

CAPILLA ALFONSINA

# TECNICAS HISTOLOGICAS Y HEMATOLOGICAS

Fco. Javier. Alvarez Mendoza y Elsa Ma. Tamez Cantú  
Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

## IMPORTANCIA

La Histología e Histopatología en peces es un campo no investigado suficientemente. Las diversas alteraciones histológicas que pueden observarse en los peces on resultado de muy distintas situaciones (edad, stress, infecciones, parásitos, sustancias tóxicas como manifestaciones carenciales, etc.).

Por otro lado el examen hematológico es otra herramienta que permite identificar diversas enfermedades de peces en base a distintos resultados cualitativos y cuantitativos. Este examen, junto con la histopatología y exploración física del caso individual correspondiente posee un valor decisivo a la hora de emitir un diagnóstico.

## Técnicas Selectas de Hematología en Peces

Para el estudio del tejido sanguíneo en Peces se han adecuado técnicas del laboratorio usadas originalmente en el humano y/o a nivel veterinario, por lo tanto, los resultados se deben interpretar a la luz del criterio metodológico empleado.

La interpretación correcta de los resultados de las técnicas hematológicas aplicadas en peces se hacen tomando en cuenta múltiples factores por ejemplo stress, alimentación calidad de agua, etc. (según el enfoque particular de cada trabajo).

Uno de los problemas con que nos encontramos, es la obtención de la muestra (tejido sanguíneo) y para este propósito se han aplicado varios métodos dentro de los cuales destacaremos los siguientes:

- a) Punción cardíaca
- b) Punción de arteria dorsal
- c) Punción de arteria caudal en el pedúnculo caudal
- d) Sección del pedúnculo caudal

En las tres primeras, se puede obtener la muestra sin matar el espécimen. Además con la ayuda de anestésicos se puede facilitar hacer la punción disminuyendo así alteraciones en nuestros resultados causados por el stress.

Las técnicas que en forma rutinaria se pueden llevar a cabo con una muestra pequeña (3 ml. de sangre) son las siguientes:

- a) Determinación de Hemoglobina en mg por 100 ml. de sangre
- b) Paquete porcentual de glóbulos rojos (microhematocrito)
- c) Recuento diferencial de glóbulos blancos
- d) Recuento por dilución de glóbulos rojos
- e) Recuento por dilución de glóbulos blancos

- f) Proteína total del plasma
- g) Electroforesis

Los resultados obtenidos son herramienta para el diagnóstico, prevención, tratamiento y evolución de algunas enfermedades, envenenamiento, contaminación, mal nutrición y por otro lado podrían dar la pauta para la selección genética de reproductores en programas acuaculturales.

#### Parámetros Hematológicos en Trucha Arco Iris

Parámetros	Rango	Promedios
Eritrocitos/mm <sup>3</sup> (10 <sup>6</sup> )	1.19-1.32	1.253
Hematocrito (%)	30.8-33.7	32.25
Hemoglobuna (gr/100ml)	7.6-8.2	7.9

Houston y Smeda (1979)

#### Parámetros Hematológicos en Trucha Café

Parámetros	Rango	Promedio
Hemoglobina (gr/100ml)	4.1-10.3	6.83
Eritrocitos/mm <sup>3</sup> (10 <sup>6</sup> )	0.606-1.320	0.160
Hematocrito (%)	20-43	32
Leucocitos/mm <sup>3</sup>	2000-63000	11563
Linfocitos %	56-100	90
Neutrofilos %	0-25	6.6
Metamielocito %	0-11	1.4
Mielocito %	0-8	1.6
Blastos %	0-4	0.3

Blaxhall y Daisley (1973)

#### REFERENCIAS

- Barham, W.T.; Smith, G.L., & Schoonbee (1979). The Effect of Heparin Concentration on Certain Blood Parameters of the Rainbow Trout *Salmo gairdneri* R. Comp. Biochem. Physiol., Vol. 63C. pp 369-371.
- Blaxhall, P.C. & Daisley, K.W. (1973). Routine haematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol. (1973)5, 771-781.
- Houston, A.H. & Smeda, J. S. (1979) Thermoacclimatory Changes in the ionic microenvironment of haemoglobin in the stenothermal rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and eurythermal carp (*Ciprinus carpio*). Journal experimental biological (1978)8, 317-340.
- Kawatsu H. (1974). Studies on the anemia of fish-VI. Further note on the anemia caused by starvation in Rainbow trout. Bulletin of freshwater Fisheries Research Laboratory Vol. 24 No. 2 (1974)
- Reinchenbach -Linke H.(1977). Trabajos sobre Histopatología de los Peces. Editorial ACRIBIA España. pp. 25-36.
- Lone K.P., Ince B.W., Matty, A.J. (1981). Changes in blood chemistry of rainbow trout *Salmo gairdneri* Rich in relation to dietary protein level and an anabolic steroid hormone, ethylestrenol. Journal fish biological (1982) 20, 597-606.

CAPILLA ALFONCINA

## LA TECNICA HISTOLOGICA

La fijación es un proceso que provoca la muerte de las células, de tal manera, que conservan lo mejor posible las características químicas y morfológicas presentes durante la vida. Es una técnica que permite analizar las características de las células y los tejidos después de la muerte.

Los fijadores son sustancias de composición variable, orgánicas o inorgánicas y que pueden ser simples o formados por la mezcla de varias sustancias (compuestos)

Al sumergir un trozo de tejido en el fijador, todas las células no mueren instantáneamente al mismo tiempo, por lo que pueden producirse alteraciones a la falta de oxígeno, cambios de pH., etc. Como el fijador penetra por difusión, las células periféricas se fijan mejor y más rápidamente que las del centro.

Para que una sustancia sea un buen fijador debe presentar las siguientes características:

- 1.- Gran poder de penetración
- 2.- Que actúe rápidamente precipitando (coagular) el coloide celular, sin causar alteraciones morfológicas.
- 3.- Deben presentar un pH generalmente ácido, ya que los fijadores alcalinos provocan alteraciones.
- 4.- No deben entorpecer los métodos de inclusión, microtomía y coloración.

En resumen los fijadores se pueden clasificar de la siguiente manera:

Físicos	Calor
	Frío
Químicos	Simple (cuya fórmula es una solución fijadora)
	Compuestos (cuya fórmula presenta varias soluciones fijadoras)

Los fijadores pueden ser a base de alcohol, formol, sales de cromo, bicloruro de mercurio y otros.

Es muy importante saber elegir el fijador, según el tejido que se vá a trabajar, ya sea vegetal o animal, histológico o citológico, si el resultado lo queremos específico sobre determinadas estructuras celulares, o bien si la observación es con el microscopio compuesto o con el electrónico.

Si queremos lograr una fijación buena, debemos tomar en cuenta lo siguiente:

- 1.- Las piezas no deben pasar de un cm cúbico, aún cuando se utilicen fijadores de gran poder de penetración.
- 2.- Las piezas deben estar bañadas en un volumen de fijador que sea 50 veces más que el volumen de la pieza.

3.- Las piezas deben permanecer en el fijador el tiempo adecuado, que puede variar de unos minutos a varios días.

4.- La fijación debe ser a la temperatura ambiente, sin embargo en algunos métodos especiales se requiere temperaturas adecuadas, que se indicarán en su oportunidad.

5.- Cuando se termine el tiempo de la fijación, se debe quitar el exceso del líquido fijador, dando un lavado prolongado en agua.

6.- Si se mantiene el material histológico por más tiempo del indicado, se debe conservar mejor en una solución de formol al 1% al 4%.

7.- El fijador debe estar en frascos perfectamente bien cerrados para que el fijador no se volatilice.

8.- Los tejidos que floten como la vejiga natatoria y el adiposo, hay que cubrirles con una capa de algodón o gasa, de tal manera que toda la superficie de la pieza esté bien saturada con el fijador.

## FIJADORES MAS USUALES

### Formol al 40%

Formol	10 c.c.
Agua destilada	90 c.c.

### Líquido de carney

Alcohol absoluto	60 c.c.
Cloroformo	30 c.c.
Ac. Acético	10 c.c.

### Líquido de Bouin

Sol. saturada de ac. pícrico	75 c.c.
Formol Q.P.	20 c.c.
Ac. Acético glacial	5 c.c.

(El ácido acético se recomienda agregarlo antes de usar el fijador)

## PROPIEDADES DE LOS PRINCIPALES AGENTES FIJADORES

Alcohol etílico.- (del 70 al 100%). Es un agente reductor, por lo que no es compatible con el bicromato de potasio ni con el tetraóxido de osmio. Precipita energicamente las proteínas, pero no las nucleoproteínas, disuelve determinados lípidos complejos y precipita el glucógeno sin fijarlo. Provoca contracción y endurece.

Formol.- (concentración del 4 al 10%). Es reductor, por lo que tiene las mismas incompatibilidades que el alcohol. Fija los lípidos complejos, por lo que conserva las mitocondrias y el complejo de Golgi. No contrae las estructuras pero si las endurece.

Acido acético.- (concentración del 0.3 al 5%). No fija las proteínas citoplasmáticas, pero precipita las del núcleo. Es buen fijador de los cromosomas. Destruye el condrioma. Provoca hinchamiento de los tejidos y no los endurece.

## INCLUSION DE LA PIEZA

Las piezas fijadas antes de proceder a cortarlas deben ser incluidas en medio plástico (parafina), debe ser lo más neutro posible en la inclusión, no se trata de un simple englobamiento, sino que debe haber una verdadera impregnación a nivel celular.

En la técnica de inclusión, la pieza debe someterse a una serie de tratamientos sucesivos, cada uno de los cuales está destinado a preparar la penetración del siguiente y en eliminar el anterior. Cada disolvente debe ser "miscible" con el que le ha precedido y con el que le sigue.

Cada medio de inclusión o de impregnación debe sustituir totalmente al medio que le ha precedido. Si la inclusión se hace en un medio no hidrosoluble, el material debe estar totalmente deshidratado, por lo que se someterá a sucesivos baños de alcohol de creciente concentración hasta que desaparezca el menor vestigio de agua. La graduación exacta de los alcoholes es de poca importancia a excepción del alcohol absoluto, así como la permanencia del material en cada uno de los baños, ya que depende de numerosos factores como tipo de pieza, grado de hidratación, etc.

La impregnación se efectúa en forma de baños que se hacen en recipientes adecuados. Se dan dos baños por cada solución impregnadora, cambiando la pieza de recipiente o sustituyendo el líquido usado por uno nuevo.

La deshidratación de las piezas de histología se realiza en forma brusca y rápida, pero cuando las piezas son delicadas debido a que tienen un gran porcentaje de agua se deben procesar comenzando por alcoholes de concentración baja y avanzando en forma lenta, de tal manera que se alteren los menos posible las estructuras histológicas.

Después de la deshidratación se procede a la aclaración de la pieza donde se emplean sustancias que sean "miscibles" con el medio de inclusión. Como sustancias aclarantes se pueden mencionar el tolueno, el benceno y el xilol, esta última sustancia es la más empleada en el laboratorio de histología.

La inclusión propiamente dicha es un proceso mediante el cual la pieza se incluye dentro de una sustancia que da una consistencia adecuada lo que permite obtener cortes finos y que pueden ser de un espesor determinado.

Existen varios medios de inclusión que se pueden usar según las necesidades, el más usual es el de parafina de cuyas piezas procesadas por este método se pueden obtener cortes finos y colorearlos con métodos específicos.

## INCLUSION DE PARAFINA

En este método debemos emplear parafinas cuyo punto de fusión va a depender de la dureza de la pieza que se va a incluir. Cuanto mayor sea la dureza del tejido, mayor sera el punto de fusión de la parafina. La parafina más usual es la de 56-58°C, que se usa para piezas de histología normal, para piezas más duras o más delicadas se requiere un punto de fusión mayor o menor respectivamente.

Para la infiltración de una pieza en parafina se debe proceder de la manera siguiente:

1.- Fijación de la pieza (formol, Bouin, otros)  
24 horas o el tiempo indicado según método.

2.- Deshidratación

Alcohol 80 I	1.30 hrs.
Alcohol 80 II	1.30 hrs.
Alcohol 96 I	1.30 hrs.
Alcohol 96 II	2 hrs.
Alcohol absoluto I	1.30 hrs.
Alcohol absoluto II	2 hrs.
Xilol I	1.30 hrs.
Xilol II	2 hrs.
Parafina I	1.30 hrs.
Parafina II	1.30 hrs.
Parafina III	2 hrs.
Inclusión de pieza	2 hrs.

Existen aparatos que permite hacer la inclusión de las piezas automaticamente y en forma rápida (Histokinette).