



**TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DE MUESTRAS, CORTES
HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN EN PIEL DE CAMÉLIDOS
SUDAMERICANOS**

Autores:

Dr. Med. Vet. Eduardo N. Frank
Dr. Ing. Agr. Michel V.H. Hick
Med. Vet. Alejandro Prieto
Tec. María Flavia Castillo.

frank@agro.ucc.edu.ar

<http://www.uccor.edu.ar/sites/supprad/>

**Red SUPPRAD - Universidad Católica de Córdoba,
Grupo Genética y Grupo Poblaciones.**

Edición:

Dr. Ing. Agr. Michel V.H. Hick
Dr. Med. Vet. Eduardo N. Frank

Documento Interno SUPPRAD N° 4 (2016)

Serie Documentos Internos SUPPRAD

Nº 4, Red SUPPRAD 2016.

Versión electrónica en <http://www.uccor.edu.ar/sites/supprad/> en sección Documentos internos

La Red SUPPRAD (SUstentabilidad Productiva y PRomoción de Áreas Desfavorecidas):

Red conformada por equipos de docentes, investigadores, técnicos y productores de diferentes Universidades nacionales y privadas y ONG´s nacionales.

Los Autores:

Los autores forman parte del equipo de trabajo en el marco del Red SUPPRAD la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Católica de Córdoba. Numerosos trabajos de relevamiento poblacionales en diferentes especies y áreas de trabajo, posibilitan elaborar este documento de síntesis para el apoyo a los técnicos de campo, de laboratorio, extensionistas e investigadores. Los conocimientos vertidos son el fruto de la Tesis Doctoral del Dr. Frank de numerosos colaboradores de contrapartes. Numerosos trabajos científicos ha publicado el equipo y la experiencia acumulada esta puesta a disposición además a través de cursos, pasantías y entrenamientos.

Imagen de fondo de tapa:

Corte horizontal de piel teñido con teñido con “sacpic”.

Resumen

Se describen protocolos utilizados en Camélidos Sudamericanos fundamentalmente llamas para la obtención de muestras de piel y la posterior realización de cortes histológicos y de tinción. La obtención de la muestra de piel se realiza con un sacabocado para biopsia y una vez obtenidas a piezas son fijadas y conservadas en soluciones de formol varias. Los cortes histológicos se realizan con micrótopo de congelamiento y de parafina, siendo realizados en forma horizontal, vertical o transversal a la superficie de la piel. La tinción para su posterior evaluación se realiza mediante la técnica de Saccpic y sus modificaciones y la técnica de azul de Nilo.

Técnicas de obtención de muestras, cortes histológicos y tinción en piel de Camélidos Sudamericanos

1. TÉCNICA PARA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE PIEL DE CAMÉLIDOS

A. Materiales:

- Sacabocados para biopsia de piel de 6 y 8 mm 2
- Afeitadoras: 2
- Bases sólidas para fijar muestras (cartón, plástico etc.): varias
- Tijera curva: 2
- Frascos para las muestras con solución fijadora (10 ml): varios
- Pegamento.

B. Soluciones:

- Solución antiséptica.
- Solución fijadora^(*).

(*) ver solución según técnica de corte histológico y tinción que se vaya a usar.

C. Metodología:

- Determinar el lugar de donde se obtendrá la muestra.
- Rasurar la zona.
- Proceder a la antisepsia del lugar.
- Obtener la muestra con el sacabocados, introduciendo el instrumento cortante hasta el tejido graso subcutáneo.
- Fijar las muestras sobre las bases sólidas con pegamento para evitar alteración en el tamaño.
- Una vez fijadas, se incorporan las muestras en los frascos de 10 ml con la solución fijadora respectiva según técnica de corte y tinción.

2. TÉCNICA DE CORTES HISTOLÓGICOS Y TINCIÓN DE PIEL DE CAMÉLIDOS

2.1. Técnicas de corte histológicos con inclusión de las muestras en parafina⁽¹⁾ y tinción “saccpic” para microscopía óptica.

- (1) con la inclusión de la muestra en parafina solo se hacen cortes histológicos horizontales. Si se quiere utilizar para cortes verticales se debe tener la precaución adecuada que asegure el éxito de la técnica.

A. Equipamientos:

- Micrótopo para cortes con parafina
- Aguja histológica 1
- Pinza de depilar 2
- Porta objetos varios
- Cubre objetos varios

B. Soluciones:

- 1) Formol fosfatado (buffer) 1000.00 ml**
- NaH₂PO₄.H₂O 4.0 gr 4.00 gr
 - NaHPO₄ 6.5 gr 6.50 gr
 - Formalina 100.0 ml
 - Agua destilada 900.0 ml

Formalina: solución formol al 40%

- Formol 40.0 ml
- Agua destilada 60.0 ml
- controlar el pH y neutralizar con 2 gr de carbonato de sodio.

- 2) Xileno fénico 125.00 ml**
- Ácido fénico o fenol 25.0 gr 41.67 ml
 - Xileno 75.0 ml

- 3) Hematoxilina férrica de Weigert 125.00 ml**

- a) Solución A 62.50 ml**
- Hematoxilina 1.0 gr 0.63 gr
 - Alcohol (90-95%) 99.0 %
- Disolver y llevar a 100.0 ml

- b) Solución B 62.50 ml**
- Cloruro férrico (30% acuoso) 4.0 ml 1.20gr 0.75 gr
 - Ácido clorídrico conc.(S.G. 1.124) 1.6 ml
 - Agua destilada 95.0 ml

Iguales partes de cada solución de uso en el momento

- 4) Fuccina básica 125.00 ml**
- Fuccina 1.0 gr 1.25 gr
 - Alcohol 99% 50.0 ml
 - Agua destilada 50.0 ml

- 5) Safranina de Winipater 125.00 ml**
- Safranina 10.0 gr 1.6 1.563 1.60 gr
 - Alcohol 95% 15.0 ml 2.3 ****
 - Agua destilada 145.0 ml 22.7 ****

25.0 ml de la solución se agrega a 80 ml de alcohol 50% y se filtra

- 6) Indigo carmin pícrico 125.00 ml**
- Indigo carmin 1.0 gr 0.42 gr
 - Solución saturada de ac. pícrico 300.0ml

Solución saturada de ac. pícrico

- Ácido pícrico 4.0 gr 1.67 gr

- Agua destilada

300.0 ml

C. Metodología

1) **Solución fijadora:** formol fosfatado (buffer) al menos tres días para piezas muy chicas, 1 semana para piezas de 0.5 * 0.5 o más grandes.

2) Inclusión en Parafina:

a) Deshidratación y limpieza:

Opción 1

- Alcohol 70% entre 6 a 8 hs (9.00 a 16.30) con un cambio en el medio.
- Alcohol 90% toda la noche (16.30 a 9.00hs) con un cambio a las 17.00hs.
- Alcohol absoluto alrededor de 5 minutos con un cambio en ese tiempo.
- Xilol fénico mínimo tres días (menos para piezas más pequeñas).

Opción 2

- | | | |
|--------------------|---------|--------------------|
| - Alcohol 50 % | 2 baños | 1 hora cada uno. |
| - Alcohol 70% | 2 baños | 1 hora cada uno. |
| - Alcohol 90% | 2 baños | 2 hs cada uno. |
| - Alcohol absoluto | 2 baños | 1/2 hora cada uno. |
| - Xilol fénico | 2 baños | 4 hs cada uno. |
| - Xilol | 2 baños | 1/2 hora cada uno. |

b) **Fijación con parafina:** la pieza es tomada directamente del xilol fénico y llevado al primer baño de parafina derretida en un horno con la temperatura 1 a 2 grados por encima del punto de fusión de la cera. El tiempo requerido es variable, es preferible dejar la muestra en la parafina derretida más tiempo que menos de lo necesario. Los tiempos originales para muestras de piel de 0.5 a 1 cm son:

- Baño 1: 6 a 8 hs - 1 día.
- Baño 2: toda la noche.
- Baño 3: 6 a 8 hs.

El tiempo necesario se puede reducir a entre 3 y 6 hs si se lleva a cabo un movimiento automático de la parafina en el horno. La parafina derretida se encuentra en un molde de forma cúbica. Se retira del horno y se deja enfriar y se lo retira del molde.

3) **Obtención de submuestras con micrótopo:** se toma el cubito y se lleva al micrótopo con la base para cortes con parafina de entre 5 y 15 μ m y se obtienen las submuestras.

4) **Tinción:** se utiliza el método SACPIC para piezas de 8 μ m de espesor.

- a) Quitar la parafina con xilol 1: 10 minutos
2: 10 minutos

Cambiar frecuentemente el xilol para que no se mezcle la parafina con los alcoholes.

b) Hidratación:

- Alcohol absoluto 2 min.
- Alcohol 90% 2 min.
- Alcohol 70% 2 min.
- Alcohol 50% 2 min.

c) Montar en porta objetos: se coloca la muestra en porta objetos que contienen cola albúmina (mezcla a base de clara de huevos)

d) Coloración nuclear: Hematoxilina 15 min.

e) Llevar a alcohol ácido hasta solo núcleos teñidos

f) Lavar en alcohol 50% - 15 min.

g) Tinción prequeratina: fuccina básica (5-10 min.) o Safranina 15 min.

- h) Lavar aumentando el % de alcohol:
 - Alcohol 50% 2 min.
 - Alcohol 90% 2 min.

- i) Colocar en alcohol absoluto conteniendo entre 1-2 ml (0.15-0.30%) saturando con alcohol ácido pírico hasta que se observe la zona queratinizada de color rojo.
- j) Colocar en alcohol de la siguiente forma:
 - Alcohol absoluto 2 min.
 - Alcohol 90% 2 min.
 - Alcohol 70% 2 min.
 - Alcohol 50% 2 min.
 - Agua destilada 2 min.

- k) Tinción de tejido conectivo: Picrico-Indigo-Carmin 3 min.
- l) Colocar en Alcohol 50% 2 min.
- m) Llevar a Alcohol 70% hasta que las fibras de colágeno tomen un color verde-azuladas (1-2 min.).
- n) Se lleva rápidamente a alcohol 90% y luego a alcohol absoluto, esto es para evitar que se separe el picrico-indigo-carmin.
- o) Limpiar en xileno fénico durante 2min. y luego en xileno durante 2 min.. Se puede dejar más tiempo en xileno si es necesario.

5) Llevar la muestra al microscopio.

2.2. Técnicas de cortes histológicos y uso de la técnica “sacpic” modificado para microscopia óptica.

2.2.1. Cortes Horizontales (H) y Cortes Verticales Transversales (VT).

A. Equipamiento

-	Micrótopo de Congelamiento	
-	Lupa (40x - 100x)	1
-	Aguja histológica	2
-	Pinza de depilar	2
-	Tijera	1
-	Afeitadora	1
-	Frascos de corte	varios
-	Hojas de afeitar	varias
-	Pipeta Pasteur	2
-	Erlenmeyer	1
-	Porta objetos	varios
-	Cubre objetos	varios
-	Papel secante	varios

B. Soluciones.

1. Solución fijadora de formalina 10%

-	Formaldehido (formol) comercial	100 ml
-	Agua destilada	900 ml

2. Formol salino

-	Formaldehido (formol) comercial	125 ml
-	Solución de cloruro de sodio	875 ml

3. Solución de cloruro de sodio

-	Cloruro de sódio	8.5 gr
-	Agua destilada	1000 ml

4. Xileno fénico

-	Ácido fénico o fenol	25.0 gr	125.00 ml
-	Xileno	75.0 ml	41.67 ml

5. Hematoxilina férrica de Weigert

a)	Solución A		125.00 ml
	- Hematoxilina	1.0 gr	62.50 ml
	- Alcohol (90-95%)	99.0 %	0.63 gr
	Disolver y llevar a 100.0 ml		
b)	Solución B		62.50 ml
	- Cloruro férrico (30% acuoso)	4.0 ml 1.20gr	0.75 gr
	- Ácido clorídrico conc.(S.G. 1.124)	1.6 ml	
	- Agua destilada	95.0 ml	

Iguales partes de cada solución de uso en el momento

6. Fuccina básica				125.00 ml
- Fuccina		1.0 gr		1.25 gr
- Alcohol 99%		50.0 ml		
- Agua destilada		50.0 ml		

7. Safranina de Winipater				125.00 ml
- Safranina	10.0 gr	1.6	1.563	1.60 gr
- Alcohol 95%	15.0 ml	2.3	****	
- Agua destilada	145.0 ml	22.7	****	

25.0 ml de la solución se agrega a 80 ml de alcohol 50% y se filtra

8. Indigo carmin pícrico				125.00 ml
- Indigo carmin		1.0 gr		0.42 gr
- Solución saturada de ac. pícrico		300.0ml		
Solución saturada de ac. pícrico				
- Ácido pícrico		4.0 gr		1.67 gr
- Agua destilada		300.0 ml		

C. Metodología.

1) Preparación.

- Acondicionamiento de la muestra. Medición de los diámetros para determinación de factores de encogimiento.
- Observación de la dirección de emergencia de la fibra.
- Obtención de submuestras.

2) Corte.

- Realizar cortes de entre 25 - 30 μm para H y de 35 μm para VT.
- Recoger los cortes de piel en agua destilada en forma seriada. En ella pueden permanecer de un día para otro.

3) Montado.

- Con una aguja histológica se pasan brevemente los cortes por alcohol 100° y nuevamente se colocan en agua destilada para su aplanamiento (en H).
- Montar en porta objetos: se coloca la muestra en porta objetos que contienen cola albúmina (mezcla a base de clara de huevos)

4) Tinción:

- Coloración nuclear: Hematoxilina 15 min.
- Llevar a alcohol ácido hasta solo núcleos teñidos
- Lavar en alcohol 50% - 15 min.
- Tinción prequeratina: fuccina básica (5-10 min.) o Safranina 15 min.
- Lavar aumentando el % de alcohol:
 - Alcohol 50% 2 min.
 - Alcohol 90% 2 min.
- Colocar en alcohol absoluto conteniendo entre 1-2 ml (0.15-0.30%) saturando con alcohol ácido pícrico hasta que se observe la zona queratinizada de color rojo.
- Colocar en alcohol de la siguiente forma:
 - Alcohol absoluto 2 min.
 - Alcohol 90% 2 min.

- Alcohol 70% 2 min.
 - Alcohol 50% 2 min.
 - Agua destilada 2 min.
- h) Tinción de tejido conectivo: Picrico-Indigo-Carmin 3 min.
- i) Colocar en Alcohol 50% 2 min.
- j) Llevar a Alcohol 70% hasta que las fibras de colágeno tomen un color verde-azuladas (1-2 min.).
- k) Se lleva rápidamente a alcohol 90% y luego a alcohol absoluto, esto es para evitar que se separe el picrico-indigo-carmin.
- l) Limpiar en xileno féénico durante 2min. y luego en xileno durante 2 min.. Se puede dejar más tiempo en xileno si es necesario.

5) Llevar la muestra al microscopio.

2.3. Técnicas de corte histológicos por congelamiento y tinción de Azul de Nilo en Camélidos domésticos.

2.3.1. Cortes Horizontales (H) y Cortes Verticales Transversales (VT).

A. Equipamiento

- Micrótopo de Congelamiento
- Lupa (40x - 100x) 1
- Aguja histológica 2
- Pinza de depilar 2
- Tijera 1
- Afeitadora 1
- Frascos de corte varios
- Hojas de afeitar varias
- Pipeta Pasteur 2
- Erlenmeyer 1
- Porta objetos varios
- Cubre objetos varios
- Papel secante varios
- Baño María 1

B. Soluciones.

1. Solución fijadora de formalina 10%

- Formaldehido (formol) comercial 100 ml
- Agua destilada 900 ml

2. Formol salino

- Formaldehido (formol) comercial 125 ml
- Solución de cloruro de sodio 875 ml

3. Solución de cloruro de sodio

- Cloruro de sódio 8.5 gr
- Agua destilada 1000 ml

4. Sulfato de Azul de Nilo

- Para un stock de solución 1% de Azul de Nilo
- Azul de Nilo 10.0 gr

- Ácido Sulfúrico (concentrado) 5.0 ml
- Agua destilada 1000.0 ml

• Disolver el Azul de Nilo en el agua destilada y luego agregar el ácido sulfúrico. Hervir lentamente durante dos horas, manteniendo el volumen con agua destilada. Enfriar a temperatura ambiente. Filtrar y envasar a 1000 ml.

N.B.: Emplear una solución al 0.25% para cortes verticales y una solución al 0.50% para cortes horizontales.

5. Montante acuoso de Káiser

- Gelatina 8.0 gr
- Glicerol (glicerina) 50.0 ml
- Fenol 1.0 ml
- Agua 42.0 ml

Si las muestras van a ser evaluadas dentro de un mes o dos, el fenol puede ser omitido.

D. Metodología.

1) Preparación.

- a) Acondicionamiento de la muestra. Medición de los diámetros para determinación de factores de encogimiento.
- b) Observación de la dirección de emergencia de la fibra.
- c) Obtención de submuestras.

2) Corte.

- a) Realizar cortes de entre 25 - 30µm para H y de 35 µm para VT.
- b) Recoger los cortes de piel en agua destilada en forma seriada. En ella pueden permanecer de un día para otro.

3) Montado.

- a) Con una aguja histológica se pasan brevemente los cortes por alcohol 100° y nuevamente se colocan en agua destilada para su aplanamiento (en H).
- b) Se montan en un porta objetos gelatinizado previamente (gelatina al 5%) y se cubren con un papel de filtro embebido en formalina (formol al 10%).
- c) Se retiran los papeles de filtro en el momento óptimo (ausencia de brillo) que permita retirarlos y que los cortes queden fijos en el portaobjetos.
- d) Se colocan los porta objetos en formalina (pueden permanecer hasta 48 hs.).

4) Coloración.

- a) Pasar los porta objetos por agua corriente durante 5 min. para lavar la formalina.
- b) Tinción de Azul de Nilo al 0.5% durante 5 min.
- c) Lavar con agua corriente (2 lavados).
- d) Colocar montante acuoso de Káiser para su montado definitivo.
- e) Eliminar el exceso de gelatina cuando esté seca con una hoja de afeitar y limpiar con alcohol ácido.

2.3.2. Cortes Verticales Longitudinales (VL).

A. Equepamientos.

- Lupa (40x - 100x) 1
- Aguja histológica 2
- Pinza de depilar 2

- Tijera	1
- Afeitadora	1
- Frascos de corte	varios
- Hojas de afeitar	varias
- Pipeta Pasteur	2
- Erlenmeyer	1
- Porta objetos	varios
- Cubre objetos	varios
- Papel secante	varios
- Baño María	1

B. Soluciones.

1. Solución fijadora de formalina al 10%.
2. Azul de Nilo 0.25%.
3. Montante de Káiser.
4. Alcohol 96°.
5. Agua destilada

C. Metodología.

- 1) **Depilación:** a un costado de la lupa, sobre el papel secante, se cortan las fibras al ras con una tijera y ayudado de una pinza. Luego con la afeitadora, y ayudado de una aguja histológica presionando el cilindro de piel, se elimina el resto de fibra, tal que se pueda observar sin inconvenientes la dirección de emergencia de las fibras bajo la lupa.
- 2) **Corte:** bajo la lupa y sobre papel secante, se observa la dirección de las fibras para poder realizar el primer corte por la mitad y paralelo a la dirección de emergencia. Este se realiza con una hoja de afeitar fina, uno de cuyos filos se protege con cinta. Ayudado con la aguja histológica y siempre bajo la lupa se procede a cortar en movimientos de "baiven". Una mitad se regresa a su frasco original y con la otra se realizan diversos cortes verticales. El grosor debe ser tal que el folículo se observe dentro. Se realizan 6 a 8 cortes. Cada corte de piel se va colocando en un frasco de corte con formol salino (para una momentánea observación). Se realizan 2 o 3 cortes por filo de hoja de afeitar.
- 3) **Tinción:** se lavan los cortes con agua destilada en el mismo frasco, y posteriormente se agrega el colorante hasta sumergir los cortes. Éstos permanecen 3-4 min. hasta adquirir la coloración adecuada.
- 4) **Montado:** pasado el tiempo de tinción se lavan los cortes con agua agregando esta y extrayéndola 2-3 veces. Con una pinza se coloca sobre el porta objetos (con su correspondiente número de identificación), 3-4 cortes. Se los acomoda en el mismo sentido. A continuación se colocan gotas de montante hasta cubrir los cortes y se coloca el cubre objetos. El montante fue colocado a Baño María. Se deja endurecer y aclarar por el tiempo de 48-72 hs. Por último se lava el material con agua destilada y alcohol.

Bibliografía consultada:

- Frank, E. N. 2001. Descripción y análisis de segregación de fenotipos de color y tipos de vellón en llamas argentinas. Tesis Doctoral Universidad de Buenos Aires, 204 p.
- Frank, E. N.; Hick, M. H. V. & Pesarini, M. 1999. SUPREME-Project: A new approach for histological description of skin follicular complex in Argentine llamas. In: Proceedings of the 3rd European Symposium and SUPREME European Seminar. EAAP publication N° 105. Göttingen, Germany. pp. 243-250.

- Hardy, H. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends in Genetics* 8: 55-61.
- Lacolla, D.V.; García, M.; Corredera, C.; Buey, V. 2010. Estructura de la piel de los Camélidos Sudamericanos. *Ciencia Veterinaria* Vol: 12 N°1 pp. 8-15
- McCloghry, E. C. 1997 . Computer-assisted image analysis for the measurement of wool follicle density and fibre diameter in skin sections. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 1997, Vol. 40: 239-244
- McCloghry, E. C. 1997 a. Histological technique for the determination of wool follicle density. *Wool Technology and sheep breeding*, Vol 45 pp. 129 – 145
- McCloghry, E. C. 1997 b. Comparison of fibre diameters measured in the skin and wool of Merino sheep. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. Vol 40 pag 83 – 85.
- Moore, G. P.; Jackson, N. & Brown, G. 1998. Pattern and morphogenesis in skin. *J. Theor. Biol.* 191: 87-94.
- Nagorcka, A.E., Dollin, D.E. and C.D. Beaton, 1995. A technique to quantify and characterize the density of fibres and follicles skin of sheep. *Aust. J. of Agric. Res.* 46(9): 1525 - 1534.
- Naylor, G. R. S., Phillips, D. G., Veitch. C. J., Dolling. H., and Marland, D. J., 1997. Fabric-Evoked Prickle in Worsted Spun Single Jersey Fabrics, Part I: The Role Of Fiber End Diameter Characteristics, *TcJxfi/eR es. J.* 67, 289-295.
- Ryder, M.L. and Stephenson, S.K. 1968. *Wool growth*. Academic Press. N. York.