

***TEMA 14 HISTOQUÍMICA**

1. HISTOQUÍMICA DE LOS HIDRATOS DE CARBONO

• INTRODUCCIÓN

La **histoquímica** es la aplicación de reacciones químicas y bioquímicas en la técnica histológica, con el fin de localizar y determinar de manera científica ciertas sustancias o su actividad.

En todas estas reacciones o bien se tiñe la sustancia que buscamos o los colorantes reaccionan químicamente con ella, como es el caso del PAS.

Los hidratos de carbono o glúcidos son polialcoholes oxidados (polihidroxicetonas o polialdehidos). Los polisacáridos son glúcidos formados por la unión de muchas moléculas de monosacáridos (mas de 10). Entre los polisacáridos además de los polisacáridos simples como el glucógeno destacan los polisacáridos complejos.

Los polisacáridos complejos se dividen en 3 grandes grupos:

- Mucopolisacaridos que pueden dividirse en :
 - Mucopolisacaridos neutros
 - Mucopolisacaridos ácidos
 - Mucoproteínas
 - Mucolípidos.
- **REACCIONES HISTOQUÍMICAS BASADAS EN LA DEMOSTRACIÓN DE GRUPOS CARBONILO FORMADOS SOBRE LOS HIDRATOS DE CARBONO POR OXIDACIÓN PREVIA.**

TÉCNICA DEL PAS (Ácido Periódico Schiff)

Consiste en oxidar los tejidos mediante el ácido periódico (HIO₄) para incrementar el número de grupos carbonilo (aldehído o cetona) presentes en ellos, de forma que puedan ser demostrados posteriormente mediante reactivo de Schiff.

Los hidratos de carbono contienen grupos carbonilos relativamente aislados, en una proporción aproximada de uno por molécula de monosacárido. Precisamente por ello es necesario oxidarlos con el fin de incrementar dichos grupos, que solo pueden ser detectados por el reactivo de Schiff si se encuentran situados en carbonos contiguos y delimitados por grupos alcohólicos o amino.

Para los grupos aldehidos que aparecen en posición 1,2 glicol estas condiciones se cumplen exclusivamente tras la oxidación de los correspondientes radicales hidroxilo.

• Procedimiento Técnico:

Fijación:

- ◆ Formol al 4 % o Líquido de Carnoy o Bouin.
- ◆ Ácido Periódico 0.5 % p/v.
- ◆ Reactivo de Schiff:

◇ Fucsina básica (CI: 42510) 1g.

◇ Agua destilada... 200 ml.

Disolver la fucsina en 200 ml de agua (d) hirviendo.

Dejar enfriar hasta aproximadamente 50° C. y filtrar

Posteriormente agregar 20 ml de HCl 1N. Después enfriar hasta 25° C y añadir 1g de Bisulfito sódico o Metabisulfito potásico (sódico).

Mantener en la oscuridad. El líquido tarda unos 2 días o a veces 24h en tornarse de color amarillo que indica que está listo para su uso.

Añadir 2g de carbón activado, mezclar y filtrar hasta que desaparezca el color.

La solución debe conservarse en el refrigerado protegido de la luz.

- ◆ Baño de Ácido Sulfuroso o Agua sulfurosa:
- ◆ Ácido Clorhídrico (HCl) 1N 5 ml.
- ◆ Metabisulfito sódico 10 %... 6 ml.
- ◆ Agua (d)... 100 ml.
- ◆ Colorante de contraste: Hematoxilina, Orange G o Van Gieson.

Técnica de Tinción:

- Desparafinar e hidratar (xilol y decrecientes alcoholes)
- Ácido periódico 0.5 % 5 min.
- Lavar en agua (d).
- Reactivo de Schiff.. 15– 30 min.
- Aclarar en 3 baños de agua sulfurosa 2 min. Cada uno.
- Lavar en agua corriente
- Colorante de contraste
- Lavar con agua corriente.
- Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

Material PAS +: rojo oscuro a magenta.

B. Compuestos PAS +

- polisacáridos simples: como el glucógeno y la celulosa.
- Mucopolisacaridos neutros: se encuentran en el epitelio gástrico, en glándulas del duodeno y en cápsulas bacterianas, también en intestino y estómago.
- mucoproteínas como son algunas mucinas del tubo digestivo y del árbol respiratorio o bronquial, también la tiroglobulina que está en el tiroides y la hormona estimulante.
- Glucoproteínas del suero
- Glucolípidos: como los gangliósidos y cerebrosídeos.

C. Compuestos PAS –

Los mucopolisacaridos ácidos no pueden ser oxidados por el ácido periódico y por eso son PAS – (ya que no aparecen los grupos carbonilos)

D. Controles de la técnica del PAS.

Es imprescindible realizar preparaciones testigo o de control que confirmen los resultados obtenidos, para ello suelen ser muy útiles las técnicas de bloqueo tales como las de bloqueo de grupos aldehídos en general y las de acetilación de grupos aldehídos situados en posición 1,2 glicol.

Técnica de bloqueo para aldehídos en general

Se realiza tratando los grupos aldehído presentes en el tejido, tras la oxidación con ácido periódico con una solución de ácido acético saturado con Dimedona, entre 1–16 h. a 60 ° C.

Posteriormente se lava con agua destilada y se continúa con PAS normal.

Únicamente se teñirá el material PAS + formado a expensas de grupos aldehídos situados en posición 1,2 glicol (los que proceden de glúcidos).

Técnica de bloqueo mediante acetilación para grupos 1,2 glicol.

Se basa en la negatividad de la reacción del PAS después de la acetilación de los grupos 1,2 glicol presentes en los hidratos de carbono.

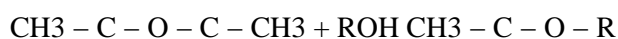
Este proceso es total o parcialmente reversible por saponificación posterior mediante tratamiento con hidróxido potásico. Si no se ha realizado el bloqueo de los aldehídos preexistentes debe realizarse un control sin oxidar el tejido; todo lo coloreado en esta preparación no serán grupos 1,2 glicol oxidados, sino grupos aldehídos que ya estaban presentes antes de la oxidación.

Después se realiza el PAS oxidando y se compara los resultados de ambas preparaciones.

El 2º problema en la técnica del PAS se plantea cuando se trata de diferenciar si los grupos aldehídos aparecidos tras la oxidación lo han hecho sobre grupos alcohólicos situados en posición 1,2 glicol o si los oxidados han sido grupos hidroxiaminos primarios o hidroxiaminos secundarios, compuestos no presentes habitualmente en los hidratos de carbono que son PAS +.

Esta distinción puede realizarse mediante acetilación reversible y saponificación.

Acetilar consiste en introducir un grupo acetilo en un compuesto orgánico. El anhídrido acético es un reactivo que tiene gran aplicación para acetilar, de forma que con este reactivo se bloquean todos los grupos alcohólicos en general existentes en el tejido.

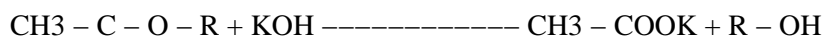


O O O

Este tipo de unión se llama **éster**.

Saponificar es romper un enlace tipo ester de forma que en condiciones idóneas reaparece el grupo químico que existía antes de la acetilación.

La acetilación es totalmente reversible tras saponificación para los grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol; totalmente irreversible para los grupos hidroxiaminos secundarios y moderadamente reversible para los hidroxiamino primarios.



O

Procedimiento técnico de acetilación – saponificación

♦ Soluciones:

- Mezcla para la acetilación:
 - ♦ Anhídrido acético. 13 ml.
 - ♦ Piridina anhidra 20 ml.
 - ♦ mezcla para la saponificación
 - ◇ Hidróxido potásico 1N en solución acuosa o en alcohol 80° C.

Modo de operar:

◇ Acetilación:

- Desparafinar e introducir los cortes en alcohol absoluto. Secarlos y pasarlos a la piridina.
- Tratar con la mezcla de acetilación de 37° – 58° C durante un tiempo que depende del material biológico y suele estar de 30 min. a 24 h.
- Pasamos los cortes a la piridina.
- Alcohol absoluto.
- Hidratar.
- Acetilación + saponificación:
 - ◇ Se repite el proceso anterior.
 - ◇ Tratar con la disolución de KOH durante 45 min.
 - ◇ Enjuagar con agua.

♦ Lotes de preparaciones y resultados en los controles de la técnica del PAS.

- Una preparación a la que se le hace el PAS normal.
- Otra preparación del mismo corte. Se le hace un PAS sin oxidar para detectar grupos aldehídos ya existentes o bien se hace un método de bloqueo específico para dichos grupos.
- Un lote de cortes que llevan acetilación.
- Un lote de cortes que llevan acetilación + saponificación.

Resultados:

- ◇ Al acetilar desaparecen todos los grupos PAS+ menos los aldehídos ya existentes.
- ◇ Al acetilar y saponificar los grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol quedan como estaban, recuperan la PAS positividad.
- ◇ Los hidroxiamino primarios reaparecen mucho más débilmente y los secundarios permanecen bloqueados al ser la acetilación irreversible.

1.3 TÉCNICAS PARA DETERMINAR MUCOPOLISACÁRIDOS ÁCIDOS.

Los mucopolisacáridos ácidos son unos polisacáridos que no tienen grupos alcohólicos en posición 1,2 glicol sino grupos ácidos

carboxilos o sulfatados.

Las técnicas para determinar mucopolisacáridos ácidos son principalmente:

a) Azul Alcían

b) Reacción Metacromática

- **Técnica del Azul Alcían:** se ha comprobado que usando el azul alcían en condiciones de pH en torno a 2,4 –2,6 se colorean los mucopolisacáridos ácidos sulfatados y los carboxílicos.

Si por el contrario se emplea a un pH muy bajo, en torno a 1, sólo se colorea los mucopolisacáridos sulfatados, los carboxílicos no se tiñen.

Si se sigue disminuyendo el pH hasta 0,5 se incrementa la selectividad de la tinción y en este caso sólo se tiñen los mucopolisacáridos fuertemente sulfatados.

Procedimiento Técnico:

- ♦ Fijación: formol al 4%.
- ♦ Soluciones:
- ♦ Azul alcían a pH 2,5:
 - Azul alcían (C.I. 74240) 1 g.
 - Ácido Acético 3%.. 100 ml.
- ♦ Azul alcían a pH 1:
 - Azul alcían. 1 g.
 - HCl 0,1 N 100 ml.
- ♦ Azul alcían a pH 0,5 :
 - Azul alcían . 1 g.
 - HCl 0,5 N .. 100 ml.

Filtrar todas las soluciones antes de usar.

Las soluciones son estables durante 2 semanas aproximadamente, como colorante de contraste se puede usar una solución de Rojo nuclear al 1 %.

Modo de operar:

- ◇ Desparafinar e hidratar.
- ◇ Tratar con la solución deseada de azul alcían durante 30 min.
- ◇ Si se usó la solución a pH 2,5, lavar con agua (d) ; si se usó cualquiera de los otros dos, secar sólo con papel de filtro.
- ◇ Contrastar si se desea con rojo nuclear.
- ◇ Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

- Azul alcian a pH 2,5 los mucopolisacaridos ácidos (carboxilos y sulfatos) se tiñen de azul.
- Azul alcian a pH 1 sólo se tiñen de azul los mucopolisacaridos ácidos sulfatados.
- Azul alcian a pH 0,5 sólo se tiñen de azul los mucopolisacaridos ácidos fuertemente sulfatados.

b) Reacción Metacromática:

La metacromasia indica un cambio de color cuando un colorante químicamente puro tiñe selectivamente una estructura tisular de color diferenteal de la solución diluida de colorante; se dice que ha ocurrido una **reacción metacromática**.

La estructura responsable de este cambio se llama **cromotropa**.

Para distinguirla de las restantes que se tiñen normalmente (**ortocromáticas**)

Sustancias cromotropas son los mucopolisacaridos ácidos, ácidos nucleicos, lípidos de carácter ácido y partículas de sílice.

La reacción metacromática presenta grandes variaciones ante las más pequeñas modificaciones del medio donde reproduce, por lo tanto la reacción metacromática es de difícil interpretación e incluso puede proporcionar resultados contradictorios.

AZUL DE TOLUIDINA (técnica de metacromasia que mas se hace)

◊ Fijación:

En el caso de los mucopolisacaridos ácidos pueden emplearse tejidos fijados con alcohol, Bouin alcohólico e incluso formol pero deben evitarse los fijados con agentes oxidantes.

◊ Soluciones:

- ◆ Solución Tampón de ácido acético – acetato a pH 4,2:
- ◆ Acetato sódico. 2,7 g.

H₂O (d). 100 ml.

- ◆ Ácido acético 0,5 M.. 1,1 ml

H₂O (d). 100 ml.

Solución A. 30 ml.

Solución B. 90 ml.

- ♦ Solución a 0,2 % de azul de toluidina en la solución tamponada anterior.
- ♦ Solución acuosa al 4 % de molibdato amónico.

Procedimiento Técnico:

- ◊ Desparafinar e hidratar.
- ◊ Teñir con azul de Toluidina. 2 – 5 min.
- ◊ Lavar en la solución tamponada.
- ◊ Tratar los cortes en la solución de molibdato.. 10 min.
- ◊ Lavar con agua (d).
- ◊ Deshidratar, aclarar y montar.

Resultados:

Elementos de carácter metacromático se van a ver de rojo a púrpura y el resto se va a ver azul.

Los baños en alcohol etílico inhiben la metacromasia por lo que deben realizarse preparaciones testigo.

Una 1ª preparación se observa tras su paso por el agua cética antes de fijar con molibdato. Esto tiene por objeto evaluar el efecto metacromático inmediato en fase inestable. A continuación se sigue el procesamiento normal.

Otra preparación no se deshidrata y se monta en un medio acuoso para evitar el paso por alcohol etílico.

La última preparación se confecciona normalmente, es decir, deshidratando y montando por el método habitual.

Comparando las 3 preparaciones se puede seguir la evolución del efecto metacromático y la influencia del procesamiento histológico realizado sobre ellas.

También se deben realizar **controles de especificidad en la reacción metacromática**. Se usan para distinguir entre mucopolisacaridos ácidos carboxílicos y sulfatados.

Son principalmente de **2 tipos**:

- ♦ **Variación de pH**: consiste en realizar la tinción entorno a un pH de 3, 5. en este caso la mayoría de los mucopolisacaridos ácidos carboxílicos pierden su metacromasia mientras que los sulfatados la conservan.

Haremos 2 lotes: el 1º se tiñen a pH 4,5 y el 2º a 3,5.

Los mucopolisacaridos ácidos que siguen siendo

metacromáticos en el 2º lote corresponden a mucopolisacaridos ácidos sulfatados ya que los carboxílicos pierden su metacromasia.

- ♦ **Metilación reversible:** consiste en tratar un grupo de cortes con una mezcla de alcohol metílico y ácido clorhídrico, con lo que se bloquean por metilación los grupos ácidos de los mucopolisacaridos ácidos.

Después se realiza mutilación seguida de saponificación, reapareciendo la metacromasia solamente en los mucopolisacaridos ácidos carboxílicos.

1.4 TÉCNICA PARA DIFERENCIAR MUCOPOLISACÁRIDOS ÁCIDOS, NEUTROS Y GLICOPROTEÍNAS. TÉCNICA DEL AZUL ALCIAN – PAS.

Procedimiento Técnico:

- ◊ Fijación: formol al 4 %.
- ◊ Soluciones:
- ♦ Solución azul alcian a pH 2,5.
- ♦ Solución ácido periódico el 0,5 %.
- ♦ Reactivo de Schiff.
- ♦ Solución de ácido sulfuroso.
- ♦ Colorante de contraste.

Técnica:

- ◊ Desparafinar e hidratar.
- ◊ Solución azul alcian a pH 2,5 30 min.
- ◊ Lavar con agua (d)
- ◊ Ácido periódico. 10 min.
- ◊ Lavar con agua (d).
- ◊ Reactivo de Schiff 15 – 30 min.
- ◊ Aclarar con 3 baños de agua sulfurosa.. 2 min. Cada uno.
- ◊ Lavar con agua corriente ... 5 min.
- ◊ Colorante de contraste (Hematoxilina Harris normalmente).
- ◊ Lavar, clorar y montar.

Resultados:

Mucopolisacaridos ácidos: azul

Mucopolisacaridos neutros y glicoproteínas: rojo o rosa.

Resto: violeta (si se usa hematoxilina).

2. HISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS Y ACIDOS NUCLEICOS.

♦ **MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA LA COLORACIÓN DE PROTEÍNAS.**

Desde la introducción de los métodos inmunohistoquímicos que permiten caracterizar antigénicamente a la mayor parte de las proteínas, todos los métodos de coloración puramente histoquímicos para proteínas han perdido vigencia.

De forma genérica las técnicas histoquímicas para colorear proteínas pueden clasificarse en 3 grupos:

- ♦ **Reacciones generales:** pretenden colorear globalmente a las proteínas presentes en un tejido.
- ♦ **Reacciones de grupo:** pretenden caracterizar, no la molécula proteica globalmente sino un corto número de grupos reactivos específicos de dichas sustancias.
- ♦ **Reacciones específicas:** para grupos químicos particulares propios de determinados aminoácidos, como por ejemplo el grupo fenol.
- ♦ **Reacciones de grupo. Reacción de Ninhidrina – Schiff.**

Se trata de establecer la naturaleza proteica de una determinada sustancia a partir de la demostración en ellas de ciertos grupos químicos que se encuentran de forma exclusiva en los polipéptidos.

La reacción de la Ninhidrina – Schiff se basa en un proceso de desaminación oxidativa de las cadenas polipeptídicas, provocado por la ninhidrina por el cual los grupos amino son sustituidos por grupos carbonilo.

Tras el proceso se realiza la determinación de los carbonilos neoformados mediante reactivo de Schiff (igual que la técnica del PAS).

TÉCNICA DE LA NINHIDRINA – SCHIFF

- **Fijación:** alcohol o acetona. Formol tamponado y líquido de Zenker, también se puede utilizar pero en estos casos el tiempo de incubación con la ninhidrina debe ser superior a 20 horas. Se pueden utilizar secciones en congelación o en parafina.

- **Soluciones:**

- ◊ Solución de ninhidrina:

- Ninhidrina.. 0.5 g.
- Etanol absoluto..... 100 ml.

- ◊ Solución de reactivo de Schiff.

- **Procedimiento:**

- ♦ Desparafinar e hidratar.
- ♦ Tratar los cortes con alcohol etílico al 70 %.
- ♦ Incubar a 37 ° C con la solución de ninhidrina entre 6 – 24

horas, (habitualmente toda la noche).

- ◆ Lavar bien las secciones en agua corriente.
- ◆ Teñir con reactivo de Schiff.. 30 – 45 min.
- ◆ Contrastar con hematoxilina de Harris.
- ◆ Posteriormente lavar con agua corriente 10 min.
- ◆ Deshidratar, aclarar y montar.

· **Resultados:**

◇ Grupos amino (NH₂): rojo – rosa púrpura.

· **Controles:**

La ninhidrina solo oxida los grupos amino cuando están próximos a un radical metilo o a un radical ácido.

Además es posible la aparición de falsos positivos en casos de preexistencia de grupos aldehídos en el tejido (R – C = O), por ello debe incluirse siempre un lote de preparaciones sin tratamiento con la ninhidrina, es decir, que se traten sólo con el reactivo de Schiff.

◆ **METODOS HISTOQUÍMICOS PARA LA DETERMINACION DE ACIDOS NUCLEICOS.**

Los ácidos nucleicos están compuestos por largas cadenas de unidades llamadas nucleótidos, enlazadas por uniones covalentes.

En general los nucleótidos están formadas por:

- ◇ Ácido fosfórico, implicado en el mecanismo físico-químico de coloración por el cual se tiñen intensamente con colorante básicos como le hematoxilina.
- ◇ Una pentosa (5 carbonos), que puede ser ribosa (ARN) o desoxiribosa (ADN).
- ◇ Bases nitrogenadas (ADN : A,C,T,G), (ARN: A,C,G,U)

En condiciones normales los ácidos nucleicos se conjugan con proteínas básicas para formar nucleoproteínas, por ello la realización de una hidrólisis ácida permite separar el componente proteico y así poder demostrar la presencia de ácidos nucleicos (los ácidos nucleicos se enrollan sobre las proteínas y la hidrólisis es para eliminar las proteínas).

◆ **Técnicas que permiten separar el ADN de otras estructuras. Reacción de Feulgen.**

Estas técnicas se utilizan para visualizar el núcleo, el proceso de tinción se realiza en 2 fases:

1ª Fase. Una hidrólisis ácida del ADN: con esto se pretende mediante la actuación del ácido clorhídrico romper la estructura del ADN por el lugar en que la pentosa se une a la base nitrogenada, de forma que sobre cada molécula de

azúcar (pentosa) reaparece un grupo carbonilo. Estos grupos se encuentran situados a una distancia entre 1 – 1.1 nm.

2ª Fase. Demostración de los grupos carbonilos: mediante reactivo de Schiff (color rosa ADN sólo). El ARN no puede ser detectado por el reactivo de Schiff tras la realización de la hidrólisis ácida, puesto que la distancia entre grupos carbonilo es menor de 1 nm, y por tanto no se produce la reacción con el reactivo de Schiff.

◇ Problemas generales de esta técnica:

- ◆ Hidrólisis excesiva: el ácido clorhídrico es un ácido fuerte, si se prolonga excesivamente el tiempo de hidrólisis se puede disgregar la molécula de ADN en su totalidad, impidiendo así su posterior detección. Por ello el aspecto más importante de la técnica es el tiempo de hidrólisis, que varía mucho según el fijador utilizado.
- ◆ Envejecimiento del reactivo de Schiff: en condiciones normales es incoloro, la aparición de una tonalidad rosada indica envejecimiento y por tanto debe desecharse, puesto que el envejecimiento lo hace inservible para detectar los grupos carbonilos.
- ◆ **MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACION Y TINCION DE PIGMENTOS E IONES METÁLICOS.**
- ◆ **MÉTODOS PARA DETECTAR IONES TÉCNICOS. TÉCNICAS DEL AZUL DE PERLS.**

En el interior de los tejidos el hierro se puede depositar de 2 formas:

- ◆ En forma iónica, o formando sales ferrosas y ferricas, por lo general en forma de cloruros o hidróxidos.
- ◆ Como hierro ligado a proteínas.

La **técnica del azul de Perls** es la de mayor importancia para detectar hierro, ya que el hierro ferrico es el más frecuente en los tejidos. El fundamento de esta técnica se basa en la propiedad que tiene el ferrocianuro potásico, para transformarse en presencia de hierro férrico en ferrocianuro ferrico, o azul de Prusia por acción del ácido clorhídrico que actúa como desencadenante de la reacción.

CL₃Fe

Ferrocianuro potásico + HCL Ferrocianuro férrico.

TÉCNICA.

◇ **Fijación:** cualquier fijador es válido. Se pueden utilizar secciones en parafina o improntas.

◇ **Soluciones:**

- ◆ Ferrocianuro K al 10 % (conservar en nevera).

♦ Ácido clorhídrico :

– Ácido clorhídrico concentrado. 2 ml.

– Agua destilada..... 98 ml.

- ♦ Solución de ferrocianuro K, ácido clorhídrico: mezclando a partes iguales la solución 1 y 2. esto se debe preparar inmediatamente antes de su uso.

♦ **Procedimiento Técnico:**

- ♦ Desparafinar e hidratar.
- ♦ Tratar con la mezcla de ferrocianuro K, ácido clorhídrico 10 min.
- ♦ Lavar con agua destilada (el Fe se ve azul).
- ♦ Se puede contrastar con una solución rojo nuclear al 1 %.. 2 – 3 min.
- ♦ Deshidratar, aclarar y montar.

· **Resultados:**

– Hierro férrico: azul.

– Núcleos: rojo.

· **Observaciones:**

El tiempo de tinción depende de la cantidad de hierro existente en los tejidos.

Siempre deben utilizarse preparaciones positivas de control. Si al echar la disolución 3 en la porta toma color verde debemos desecharla, enjuagar y poner reactivo nuevo.

♦ **MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CALCIO. TÉCNICA DE VON KOSSA.**

Las sales de calcio están presentes normalmente en los huesos, dientes y sangre aunque en ocasiones también aparecen áreas de calcificación en tejidos desprovistos de ellas.

En general las sales que con mayor frecuencia se depositan son carbonatos, oxalatos y fosfatos.

TÉCNICA

· **Fijación:** formol al 4 % preferiblemente y utilizar secciones en parafina.

· **Soluciones:**

- Solución acuosa de nitrato de plata al 1 %.
- Solución de tiosulfato sódico al 2,5 %.
- Rojo neutro al 1 %.

♦ **Procedimiento técnico:**

- ♦ Desparafinar e hidratar.
- ♦ Tratar con la solución de

nitrato de plata a plena luz..

30 – 60 min.

- ◆ Lavar con agua destilada.
- ◆ Lavar en la solución de tiosulfato.. 5 min.
- ◆ Volvemos a lavar con agua destilada.
- ◆ Contrastar con el rojo neutro. 2 – 3 min.
- ◆ Deshidratar, aclarar y montar.

· **Resultados:**

– Iones calcio o calcificación: **negro**.

– Núcleos: rojo.

◆ **METODOS PARA LA DETERMINACION DE COBRE. TÉCNICA ÁCIDO RUBEÁNICO.**

Este metal se encuentra presente de forma casi exclusiva en el hígado y otros órganos de pacientes con enfermedad de Wilson.

En ocasiones se encuentra presente en algunas cirrosis hepáticas aunque en muy pequeña proporción.

TÉCNICA

- **Fijación:** cualquier fijador es válido. Se deben utilizar secciones en parafina o en congelación.
- **Soluciones:**
- Solución madre de ácido rubeánico al 0,1 %.
- Solución de

acetato
sódico al 10
%.

· Solución de
trabajo:

– De la
solución 1:
por cada 2.5
ml se echan
de la
solución 2,
50 ml

♦ **Proc**
Técn

♦ Desp
e
hidra

♦ Trat
con
solu
de
traba
a
37°
dura
toda
la
noch
en
un
recip
tapa
hern

♦ trata
los
corte
con
alco
etílic
al
70
%
15
min.

♦ Alco
etílic
abso
6
hora

♦ Acla

con
xilen
y
mon

—
Dep
de
Cob
con
gran
de
verd
a
negr