

ANEXOS.

MÉTODOS HISTOLÓGICOS:

1. Decalcificación.

Para obtener cortes del tejido mineralizado lo suficientemente finos para que fuese posible la observación de su estructura al microscopio, hay que decalcificar previamente el tejido. Las sustancias decalcificantes suelen ser irritantes, pudiendo causar quemaduras. Los decalcificantes rápidos se clasifican como preparaciones peligrosas porque contienen ácido fórmico y ácido clorhídrico.

2. Tinción de Grocott

Es un método de tinción argéntica que revela la presencia de hongos, cuya pared con polisacáridos sufre procesos de oxidación con el sustrato proporcionando una tinción negra sobre un fondo azul-verdoso por el depósito de plata en las zonas anteriormente alteradas.

Soluciones:

A. Solución stock de:

1. Solución 1: tetraborato sódico en agua destilada al 5%.

2. Solución 2: Nitrato de plata en agua destilada al 5%..... 5ml

Metinamina (hexamina) en agua destilada al 3% 100 ml

Conservar ambas diluciones a 4°C.

Desarrollo del método:

1.- Desparafinar e hidratar de forma normal.

2.- Oxidar en ácido crónico al 5% durante una hora (ácido pentódico)

3.- Lavar en agua 10 minutos

4.- Bisulfito sódico al 1% 1 minuto

5.- Lavar en agua corriente 5 min

6.- Someter a varios baños de agua destilada. Por los dos lados para que no precipite la plata en etapas posteriores.

7.- Introducir en la solución de plata una hora a 60°C. Con esta temperatura tan elevada tenemos la posibilidad de perder fragmentos del corte ya que el hueso es un tejido difícil de tallar

8.- Lavar agua destilada tres baños 2 min

9.- Repetir el baño poco tiempo.

10.- Tratar las secciones en clorhídrico al 0'1% 4 minutos. Para "revelar" la plata.

11.- Introducir las secciones en tiosulfato sódico a 2% 2 minutos.

12.- Lavado en agua destilada

13.- Contrastar con la solución de Hematoxilina y eosina pero a la mitad del tiempo que se suele usar habitualmente. Siete minutos con hematoxilina y 7 segundos con eosina

14.- Lavado en agua ()

15.- Deshidratar: con alcoholes de diferente concentración (Dos al 96%, luego pasamos por otros dos al 100% y finalmente pasamos por xiloles, el segundo es el que está más limpio de tinciones)

Montar: Colocar DPX sobre el cubre y colocar dejándolo caer suavemente el porta con la muestra ya deshidratada. Antes quitamos el sobrante que queda por el porta de las tinciones de plata para que quede más vistoso.

3. Tinción de Masson:

Es una tinción tricrómica específica para visualizar las fibras de colágeno que dan resistencia en el tejido. Se denomina tricrómica porque se emplean tres colorantes que permiten diferenciar estructuras como el núcleo de las células, el citoplasma y las fibras colágenas.

4. Tinción de PAS:

Ácido periódico Schiff. Esta tinción permite visualizar el glucógeno, las mucosustancias y los carbohidratos. Los hongos como la *Candida* se tiñen con el PAS con una coloración magenta.

Tiñe los núcleos de color azulado, el glucógeno de púrpura y aquellas sustancias PAS positivas, como los polisacáridos simples, las glucoproteínas y glucolípidos, de color rosáceo.

5. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica o IHQ es un proceso que nos permite ver la presencia de un antígeno característico en las células de un corte de tejido. Se basa en la reacción específica entre el antígeno y el anticuerpo. Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glucoproteínas producidas por las células específicas del sistema inmunitario en respuesta a una proteína extraña o antígeno. En el laboratorio, los antígenos pueden purificarse de la sangre y conjugarse con un colorante fluorescente (el más empleado es la fluoresceína que absorbe la luz ultravioleta y emite coloración verde). Los anticuerpos conjugados con fluoresceína se pueden aplicar a cortes de tejidos congelados o fijados en un porta para localizar un antígeno en células y tejidos. La reacción entre anticuerpo y antígeno donde el anticuerpo se conjuga con una enzima que

cataliza una reacción cuyo producto es coloreado o genera fluorescencia visible al microscopio (IHQ directa) o según el método indirecto, donde la unión de antígeno-anticuerpo sufre posteriormente una sucesiva reacción con el marcador para identificar donde se han localizado los complejos antígenos-anticuerpos en la muestra.

Los anticuerpos monoclonales los genera un único clon celular, es decir, un solo plasmocito, mientras que los anticuerpos policlonales se producen por diferentes plasmocitos. Por tanto, estos últimos tienen más capacidad de producir reacción ante varios fragmentos del antígeno.