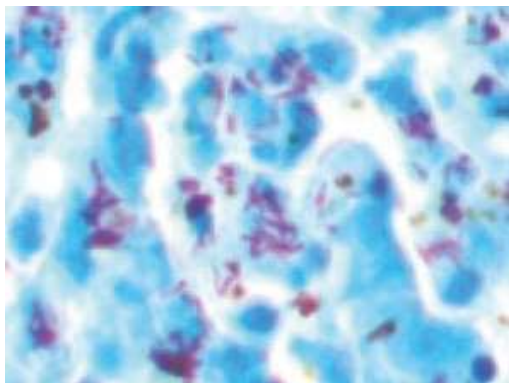
Alcohol ácido 1%:

alcohol de 35°

ácido clorhídrico.

PROCEDIMIENTO:

- 1.Desparafinar e hidratar los cortes
- 2.Tratar con ácido periódico 5%, 10 min
- 3.Lavar con agua destilada
- 4.Colorear con fucsina fenicada, 15 min
- 5.Decolorar en alcohol ácido al 50%
- 6.Lavar con agua destilada
- 7.Teñir con hematoxilina, 10 min
- 8.Virar (se puede realizar con una solución de carbonato de litio)
- 9.Deshidratar, aclarar y montar preparaciones



Algunos sugieren en lugar del alcohol ácido, la siguiente solución diferenciadora:

Agua destilada: 45 ml
Formol 40%: 5 ml
Ácido acético glacial: 5 ml

RESULTADOS

BAAR*-----rojo/amarillo

Núcleos-----azul semiamarillo.

REFERENCIAS

Theory and practice of Histotechnology. Sheehan, Dezna; Hrapchak, Barbara (1980).(Ed. The C.V. Mosby Company)

(*)*Mycobacterium*: fuertemente ácido-alcohol resistentes.

(*)*Nocardia* y *Actinomices*: débilmente ácido-alcohol resistentes.

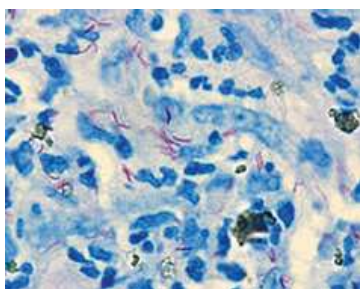
(*)Parásitos coccídeos (*Cryptosporidium*) de muestras [fecales].

(*)*Helicobacter pylori*

VARIANTE EN CALIENTE:

SOLUCIONES

Fucsina Carbol de Ziehl
1% de Alcohol ácido
0,1% Azul de metileno acuoso.



RESULTADOS:

BAAR -----rojo
Fondo-----azul

Notas

1. Tener cuidado con la temperatura que alcance el tejido al ser expuesto a una fuente de calor. Tomar todas las precauciones al trabajar con alcohol y un mechero, se recomienda seguir las normas de bioseguridad e higiene de su lugar de trabajo.
2. Algunos técnicos aumentan el contenido de ácido clorhídrico al 3%. Esto decolora más rápidamente.

PROCEDIMIENTO:

1. Desparafinar e hidratar.
2. Coloque las secciones sobre una gradilla. Cubra las secciones con la solución de carbol-fucsina (algunos sugieren cubrir las secciones con papel de filtro empapado en la solución colorante y sobre este agregar más colorante). Este paso debe realizarse cuidadosamente, ya que implica que se exponga al calor el portaobjetos, hasta lograr que la solución colorante comience a humear, pero sin hervir (normalmente se realiza exponiendo a la llama directa de un mechero). Se retira de la fuente de calor, y al cabo de un minuto se repite la acción, por lo menos durante 5 min. Mientras tanto se debe ir agregando colorante para que las secciones nunca queden secas (algunos sugieren

calentar el colorante en un tubo de ensayo y luego colocarlo sobre las secciones). Dicho proceso debe repetirse dos veces.

3. Esperar a que llegue a temperatura ambiente y lavar con agua destilada (quitar el papel de filtro si se empleó).

4. Limpiar la cara inferior del portaobjetos y alrededor de cada sección para eliminar los depósitos de carbol-fucsina con etanol.

5. Colocar alcohol ácido sobre cada sección para decolorar, durante 10-20 min, el fondo debe observarse un color rosa pálido.

6. Lavar varias veces con agua destilada.

7. Colorear en solución de azul de metileno 10-15 segundos.

8. Lavar con agua destilada hasta azul pálido.

9. Deshidratar, aclarar y montar.

REFERENCIA

Formulario y guía del microtomista. Gray, Peter. (1954) (Ed. The Blakiston Co. y Robert E. Krieger Publishing Co.)

Cellular Pathology Technique Culling. Alison, RT y Barr, WT (1985), 4ª ed. Butterworths, Londres, Reino Unido.

Técnica histológica de Carleton Drury, RAB y Wallington, EA, (1980) Oxford University Press, Oxford, Reino Unido.

Vaccimonitor v.19 n.2 Ciudad de la Habana Mayo-ago. 2010. (versión impresa

ISSN 1025-028X versión On-line ISSN 1025-0298)

ROJO CONGO

El rojo Congo se usa para teñir amiloide. Se cree que se une por puentes de hidrógeno a la estructura del amiloide. Esto forma un "pseudo-cristal", que da como resultado una birrefringencia verde al ser observado.

SOLUCIONES

Rojo Congo: 1gr.

Agua destilada: 100ml.

PROCEDIMIENTO:

1-Desparafinar e hidratar hasta agua destilada.

2-Colorear con Rojo Congo 1 hora.

3-Lavar con agua destilada, 2 ó 3 lavados.

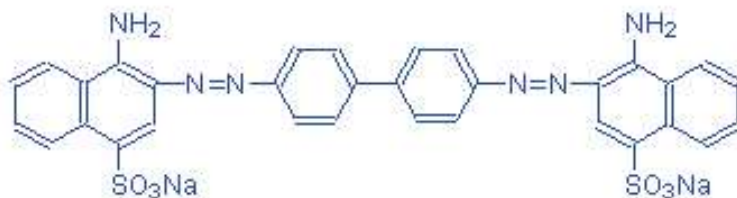
Diferenciar con alcohol alcalino (con OHNa 1%) de 3 a 5 segundos, agitando hasta que desaparece el precipitado.

5-Lavar en agua corriente, 5 min.

6 Contrastar con hematoxilina.

7-Virar con agua corriente.

8-Deshidratar, aclarar y montar.



Otros nombres: Rojo Directo o Rojo algodón.

Cl: 22120

cuya fórmula es: $C_{32}H_{22}N_6O_6S_2Na_2$

RESULTADOS

Amiloide: rosa a rojo

Núcleo: azul

Nota:

La birrefringencia verde se observa bajo polarizadores



Corteza cerebral. Tinción para amiloide mediante Rojo Congo en solución alcohólica

Jorge Tolivia Fernández, Ana Navarro Incio

Dpto. Morfología y Biología Celular Universidad de Oviedo ESPAÑA

7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica 2005

MÉTODO DE STOKES

SOLUCIONES

Hematoxilina

Rojo Congo

Etanol 80%: 100ml

Hidróxido de K: 0,2g

Rojo congo, cantidad necesaria.

Disolver el hidróxido de potasio en el etanol. Añadir Rojo Congo para saturar. Dejar toda la noche y filtrar. Estable durante unos 3 meses.

PROCEDIMIENTO

1.Desparafinar e hidratar hasta alcohol.

2.Colorear con solución de Rojo Congo por 25 min.

3.Lavar con agua corriente por 5 min.

4.Colorear con hematoxilina.

5.Virar en agua corriente, 10 min.

6.Deshidratar, aclarar y montar.

RESULTADOS

Amiloide:-----naranja a rojo

Núcleo:-----azul

RETICULINA

SOLUCIONES:

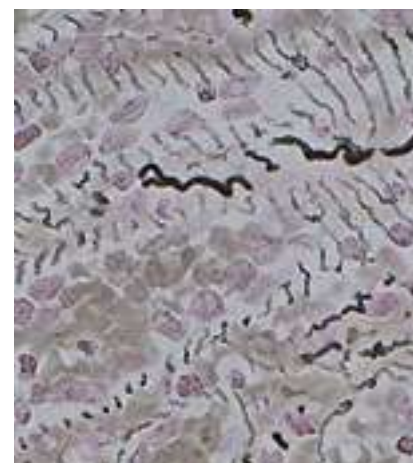
Nitrato de plata, 10%: 10ml
Hidróxido de amonio: 2,5ml.
Hidróxido de potasio, 10%
Permanganato de potasio, 1%
Ácido oxálico, 1%
Alumbre de hierro, 2.5%
Formol, 10%
Cloruro de oro amarillo, 0.1%
Tiosulfato de sodio, 5%
Rojo neutro, 1%

PLATA AMONIAL

Colocar la solución de nitrato de plata al 10% y añadir el hidróxido de potasio al 10%. Permitir que el precipitado se asiente y luego retirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur. Lavar el precipitado dos veces con agua destilada, permitir que el precipitado se asiente y drenar después de cada uno. Añadir 10 ml de agua destilada. Mientras se mezcla, agregar lentamente gotas de hidróxido de amonio fuerte hasta que el precipitado se vuelva a disolver. Agregar lentamente una gota o más de nitrato de plata al 10% hasta que la solución se vuelva muy opalescente. Completar hasta 20 ml con agua destilada.

PROCEDIMIENTO:

- 1.Desparafinar e hidratar.
- 2.Oxidar con 1% de permanganato de potasio durante 2 minutos.
- 3.Blanquear con ácido oxálico durante 2 minutos.
- 4.Enjuagar con agua corriente.
- 5.Sensibilizar con la solución de alumbre de hierro al 2,5%, 1 min.
- 6.Enjuagar con agua corriente.
- 7.Enjuagar con agua destilada.
- 8.Tratar con plata amoniacal durante 1 a 3 minutos.
- 9.Lavar, rápido con agua destilada.
- 10.Reducir con formol al 10% durante 3 minutos.
- 11.Enjuagar con agua corriente.
- 12.Enjuagar con agua destilada.
- 13.Tonalizar con solución de cloruro de oro al 0.2%.
- 14.Enjuagar con agua destilada.
- 15.Fijar en tiosulfato de sodio al 5% durante 5 minutos.
- 16.Lavar con agua corriente.
- 17.Contrastar con rojo neutro, 1 min.
- 18.Enjuagar con agua corriente.
- 19.Deshidratar, aclarar y montar.



Bazo normal

RESULTADOS

Fibras de reticulina ----- negro
Nucleos -----rojo
Fondo-----gris

REFERENCIAS

Carleton's histological technique. Drury, R A, and Wallington, E A, (1967).Ed. 5.Oxford University Press, London.

Cellular pathology technique. Culling, C F A, Allison, R T, Barr, W T, (1985).Ed. 4.Butterworths, London.

NOTAS

Importante, la calidad del hidróxido de amonio como el hidróxido de potasio. Mantener ambos bien tapados cuando no estén en uso. Para el hidróxido de amonio, se prepara una solución 10x como solución madre, y la solución de trabajo no se re utiliza.

Después de preparar la solución de plata amoniacal, la solución debe tener un ligero olor

a amoníaco. Si el olor a amoníaco es fuerte, indica que se ha agregado demasiado hidróxido de amonio y debe prepararse nuevamente. Drury y Wallington sostienen que el paso de blanqueamiento se puede realizar con metabisulfito de potasio acuoso al 3% en lugar de ácido oxálico en el paso 3 durante 1 min. También realizan el tratamiento con bisulfito de potasio acuoso al 3% durante un minuto seguido de un enjuague con agua destilada,

inmediatamente después de la tonificación (paso 13).

El alumbre de hierro es sulfato de amonio férrico.

La tonificación es un paso optativo, sino se hace las fibras de reticulina se observarán de color marrón oscuro sobre un fondo marrón más pálido. Dependiendo del tiempo será el contraste entre fibras reticulares y el fondo según lo que cada uno prefiera.

IMPREGNACIÓN DE GOMORI PARA RETICULINA

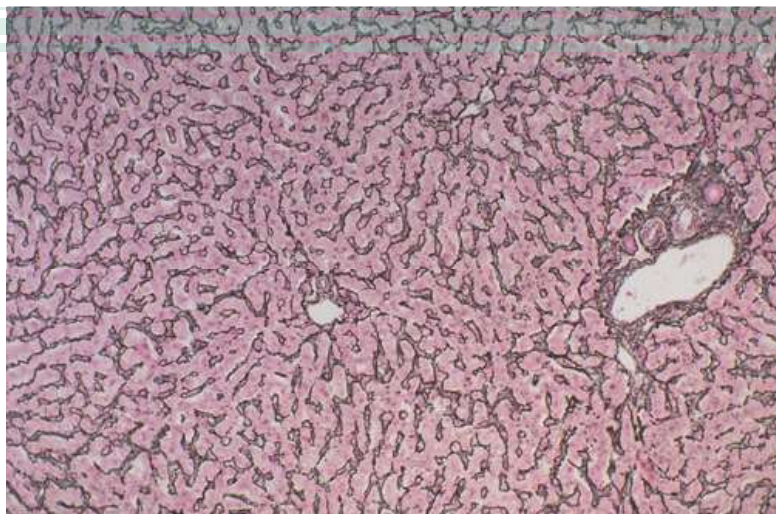
SOLUCIONES

Nitrato de plata, 2%: 10 ml
Nitrato de plata, 20%:
Hidróxido de amonio
Hidróxido de sodio, 40%: 0,2 ml
Ácido periódico, 0.5%.
Formol, 3%.
Cloruro de oro amarillo, 0.5%.
Tiosulfato de sodio, 5%.
Rojo neutro, 1%.

Plata amoniacal de Da Fano
Coloque nitrato de plata al 20%. Añadir el hidróxido de sodio al 40%. Mientras agita, agregue lentamente gotas de hidróxido de amonio hasta que el precipitado se vuelva a disolver. Completar hasta 80 ml con agua destilada.

Notas

El uso de ácido periódico seguido de una solución de plata fácilmente reducible es obviamente similar al método de Jones para las membranas basales y los carbohidratos. Sin embargo, tenga en cuenta que el método de Gridley aplica una solución de plata amoniacal a temperatura ambiente después de la sensibilización en nitrato de plata acuoso a temperatura ambiente, luego aplica formol como agente reductor, es decir, es una reacción argirófila mientras que el método de Jones aplica una solución de plata metanamina a 56 ° C durante más tiempo, sin sensibilización, y no utiliza un reductor externo, es decir, es una reacción inducida de argentafina. Claramente, en el método de Gridley, el ácido periódico se usa para el mismo propósito que el permanganato de potasio del blanqueador Mallory en otros métodos.



<https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsreticulin.html>

PROCEDIMIENTO:

- 1-Desparafinar e hidratar.
- 2-Oxidar con 0,5% de ácido periódico, 15 min.
- 3-Enjuagar con agua destilada.
- 4-Impregnar con nitrato de plata al 2%, 30 min.
- 5-Lavar con agua destilada.
- 6-Tratar con plata amoniacal de da Fano, 15 min.
- 7-Enjuagar con agua destilada.
- 8-Reducir en formol al 3% durante 3 minutos.
- 9-Lavar con agua corriente.
- 10-Enjuagar con agua destilada.
- 11-Tratar con la solución de cloruro de oro al 0,5%, 5 minutos.
- 12-Lavar con agua destilada.
- 13-Fijar en tiosulfato de sodio al 5%, 5 min.
- 14-Lavar con agua corriente.
- 15-Contrastar con rojo neutro durante 1 minuto.
- 16-Lavar con agua corriente.
- 17-Deshidratar, aclarar y montar.

RESULTADOS

Fibras de reticulina -----negro
Nucleos -----rojo
Fondo -----gris

REFERENCIA

El Formulario y Guía del Microtomista. Gray, Peter. (1954) Ed. The Blakiston Co. y Robert E. Krieger Publishing Co.

LINKS DE INTERÉS

<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos>

<https://webpath.med.utah.edu/>

<https://www.leicabiosystems.com/>

<https://www.nottingham.ac.uk/pathology/default.html>

<http://www.dbbe.fcen.uba.ar/objetos/histologia-animal-comparada-tecnicas-basicas-para-microscopia-optica-y-electronica-P181.html>

<https://www.pathologyoutlines.com/topic/stainsreticulin.html>

<https://www.uaz.edu.mx/histo/Webpatutah/histhtml/stains/stain015.htm>

http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/alcian_blue_pas_ellis.htm