

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA



Uso del Colorante Natural Ácido Carmínico al 10% obtenido de *Dactylopius coccus* (Cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovinos, Cajamarca

TESIS

Para Optar el Título Profesional de
MÉDICO VETERINARIO

Presentada por el Bachiller
DAVID MANOSALVA MEJÍA

Asesor
M.Cs. M.V. EDUARD EGBERTO GUEVARA LARA

CAJAMARCA- PERÚ
2017

DEDICATORIA

A mi hijo: **ADRIAN**, fruto de mi amor, motor que me impulsó seguir mis estudios en esta prestigiosa universidad, gracias por la paciencia y la confianza que sembró en cada momento de mi vida.

DAVID

AGRADECIMIENTO

A Dios, por acompañarme y protegerme en los momentos más difíciles de mi vida, por cuidar de mi familia para permanecer en la fe, gracias a su amor tuve la sabiduría necesaria durante todos los años de estudiante universitario para poder alcanzar una profesión digna como Médico Veterinario al servicio de la sociedad.

A mis padres: **REYNERIO e HILDA**, por el apoyo moral y económico, ofrecido en los años universitarios, gracias a ellos culminé con satisfacción mi carrera profesional de Médico Veterinario.

A mi hermano: **DANHYLO**, por la confianza y apoyo que me brindaron en cada momento, a ellos también debo mi superación intelectual para culminar mi profesión.

Al M.Cs. M.V. Eduard Egberto Guevara Lara, Docente adscrito a la Facultad de Ciencias Veterinaria de la Universidad Nacional de Cajamarca, mil gracias, por brindarme el apoyo y la orientación durante el desarrollo de mi trabajo de tesis.

A los señores docentes y personal administrativo de la Facultad de Ciencias Veterinarias, por sus enseñanzas y apoyo técnico durante los años de estudiante universitario.

DAVID

RESUMEN

El presente estudio se realizó en Cajamarca-Perú, con el objeto de determinar la afinidad del colorante natural Ácido Carmínico al 10% obtenido de *Dactylopius coccus* (Cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de Coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de Riñón de Ovinos, Cajamarca. Las muestras para los estudios histológicos fueron tomadas de riñones de ovinos sacrificados en el Camal Municipal de Cajamarca. La técnica de inclusión en parafina se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. La coloración y el montaje de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Histología SENASA-Lima. Resultados: 1. El ácido Carmínico al 10%, empleado en reemplazo de la hematoxilina, en la técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, brinda buena afinidad de los tejidos del riñón de ovino (Cápsula, corteza y médula) comportándose como colorante básico. 2. Los detalles histológicos se observan con claridad, permite la identificación de las estructuras parenquimatosas y tejido estromal. 3. En los tejidos de los vasos sanguíneos, se observa un buen contraste de coloración entre el ácido carmínico al 10% y la eosina.

Palabras clave: Coloración, Ácido carmínico, eosina, riñón, ovino.

ABSTRACT

The present study was carried out in Cajamarca-Peru, in order to determine the affinity of the Carmine Acid 10%. Obtained the Dactylopius coccus,(Cochineal) in Hematoxylin replacement in the Hematoxylin-Eosin Coloring Technique, in tissues of Sheep Kidney, Cajamarca. Samples for histological studies were taken from kidneys of sheep slaughtered in the Comal Municipal of Cajamarca. The paraffin inclusion technique was performed in the Laboratory of Embryology and Histology of the Faculty of Veterinary Sciences of the National University of Cajamarca. The staining and assembly of the samples were carried out in the Laboratory of Histology, SENASA-Lima. Results: 1. Carminic acid 10%, used in replacement of hematoxylin, in the coloring technique Hematoxylin-Eosin, provides good affinity of the tissues of the ovine kidney (Capsule, cortex and marrow) behaving like basic dye. 2. The histological details are clearly observed, allowing the identification of parenchymal structures and stromal tissue. 3. In blood vessel tissues, a good color contrast is observed between 10% carminic acid and eosin.

Key Word: Tintion, carminic acid, eosin, kidney, sheeps.

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

ABSTRACT

CAPÍTULO	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEORICO.....	03
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
IV. RESULTADOS.....	26
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	35
VII. REFERENCIAS	36
ANEXO	38

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Hasta la actualidad, los métodos de coloración utilizados en preparados histológicos para investigar la arquitectura de un tejido, sea tejido vegetal o animal, incluido al hombre, se realiza gracias a la afinidad de los colorantes ácidos o básicos que apetecen por determinado elemento estructural de un tejido. La mayoría de estos son preparados sintéticos, que si bien es cierto, brindan una buena coloración, también es cierto que son sustancias químicas que no garantizan inocuidad para el profesional que los manipula, aparte de ello, su valor económico es alto y, pueden ser contaminantes ambientales.

En el presente estudio, creemos conveniente utilizar el colorante natural Ácido Carmínico al 10% obtenido del *Dactilopius coccus* (cochinilla) en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, con la finalidad de estudiar el grado de afinidad de los tejidos renales a tal colorante.

1. OBJETIVOS

1.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la afinidad del colorante natural Ácido Carmínico al 10% obtenido del *Dactylopius coccus* (cochinilla), en reemplazo de la Hematoxilina en la Técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, en tejidos de riñón de ovinos, Cajamarca

1.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

- ❖ Determinar el grado de coloración de los componentes estructurales del tejido de la cápsula, corteza, médula y pelvis renal de ovino utilizando al ácido carmínico al 10% obtenido del *Dactylopius coccus* (cochinilla).
- ❖ Determinar la basofilia de los tejidos renales de ovino utilizando ácido carmínico-Eosina.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Clasificación taxonómica, sinonimia

- **Reino:** Animal.
- **Filo:** Arthropoda.
- **Clase:** Insecta.
- **Orden:** Hemiptera.
- **Superfamilia:** Coccoidea.
- **Familia:** Dactylopiidae.
- **Género:** Dactylopius
- **Especie:** Dactylopius coccus. (burmeister, 1839)

Sinonimia

- **Coccus cacti (linnaeus, 1758)**
- **Pseudococcus cacti (burmeister, 1839)**

2.2. Cochinilla. Descripción y Características

El *Dactylopius coccus* (cochinilla) es un insecto que se instala, como parásito, en las hojas de la tuna (*Opuntia picus cactil*), de cuya savia se nutre a través de un estilete bucal. Su reproducción se realiza en la misma tuna, donde se aloja formando colonias. El colorante natural que se extrae de la cochinilla es el ácido carmínico, que son inocuos al hombre, por lo que se recomienda como colorante natural. Usos: La cochinilla es empleada tradicionalmente en el Perú, desde las civilizaciones preincas en estado acuoso utilizando alumbre como

mordiente, para teñir pelos de alpaca y algodón. Actualmente, el uso principal de la cochinilla es en la modalidad de carmín, el cual es un producto versátil de gran valor para muchas industrias. Industria Farmacéutica: Carmín en polvo o solución empleada en reparación de grageas y tabletas. En solución alcalina se emplea en pastas dentífricas, enjuagues bucales, etc. Industrias cosméticas, industria alimentaria.

2.2.1. Origen y características morfológicas de la cochinilla

El *Dactylopius coccus* (grana o cochinilla) es un insecto que parasita las hojas del nopal o tunera. Tiene forma de grano rojizo-negro cubierto por un polvo blanco. Cuando han alcanzado su desarrollo (unos 8 milímetros), se recogen y se colocan al sol o se secan en hornos. Su aspecto es granular, de forma más o menos oval, arrugada, convexo y con algunas estrías. La grana es la materia prima para la obtención de extracto de cochinilla <<carmin>> y ácido carmínico en el año 1825 los señores Juan Mengliorini y Santiago de la Cruz, publicaron una memoria sobre el nopal y la cría de la cochinilla de América. Progresivamente, se ha aumentado el cultivo en todas las regiones con resultados muy positivos, por el alto poder de la propagación de este insecto.

2.2.2. Desove de la cochinilla

La primera semillación se hace en los meses de marzo, abril o mayo, y después empiezan a desovar de los setenta y cinco a los noventa días de nacidas, y en los meses más fríos, de los noventa y cinco a los ciento quince de nacidas. Hecha la semillación se recogen y se las mata a las madres, (que es la cochinilla preferida); colocándolas a dos pulgadas de espesor dentro de grandes bandejas de latas o barro, en estufa u horno calentado a 55 grados centígrados.

2.2.3. Crianza y recolección de la cochinilla

La recolección de la cochinilla de las tuneras para cualquier uso, es a los tres meses, época que comienza a desovar, y están listas para su recolección. Si el insecto que va a recogerse es el plantado en la primera siembra de mayo o junio, conviene dejarle desovar completamente quitando tan sólo las madres de las paletas que están muy pobladas, a fin de que éstas no se sequen y puedan alimentar bien la nueva cría. Más, si el invierno ha comenzado, y la cochinilla que se halla desovando es la de segunda cría, debe recogerse toda ella, después de un ligero desove que sea suficiente para conservar la semilla en los nopales durante de la estación lluviosa.

2.2.4. Método de secado de la cochinilla

No hay otro método para secar la grana que el de matarla en hornos, exponiéndola después al sol o al aire libre. Para realizar esta operación se coloca la cochinilla en bandejas de barro, cuidando que no quede amontonada, se prefiere hacer el secado en horno.

2.2.5. Producción. Climas

La cochinilla en las regiones de costa y sierra a temperaturas entre 14 y 27°C. Humedad relativa de 55 a 85% y una precipitación pluvial de 400 a 800 mm/año. Los principales factores que influyen en la producción de cochinilla son:

La insolación o luminosidad: La cochinilla tiene clara tendencia a fijarse en las superficies de menor insolación. Fuertes vientos provoca el desprendimiento de la cochinilla, por lo que es necesario instalar cortinas rompevientos; vientos moderados favorecen la infestación, lluvias fuertes ocasionan el desprendimiento de la cochinilla. A mayor temperatura y menor

humedad relativa, se acelera el desarrollo de la cochinilla, (Francis, 1987).

2.3. Características biológicas del *Dactilopius coccus* (cochinilla)

La cochinilla es un insecto hemíptero, de la familia de los cóccidos, del tamaño de una chinche de México. Vive sobre nopal o tunera (tuna común) y reducido a polvo se emplea como colorante en la industria textil, farmacológica, helados, bebidas alcohólicas, yogur, etc. Se siembra en nidos que contengan 8 o 10 madres, en estado de desove, procurando que si siembra en los nopales sea uniforme y que no queden amontonadas ni se estropeen. Después de 3 días de nacido el insecto clava su pico en la tunera, dispositivo chupador localizado en la parte inferior de su cabeza, y que le sirve para alimentarse. Allí permanece unido hasta su muerte; de modo que si por alguna causa se desprende, no vuelve a agarrarse y perece. Pasado un mes de nacido el insecto forman unos capullitos que parecen de algodón, de las que salen unas pequeñas moscas con dos alas blancas que vienen a ser los machos. Estos en nuestro concepto, no son necesarias para la fecundación en todas las generaciones; a pesar de que se cree generalmente lo contrario; pues repetidas observaciones que la hembra de soba sin la concurrencia del macho en la cochinilla se verifica la fecundación como en los pulgones sin que sea necesario el macho en todas las generaciones, entendiéndose la influencia de unas fecundaciones primitivas a muchas generaciones sucesivas. Aislado, las hembras se obtienen en un año hasta tres generaciones. La cochinilla desde que nace hasta que empieza a desovar emplea ochenta y cinco días, este periodo es más corto en verano que en invierno. Lo mismo se observa en los parajes cálidos, en donde crece más pronto que en los fríos. Su larva aparece en los nopales por la primavera, y se nutre de ella durante toda su vida. El mejor medio para

ayudarlo es limpiar las tuneras de las piedras y malezas en donde se abrigan (Márquez, 2002).

2.4. Propagación. Características Biológicas

El ciclo vital del animal macho oscila entre 51-63 días, desde la postura del huevo hasta su adultez, periodo en que se realiza su función procreadora. Por cada macho existe entre 150 y 200 hembras adultas. La hembra tiene un ciclo vital de 89-136 días desde la postura del huevo hasta su estado adulto. La infestación de la tuna puede ser: natural o inducida. La infestación natural: Las pencas son infestadas en forma natural inducidas por el viento y producidas por las ninfas migrantes que se trasladan por si solas entre planta y planta. Infestación Artificial: Consiste en infestar hembras adultas en ovoposición sobre pencas de las tunas. Las infestaciones más conocidas son por el método de las bolsitas de tul o el método de la gasa, método del tarrito de lata y método de bandeja. La infestación artificial se recomienda efectuarla en el mes de abril luego de la época de lluvias para la sierra, para la costa puede efectuarse durante todo el año.

2.2.4. Grados de Infestación. Cosecha

De acuerdo al estado de madurez de las cochinillas hembras, la recolección se realiza todo el año, siendo la época más apropiada los meses de marzo a diciembre. Anualmente se realiza 3 cosechas, aunque hay productores que la realizan cada 60 días, dependiendo del manejo que se da a la planta. La recolección se hace usando unos cepillos especiales y se realiza cuando a hembra adulta ha llegado a medir 7 mm de longitud por 6 mm de ancho.

2.4.2. Técnica de muerte de la cochinilla

La calidad de colorante a obtenerse, depende de la técnica de muerte y secado de la cochinilla. La matanza se realiza en bandejas de calamina: Bandeja cubierta con plástico y expuesto al sol durante aproximadamente 2 horas, la muerte es por asfixia y sofocación, se obtiene producto plateado.

2.4.3. Matanza en Bolsa

Se emplean bolsas de plástico de color negro expuestas al sol y herméticamente cerradas, en pocos minutos se obtiene un producto plateado de buena calidad.

2.4.4. Secado Post cosecha

Secado de la cochinilla: Existen los métodos del secado al sol (6 a 8 días), secado a la sombra (18-20 días) o secado al horno (8 horas) (Valdivia, 2002).

2.5. Ácido carmínico, el colorante natural más ecológico

Con esto de la alimentación sana, cada vez que vemos algo con colorantes nos asustamos. Y no es para tanto. Sobre todo, si el origen de estos tintes es natural. Muy especialmente, si se trata del carmín procedente del *Dactylopius coccus* (cochinilla). La cochinilla es un blanco y regordete pulgón procedente de México y Perú. Animal parásito, para vivir necesita plantas del género *Opuntia*, las conocidas como chumberas, tuneras o higos. Hace 2000 años, ya se usaba en América para teñir vestidos y dar color a la comida. En el siglo XVI los españoles la introdujeron en Canarias. La aparición de los colorantes artificiales dio al traste con este comercio. Pero la reciente prohibición o limitación para su uso ha vuelto a dar alas a una actividad que, en la actividad tintorial. La gran mayoría de colorantes químicos sintéticos, utilizados hasta la fecha, en el estudio biodinámico de los órganos, con

la finalidad de determinar la afinidad de los elementos de un tejido vegetal o animal a cierto colorante para observar su constitución estructural, siguen usándose los colorantes sintéticos, sustancias químicas tóxicas para la salud del profesional que las manipula, que impurifican el medio ambiente, además, de tener costos económicos elevados. Por estas razones, por las recientes prohibiciones o limitación que han dado a los colorantes sintéticos en determinadas actividades, han vuelto a dar alas a los colorantes naturales, en este caso al ácido carmínico obtenido de la cochinilla, su principal propiedad radica en su enorme poder colorante, que supera indiscutiblemente al de cualquier otro, no es tóxico, es completamente inofensivo, puede ser ingerido por el organismo humano o estar en contacto prolongado con la piel, sin producir el menor efecto tóxico, el carmín y el ácido carmínico obtenido de la cochinilla, son inocuos para el hombre, por lo que se recomienda hoy en día, el uso como colorante natural (Allevi, 1991).

2.6. Cómo identificar células coloreados con Hematoxilina Eosina

El estudiante, que no posee gran experiencia para experimentar cortes teñidos de tejidos animales con microscopio de luz, pero ha visto muchos esquemas de células aisladas, puede creer que la identificación de células en cortes teñidos es fácil. Pero no lo es, tanto como parece. Se plantean unos cuantos problemas que vamos a intentar resolver a medida que se presentan. Selección de un corte adecuado: El primer problema, para un principiante, es el de seleccionar un corte en el cual resulta fácil una descripción oral o escrita de como reconocer las células. Los cortes de diversas partes del cuerpo contienen células de diferentes formas y volúmenes, dispuestas en grupos varios, y es muy difícil enseñar a un principiante cómo localizar las células en dicho corte. Es mucho más difícil identificar células en la descripción de un corte, si este se elige de

manera que la mayor parte de las células sean similares. Esto se logra en un corte de hígado, pues en este órgano el 60 por 100 de las células son del mismo tipo y se hallan dispuestas en forma similar. Comparación del que se ve con las ilustraciones: Para aprender a reconocer fácilmente las células en los cortes, tiene gran importancia poder comparar lo que se ve en el microscopio con las ilustraciones del mismo tejido que se estudian en los libros. Como las células hepáticas son el primer punto a tratar, vamos a presentar varias ilustraciones con su aspecto. Pero primero hemos de comentar dos hechos: 1) por qué motivo se utilizan tan frecuentemente las láminas en blanco y negro, para ilustrar lo que se ve con el microscopio de luz en cortes de H.E. y 2) cuán grande ha de ser una célula, en relación con el campo del corte, para poderla ver con diferentes objetivos y oculares. Por qué figuras en blanco y negro: Aunque hay colorantes muy selectivos para determinados componentes celulares, e interesan ilustraciones de color de los mismos, casi todo lo que se logra con tinción H.E es que la hematoxilina colorea sustancias basófilas en azul-púrpura, y que la eosina tiñe las sustancias acidófilas en rosa o rojo. En ilustraciones, en blanco y negro preparadas de negativos obtenidos por fotografías de cortes H y E con microscopio de luz, el grado de oscuridad observado suele coincidir con la intensidad de tinción con hematoxilina, mientras que los colores grises dependen de la tinción con eosina, o de una tinción más clara con hematoxilina. Como las ilustraciones de color son muy caras, sólo lo empleamos con fines especiales; esta práctica la siguen también las diversas publicaciones que consultara el lector. Además, no hay colores en cortes fotográficos con microscopio electrónico, de manera que las microfotografías electrónicas siempre son en blanco y negro (Genecer, 2000).

2.7. Particularidad tintorial

La particularidad tintorial para observar al microscopio los elementos biológicos que conforman los tejidos de un órgano (células, fibras,

sustancias proteicas, grasa, glucógeno, etc.), es que cada componente estructural del tejido, capta diversamente un determinado colorante. Los componentes celulares y tisulares necesitan de un colorante específico, basado en la composición química de lo cual están constituidos. La cápsula del riñón, los límites celulares, tienen afinidad a la Hematoxilina Eosina, la hematoxilina colorea sustancias basófilas de un color azul-púrpura, y a las células y tejido conectivo de un color rosa. La hematoxilina férrica, colorea de marrón sangre a la cápsula de Glisson, espacios interlobulares. El colorante Hemalumbre-eosina, muestra a las fibras elásticas y límites de los vasos sanguíneos y del espacio portal de un color azul claro. El colorante Impregnación Argéntica de Golgi, colorea al estroma (fibras reticulares del conectivo) y límites celulares de los cordones hepáticos de un color marrón oscuro (Prieto Motta, 1998).

2.8. Colorantes especiales

En los trabajos de histología de exploración microscópica empleando diferentes colorantes básicos y ácidos, ciertas estructuras microscópicas de las células o de los tejidos, apetecen por ciertos colorantes especiales, a esta afinidad exclusiva por tal colorante se denomina colorantes selectivos para determinados componentes celulares, por ejemplo, las fibras del tejido conectivo específicamente las reticulares se las observa utilizando nitrato de plata, las fibras elásticas se las observa utilizando la coloración hematoxilina-orceína. Existen colorantes tricrómico, no porque se emplean tres colorantes, sino que, el detalle histológico se observa de tres colorantes diferentes. Los principales productos químicos que intervienen en la estructura y metabolismo de las células son proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. El citoplasma de las células, está conformado principalmente por proteínas. Las proteínas actúan como ácidos o bases, porque son anfóteras (amfo, ambos). Si los líquidos

corporales tienden a volverse ácidos, las proteínas actúan como bases. Las proteínas pueden actuar en uno u otro sentido porque los aminoácidos de los cuales están formadas tienen cadenas naturales, algunas de las cuales son donadoras de H⁺ cuando el pH sube, y otras que pueden combinarse con H⁺ cuando el pH disminuye. Muchas proteínas del cuerpo, incluyendo las del citoplasma de las células (hepáticas), en el pH usual en el cual se efectúa la tinción tienen suficientes grupos básicos (cargados positivamente) en sus cadenas laterales para combinarse con colorantes ácidos, como la eosina que, claro está tienen su color en sus aniones (partes cargadas relativamente); por lo tanto, la proteína del citoplasma se colorea de rosa o rojo con eosina. La proteína de los glóbulos rojos (hemoglobina) y de la células musculares también fijan eosina y, por lo tanto, que el citoplasma de las células hepáticas es de color rosa o rojo en un corte de hematoxilina-eosina (Bartolos, 2004).

2.9. Artefactos en los cortes de tejidos

Para comprender los artefactos, hay que tener presente que en la preparación de un corte cada una de las etapas brinda oportunidad para que ocurra algo que haga menos perfecto el producto final. Los artefactos no son el resultado de algo que ha ocurrido en el tejido durante la vida, sino de alteraciones posteriores, por manipulación humana al preparar los cortes. Retracción: Los diferentes productos químicos con los cuales se trata el tejido, o el calor de la parafina fundida, pueden causar retracción. En consecuencia, porciones de tejidos, que en vida eran vecinos, pueden separarse una de otra. Eliminación incompleta del fijador: A veces el fijador no queda completamente eliminado de los tejidos, y hay cristales del mismo que precipitan en los cortes. El aspecto de cualquier otro material extra añadido durante la preparación del corte es algo similar, pero depende, claro está, de la naturaleza del material. Arrugas y pliegues: Los cortes

de parafina son tan delgados que no es raro que se arruguen o se doblen al cortarlo, y a veces estas pequeñas arrugas no pueden hacerse desaparecer completamente al montar el corte sobre una laminilla. En tal caso se observan en el corte un tejido desigual (Ulrich, 2014).

2.10. Anatomía de riñón

Los riñones de la oveja anatómicamente están formados por una cápsula conectiva que los envuelve, subyacente a la cápsula se encuentra el tejido de la corteza conformada por corpúsculos renales de las nefronas, de esta, parte el sistema tubular de las nefronas para constituir la médula. En una sección horizontal, el riñón de la oveja se observa la corteza, médula, cresta renal, pelvis renal, uréter. Los riñones de la oveja no tienen lobulaciones superficiales y tienen la forma de haba. El órgano presenta una forma elíptica, con las partes convexas dorsal y ventral y las extremidades redondeadas; su longitud es de 75 cm, con un ancho de 5 cm y un grosor de 3 cm. Normalmente, está inmerso en una cápsula adiposa. En cuanto a la posición recuerdan la del vacuno, excepto que el riñón derecho está ligeramente más caudal y asienta ventral a las primeras tres apófisis transversas lumbares. El peso medio de cada riñón es de uno 100 a 125 g. El hilio está en la mitad del borde medial; es más profundo en la oveja que en la cabra. Existe una cresta renal o papila común formada por la fusión de 12 a 16 pirámides en la oveja y de 10 en la cabra. Existe también una pelvis renal. Las venas satélites del hilio del riñón, en los pequeños rumiantes, sirven para distinguir estas especies del perro. El hilio es el equivalente al hilio y seno del riñón del riñón derecho, es una cavidad elíptica extensa, en el izquierdo, es una fisura más profunda. El uréter comienza en la unión de los dos túbulo, en los llamados cálices mayores; el cáliz craneal, normalmente, es mayor. Cada cáliz proporciona un número de ramas y éstas se dividen en varios cálices

menores en forma de abanico, cada uno de los cuales incluye una papila renal. El espacio que no está ocupado por los cálices y vasos está lleno de grasa. Si se practica una sección a través del riñón se observan con gran facilidad las pirámides renales. El vértice agudo de cada pirámide, la papila renal, se proyecta dentro de un cáliz menor. Cada papila está compuesta de pequeños orificios, por lo que se abren los conductos papilares al cáliz. Las columnas renales e distinguen mejor que en el caballo (Sisson y Grossman, 1999).

2.11. Histología del riñón

El riñón es una glándula tubular compuesta de túbulos uriníferos, se divide en lóbulos y lobulillos, en algunas especies hay un solo lóbulo (hombre, rumiantes pequeños), en otros las lobulaciones pueden persistir o puede existir una fusión secundaria (rumiantes). Un lóbulo consta de componentes corticales y medulares. La porción medular tiene una pirámide, cuya base ancha está en contacto con la corteza. Una o más pirámides se pueden unir para formar una papila, la porción apical y redondeada de la pirámide o pirámides que se proyecta dentro del cáliz menor. La punta de la papila es fenestrada (área cribosa), las perforaciones corresponden a las aberturas de los túbulos uriníferos en los cálices o la pelvis renal. Una papila se proyecta en un cáliz menor, los cálices son continuos en la pelvis renal. Los riñones unilobulares o unipiramidales son característicos de los carnívoros, pequeños rumiantes y caballos. El riñón tiene un solo lóbulo originado de la fusión de varios lóbulos durante el desarrollo. Una papila única de base amplia forma la cresta renal que está en relación íntima con la porción expandida del uréter en la pelvis renal. El túbulo urinífero del riñón consiste de una neurona y un sistema de conductos colectores. La neurona es la porción del lóbulo urinífero que produce orina y consta de cápsula de Bowman, túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal. El glomérulo, red de capilares arteriales y la

cápsula de Bowman forma el corpúsculo renal. El sistema de túbulos colectores, que colecta, concentra y transporta la orina, consta de túbulos colectores arqueados, túbulos colectores rectos, y conductos papilares de Bellini (Banks, 1996).

2.12. Técnicas de coloración

Los componentes celulares tienen una densidad óptica muy similar. Es la densidad óptica de cada estructura atravesada por la luz que disminuye la amplitud de luz que le atraviesa. Las densidades ópticas de diversas estructuras situadas dentro de una célula son muy similares, de manera que todos se afectan por igual por la amplitud de la luz que las atraviesa. Por lo tanto, estas estructuras no se observan más claras o más oscuras que otras, y no pueden distinguirse. La forma más frecuente de resolver este problema es tratar con colorantes los cortes de tejidos fijados previamente en una solución bufferada. Estos colorantes se combinan en forma desigual con diversos componentes de células de tejidos, por lo tanto, crean cambios relativos de densidad óptica y de color, de manera que pueden distinguirse unos de otros. De manera que, existen afinidad distinta entre los componentes estructurales de los tejidos, por ejemplo, los colorantes ácidos tiñen de rosa al citoplasma de las células, pero los colorantes básicos como la hematoxilina en un corte se distinguen a los núcleos de color azul brillante. Pero en estudios de investigación muchas veces resulta importante poder estudiar células vivas frescas situadas en soluciones nutritivas, incluso registrar sus movimientos y su conducta mediante cinematografía. Esto puede lograrse mediante la observación de microscopio de fase. Artefactos: Para comprender los artefactos hay que tener presente que en la preparación de un corte cada una de las etapas brinda oportunidad para que ocurra algo que haga menos perfecto el producto final. Los artefactos no son el resultado de algo que ha ocurrido en el tejido durante la vida, sino de

alteraciones posteriores, por manipulación humana al preparar los cortes (Ham, 1998).

2.13. Afinidad de los colorantes

La selección de un corte adecuado, para observar detalles estructurales de las células y de los tejidos cuando están trabajados con colorantes ácidos y básicos, se recomienda, en este caso, probar determinado colorante, en órganos, que dentro de su estructura orgánica, los elementos celulares se encuentren juntos y ordenadamente. El riñón el órganos de elección. La mayor parte de las células, son similares, y poseen una distribución también similar. Esto se logra en un corte, pues en estos órganos el 60 por 100 de las células son del mismo tipo y se hallan dispuestas en forma similar. La mayor parte de los colorantes utilizados en histología se clasifican en ácidos y básicos. Sin embargo, no son netamente ácidos o bases, sino sales neutras que se disuelven en agua, en la cual se disocian dando aniones y cationes. Un colorante se denomina ácido o básico cuando el componente que proporcione color este en el anión o en el catión de la sal disociada. Si está en el anión (el radical ácido), el colorante se denomina ácido o aniónico; si está asociado con el catión se denomina básico o catiónico. Cualquier sustancia observada en un corte se llama basófilos si tiene afinidad por un colorante básico. De manera análoga una sustancia se llama acidófila, si capta un colorante ácido. Por lo tanto, las sustancias basófilas son de color azul o púrpura. Se ha comprobado que utilizando dos tinciones, primero de un color y luego otro diferente , se logra más contraste todavía porque un colorante se combina con ciertos componentes celulares, los colorantes ácidos tienen particular efecto con los ácidos nucleicos que se encuentran en el núcleo, pared celular y algunos componentes dentro del citoplasma, determinado una apariencia azulada o púrpura; por otro lado, los demás componentes proteicos , glucógeno, tienen particular efecto de

tinción con los colorantes ácidos , determinando un color rosa o rojo, por lo tanto el motivo que algunos componentes capten un colorante y otros capten otro, informa sobre la naturaleza química del material en que en cada caso se tiña (Alvarado, 2000).

2.14. Uso del colorante Natural Ácido Carmínico en tejidos de hígado de ovino

En el trabajo de tesis para obtener el Título Profesional de Médico Veterinario, titulada "Uso del colorante natural Carmín-Ácido Carmínico, obtenido del *Dactylopius coccus (cochinilla)*, en la Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina, en tejidos de hígado de Ovino-Cajamarca", utilizando el ácido carmínico en reemplazo de la hematoxilina, los resultados obtenidos muestran que los núcleos de las células del hígado , como los núcleos de las células endoteliales de los vasos sanguíneos situados dentro de los tejidos del parénquima y estroma del hígado, tienen afinidad por el colorante. El tejido conectivo de la cápsula de Glisson, y de las trabéculas del estroma, no tienen afinidad al colorante. En los criterios cualitativos para evaluar la afinidad de los colorantes en los elementos estructurales de los vasos sanguíneos lo califica como regular, por no encontrar contraste de coloración. Además dicho autor, recomienda realizar trabajos similares utilizando el ácido carmínico a una mayor concentración y realizar dicha investigación en otros órganos (Velásquez, 2015).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El estudio se realizó en el Laboratorio de Embriología e Histología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca. La microtomía, la coloración y el montaje de las láminas se llevó a cabo en el Laboratorio de Histología de SENASA-Lima.

Datos Meteorológicos (*)

Temperatura Promedio Anual	14.9°C
Temperatura Mínima Promedio Anual	10.8° C
Temperatura Máxima Promedio Anual	21.3° C
Precipitación Pluvial Anual	878.5 mm
Humedad relativa	64.1 %

(*) Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología- Cajamarca-2016.

3.2. MATERIALES

3.3.1. Material biológico

10 muestras de tejido de riñón de ovino.

3.3.2. Equipos

Microscopio compuesto de luz incorporada.

Microscopio compuesto con cámara incorporada.

Micrótopo de rotación.

Refrigeradora.

Estufa.

Baño María.

3.3.3. Material de laboratorio

Mortero.

Tamiz (malla metálica de 1/16”).

Láminas porta y cubre objetos.

3.3.4. Reactivos

Alcohol etílico.

Xileno.

Formaldehído.

Ácido carmínico.

Bálsamo de Canadá.

3.3. METODOLOGÍA

3.3.1. Selección de los insectos

En el momento de la cosecha del *Dactylopius coccus* (cochinilla), se seleccionaron a aquellos parásitos adultos que llegaron a medir más de 7 mm de longitud por 6 mm de ancho, medidas que nos indican que el parásito ha llegado a su madurez.

3.3.2. Muerte y secado de los insectos

- Los parásitos seleccionados en el momento de la cosecha, más o menos 250 gramos, se los colocó en bandejas de calamina cubierto con plástico durante 3-5 días, tiempo suficiente para que mueran por asfixia.
- Luego de este tiempo, verificado la muerte de los parásitos, se les quitó la cubierta de plástico y fueron sometidos a deshidratación y secado en las mismas bandejas de calamina por un tiempo de 15 a 25 días. Los parásitos muertos se caracterizan por presentar deshidratación, sin motilidad y envueltos de un polvo blanquecino característico.
- Durante el tiempo de exposición al sol, la cochinilla, fue necesario moverlos continuamente, con mucho cuidado, evitando maltratarlos.
- Al finalizar el procedimiento de sacrificio, se obtuvo un producto plateado de buena calidad.

3.3.3. Obtención del colorante ácido carmínico

- Los insectos sacrificados, deshidratados fueron molidos en mortero hasta obtener un polvo fino homogéneo bien triturado.
- Luego, se realizó el tamizado en mallas metálicas de 1/16", hasta obtener una uniformidad del producto (cochinilla en polvo).
- Se pesó 10 g de cochinilla en polvo, se deposita en un beaker con capacidad para 150 ml, para luego añadirle 100 ml de alcohol etanol absoluto.
- Se mezcló hasta disolver debidamente el polvo (puede ayudarse con calor de mechero a gas).
- Una vez obtenido el colorante ácido carmínico, se le añadió 5 ml de una solución de alumbre como mordiente (solución de alumbre al 5%). El alumbre se disolvió, 5 g de alumbre en 100 cc de agua destilada.
- Las dos soluciones se combinaron hasta su homogenización total.
- Se dejó añejar el colorante hasta su uso (2 meses).
- El producto final, fue una solución de un color azul o púrpura.

3.3.4. Obtención de la muestra de tejido de riñón de ovino en el camal Municipal de Cajamarca

Una vez sacrificados los animales, fueron retirados los riñones para realizar la toma de las muestras en las mesas pos inspección. La toma de las muestras de riñón, fue de un centímetro cúbico, inmediatamente las muestras fueron depositadas en frascos de vidrio que contenían el fijador formaldehído bufferado al 10%.

Las muestras contenidas en el fijador fueron trasladadas al Laboratorio de Embriología e Histología para proseguir con la Técnica de Inclusión en Parafina.

3.3.5. Trabajo de Laboratorio (Embriología e Histología)

Método de Inclusión de Parafina

- Toma de la muestra de tejido renal de ovino de 1 cm³.
- Fijación. Luego de la fijación de las muestras en una solución de formaldehído bufferado al 10%, los bloques de tejido renal se los lavó en agua corriente por 5 a 10 minutos, tiempo necesario para eliminar con agua el exceso del fijador.
- Deshidratación. Seguidamente, fueron sometidas a concentraciones crecientes de alcohol etílico en soluciones de 80°, 95° y alcohol absoluto hasta la deshidratación total.
- Aclaramiento. Efecto de aclaramiento de las muestras con xileno en tres baños de vasos Coplin.
- Inclusión. Las muestras se las incluyó en bloques de parafina diluida, obteniendo tacos de parafina que contendrán las muestras correspondientes. Se las dejó enfriar al aire libre por 24 horas, y para permitir el proceso satisfactorio, luego permanecerán por 72 horas en refrigeración.

3.3.6. Trabajo de Laboratorio SENASA-Lima

- Microtomía. Obteniendo el endurecimiento y enfriamiento de los tacos de parafina, se los montó al Micrótopo de rotación, para obtener rebanadas de tejido a 5 – 8 micras de grosor. Estos cortes se extenderán en Baño María (37°C – 40°C), que previamente contiene gelatina adhesiva. Se recupera el

corte con una lámina portaobjetos, se las deja secar al aire hasta el momento de colorearlas.

- Coloración. Una vez seca la muestra. Se llevó a cabo la coloración con ácido carmínico.
- Montaje. Finalmente, se realizó el montaje, adicionando 1 gota de Bálsamo de Canadá, como pegamento, se coloca una laminilla cubreobjetos, evitando por presión la formación de burbujas de aire.

3.3.7. Procedimiento para determinar la afinidad del colorante natural Ácido carmínico

Tabla 1. Determinar el grado de coloración para evaluar la calidad de tinción del colorante Ácido Carmínico-Eosina (según Velázquez, 2015).

Criterios cualitativos para determinar el grado de coloración.	
Buena	<ul style="list-style-type: none"> *. Buena afinidad de los tejidos del riñón de ovino (Cápsula, corteza y médula) a los colorantes ácidos y básicos (Eosina-Acido carmínico). *. Distribución de los colorantes en forma homogénea. *. Sin presencia de artefactos. *. Nitidez considerable, lo que permite la identificación de las estructuras parenquimatosas y tejido estromal.
Regular	<ul style="list-style-type: none"> *. Moderada afinidad de los tejidos a los colorantes. *. Estructuras histológicas poco coloreadas lo que permite poca visibilidad. *. Coloración opaca en zonas importantes de tejido. *. Presencia de artefactos que altera la coloración.
Mala	<ul style="list-style-type: none"> *. Elementos celulares de la cápsula, corteza y médula renal, no identificables. *. Afinidad de los tejidos a un solo colorante. *. Presencia de artefactos diseminados por gran parte de la muestra.

- ✦ Basofilia. Determinamos la basofilia por observación directa de las láminas según el color que han adoptado los tejidos del riñón:
 - Basofilia, si los núcleos de las células se tiñen de un color azul intenso.
 - Ácidofilia, si las células se tiñen de un color rojo o rosado intenso.

3.4. TRATAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

Para el presente trabajo de investigación los resultados fueron analizados mediante análisis de Estadística Descriptiva.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Tabla 2. Grado de la coloración Acido Carmínico al 10%, sobre los elementos estructurales de los tejidos del riñón de Ovino.

TEJIDOS DEL RIÑÓN	CALIDAD DE LA TINCIÓN		
	BUENA	REGULAR	MALA
Cápsula		<p>+Tejido conectivo capsular (Fig.1) delgado de color rosa con afinidad a la eosina. Las fibras conectivas del tejido capsular no se evidencian claramente.</p> <p>+Se observan los núcleos basófilos de células conectiva de color azul oscuro con afinidad al ácido carmínico.</p>	
Corteza	<p>+Corpúsculo Renal Cortical (Fig.2). Con afinidad al colorante ácido carmínico-eosina. Se observa con claridad la conformación de la cápsula glomerular, conformada por capa parietal y visceral revestida por células planas simples con núcleos basófilos de color azul.</p> <p>+En los Túbulos Contorneados Proximales, se observan revestidos de células cúbicas, con citoplasma de color rosa (acidófilas) a la eosina, con núcleos basófilos de color azul con afinidad al ácido carmínico.</p> <p>+Los vasos sanguíneos corticales (Fig. 3) con afinidad al colorante ácido carmínico-eosina. En el lumen observamos sangre hemolizada de color rojo brillante.</p>		
Médula	<p>+Túbulos renales medulares (Fig.4), corte trasversal y longitudinal. Apreciamos el contraste de coloración. Células cúbicas de citoplasma acidófilo de color rosa con afinidad a la eosina, núcleos basófilos de color azul con afinidad al ácido carmínico.</p> <p>+Capilares medulares con núcleos de células endoteliales basófilas.</p>		
Pelvis renal	<p>+Tejido conectivo de la pelvis renal. Mostrando células adiposa y núcleos de células conectivas con afinidad al ácido carmínico (Fig. 6,7).</p> <p>+Vasos sanguíneos con afinidad al ácido carmínico-eosina.</p> <p>+Arterias medianas y arteriolas con capa macular lisa de color rosa con afinidad al colorante eosina (Fig. 6,7).</p> <p>+Núcleos de célula endoteliales de color azul con afinidad al colorante ácido carmínico.</p>		

4.2. Resultados de detalles histológicos de tejidos de riñón de ovino, donde podemos observar la basofilia, luego de ser sometidos al colorante ácido carmínico al 10%

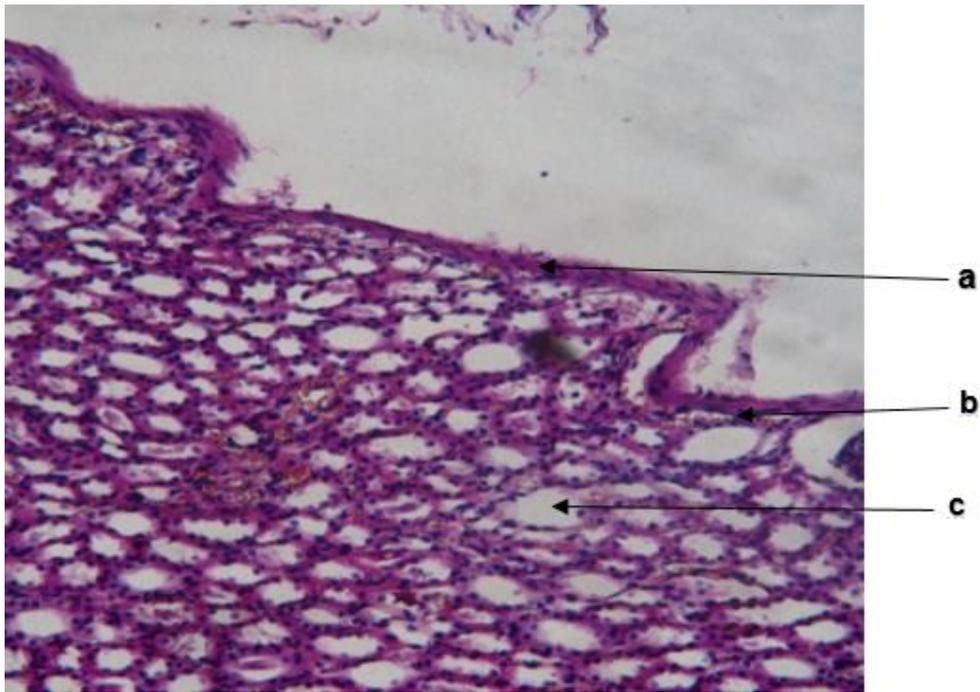


Fig. 1. Cápsula Renal de Ovino. **(a)** Tejido conectivo capsular delgado de color rosado oscuro, con afinidad al colorante eosina. **(b)** Núcleos basófilos de células conectivas de color azul oscuro con afinidad al colorante ácido carmínico. **(c)** Tejido de la corteza renal formado por túbulos renales corte transversal con núcleo basófilos del epitelio de revestimiento con afinidad al colorante ácido carmínico. 100 X.

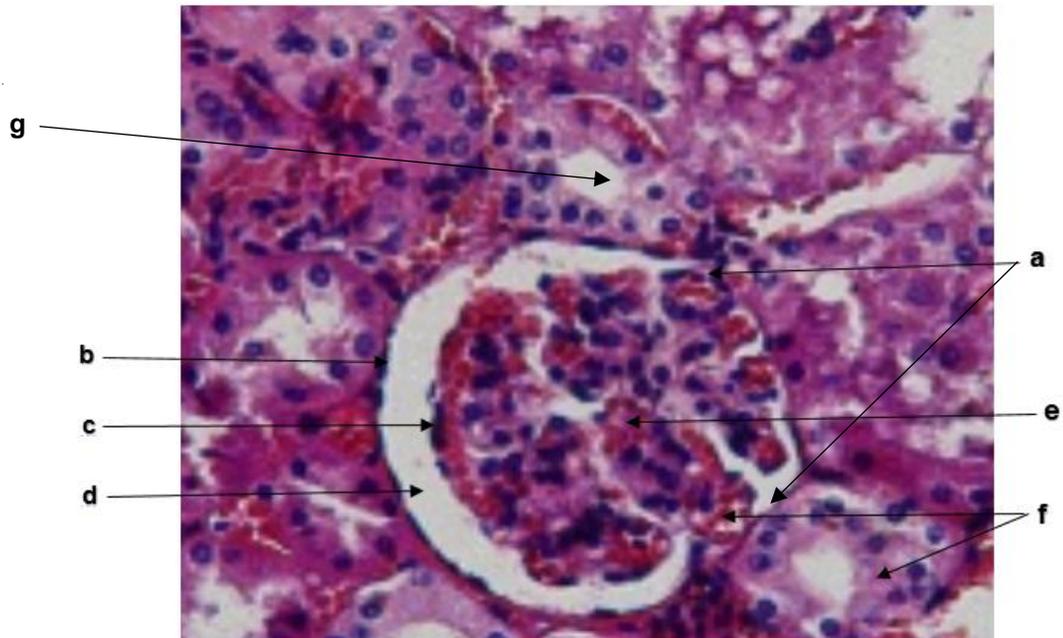


Fig. 2. Corteza Renal de Ovino. **(a)** Corpúsculo renal. **(b)** Cápsula glomerular, Capa parietal y visceral del corpúsculo renal, revestidas de un epitelio plano simple, se aprecian los núcleos de las células epiteliales con afinidad al colorante ácido carmínico de un color azul (basofilia). **(c)** Entre las dos capas de la cápsula glomerular observamos al espacio glomerular sin coloración aparente. **(d)** Cono urinífero corpuscular junto a un túbulo contorneado proximal revertido de un epitelio cúbico simple de células con citoplasma acidófilo con núcleos basófilos con afinidad al ácido carmínico. **(e)** Ovillo glomerular **(f, g)** Cono urinífero, polo urinario. 100 X.

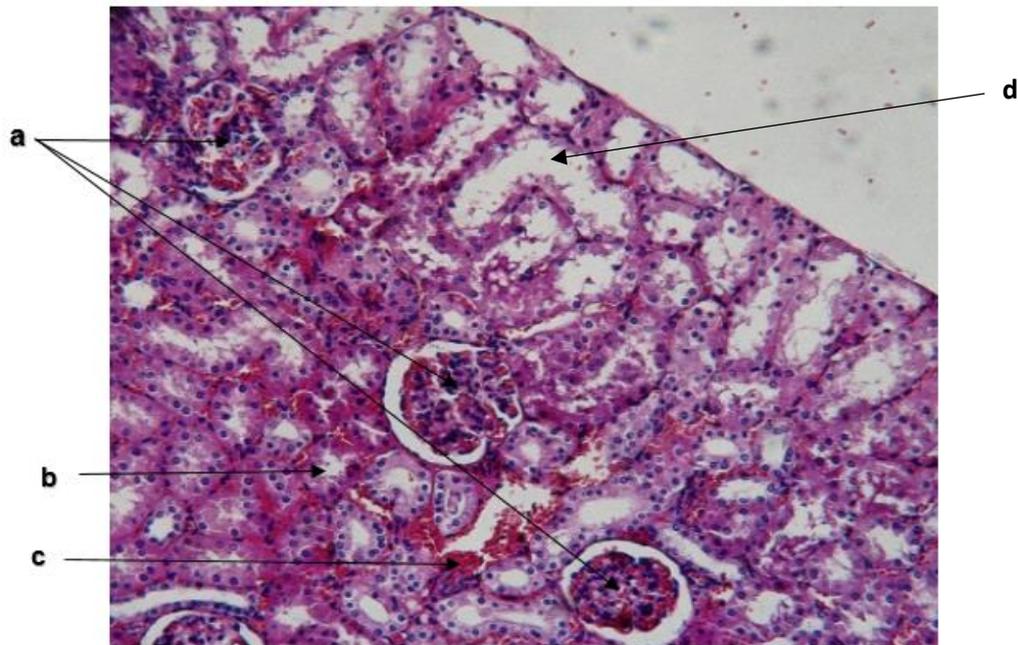


Fig. 3. Corteza Renal de Ovino. **(a)** Glomérulos renales con afinidad a los colorantes ácido carmínico que muestra una basófila de color azul, y a la eosina que muestra una acidofilia de color rosa. **(b)** El parénquima cortical con gran cantidad de túbulos renales (corte transversal), revestidos por un epitelio cúbico simple con citoplasma acidófilo de color rosa y núcleos basófilos de color azul brillante. **(c)** Vena de la corteza renal con tejido sanguíneo, con afinidad a la eosina de color rojo. **(d)** Túbulos renales corticales. 100 X.

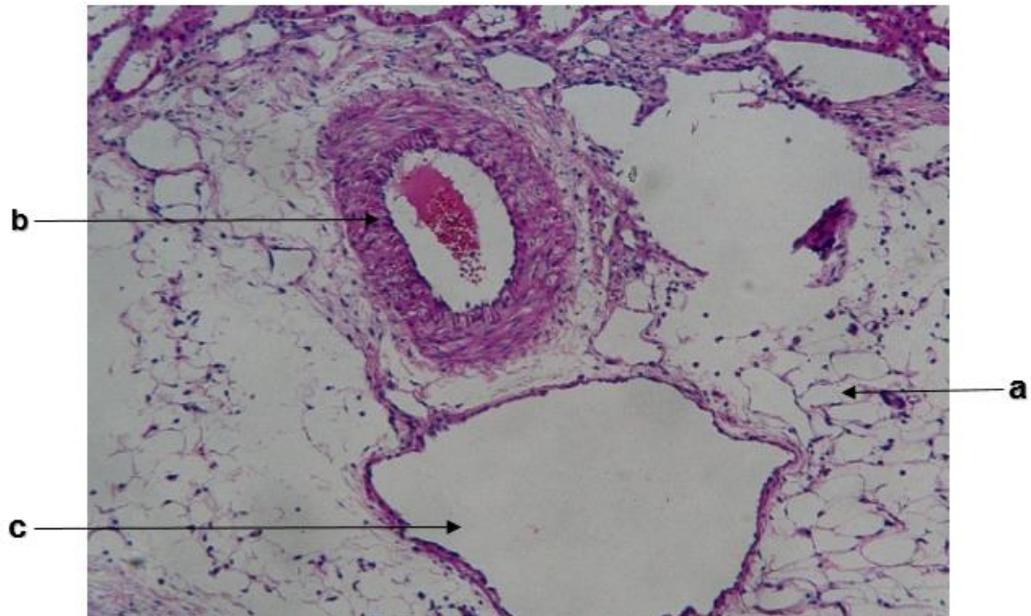


Fig. 4. Pelvis renal de Ovino. **(a)** Tejido conectivo de la pelvis renal. Muestra tejido adiposo con presencia de células conectiva, con núcleos basófilos de color azul intenso. **(b)** Rama de la artería mediana de tipo muscular, se aprecia los núcleos de las células endoteliales con afinidad a colorante ácido carmínico de color azul, la capa media muscular con afinidad a la eosina de color rosa. **(c)** Vena renal, de pared delgada y luz amplia, revestida de células endoteliales basófilas. 100 X.

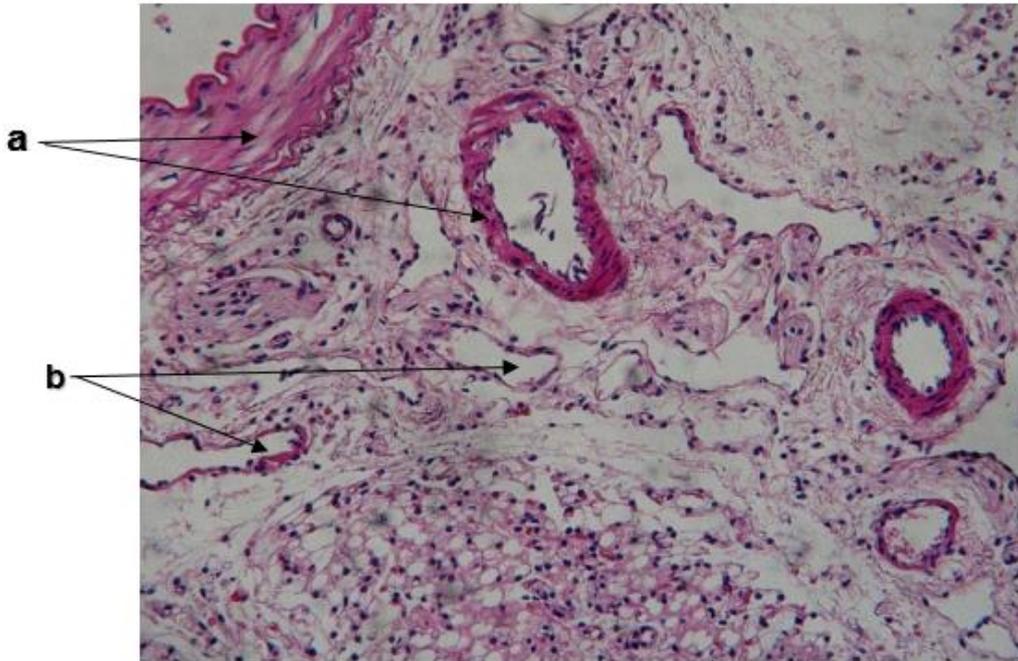


Fig. 5. Detalle histológico de la afinidad al colorante Ácido Carmínico-Eosina de los componentes estructurales de los vasos sanguíneos renales de ovino. **(a)** Arterias medianas musculares, con núcleos de las células endoteliales con afinidad al colorante ácido carmínico de color azul, las capas musculares lisas con afinidad a la colorante eosina de color rosa. **b)** Pequeñas venas que muestran la misma afinidad al colorante ácido carmínico-eosina, arteriola. 100 X.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En la realización del presente estudio, para mostrar la afinidad de los elementos estructurales del riñón de ovino con la técnica de coloración Ácido Carmínico al 10%-Eosina, se creyó por conveniente trabajar en riñón de ovino, por ser un órgano parenquimatoso, macizo y compacto, donde su constitución se encuentra organizada. Razones que compartimos con, Alvarado (2000), al referir que para probar una técnica de coloración ácido-básica, debe de realizarse preferentemente el estudio en órganos compactos, (hígado, riñón) donde sus estructuras que lo conforman se encuentren juntas y ordenadas. Por estas consideraciones, trabajamos en riñón, en donde la mayor parte de elementos celulares y elementos del tejido conectivo son similares, y poseen una distribución también similar.

En la Tabla 2, se muestra la recopilación de los hallazgos histológicos, la afinidad tintorial de los tejidos de riñón de ovino (Cápsula, corteza, médula, pelvis renal y vasos sanguíneos) al colorante Acido Carmínico al 10%-Eosina. En la Fig. 1, observamos los tejidos de la cápsula renal de tejido conectivo con afinidad a los colorantes ácido carmínico y a la eosina, esparcidos sobre ella, núcleos de células conectivas basófilos que muestra afinidad al colorante ácido carmínico. En la cápsula no se detalla la distribución de las fibras conectivas elásticas, por tener éstas, afinidad a colorantes especiales; al respecto, Prieto Motta, (1998), determina que cada componente estructural de un tejido necesita de un colorante específico, ácido o básico, basado en la composición química del tejido. El conectivo, tiene mayormente afinidad a la Eosina. El ácido carmínico como colorante

básico, tiene afinidad a los ácidos nucleicos y colorea a los núcleos celulares de un color azul-púrpura.

En las Figs. 2, 3 y 4. Observamos los elementos parenquimatosos y vasos sanguíneos del riñón, en cuyos detalles histológicos existe contraste de coloración, el citoplasma de las células cúbicas del revestimiento de los túbulo renales se muestra de color rosa con afinidad a la eosina (acidofilia), mientras que los núcleos de las células cúbicas y los núcleos de las células planas endoteliales tienen afinidad al ácido carmínico mostrando un color azul púrpura (basofilia). Consideraciones que compartimos con Ham (1998), al referir que todos los componentes de un tejido tienen afinidad distinta, porque individualmente químicamente son distintos, de igual manera manifiesta que los colorantes ácidos (eosina), tiñen al citoplasma celular de un color rosa o rosa brillante, en cambio, los colorantes básicos de un color azul o púrpura por afinidad a los ácidos nucleicos.

En la Fig. 5, observamos túbulos renales medulares (corte longitudinal), y el tejido intersticial lleno de una gran cantidad de células inflamatorias (nefritis intersticial), todas ellas de un color azul púrpura con afinidad al ácido carmínico.

Los elementos estructurales de los vasos sanguíneos, se detallan en las Figs 6 y 7, observamos que si existe contraste de coloración, así mismo, dentro de los criterios cualitativos para evaluar la calidad de tinción, se calificó como buena. Observándose que cada constitutivo estructural de los vasos sanguíneos tienen diferente apetencia tintorial. La pared muscular de las arterias medianas y arteriolas se tiñen de un color rosa con afinidad a la eosina, en tanto, los núcleos de las células planas endoteliales se muestran de un color azul púrpura con afinidad al ácido carmínico. Velásquez (2015), utilizando la técnica de tinción ácido carmínico al 5%-Eosina en tejido de hígado de ovino, no encuentra contraste de coloración y solo reporta que los vasos sanguíneos se encuentran revestidos de células endoteliales con núcleos basófilos. Dentro de los criterios cualitativos para evaluar la calidad de la tinción lo considera como mala.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- 6.1. El ácido Carmínico al 10%, empleado en reemplazo de la hematoxilina, en la técnica de coloración Hematoxilina-Eosina, brinda buena afinidad de los tejidos del riñón de ovino comprobándose una nitidez considerable, lo que permite la identificación de las estructuras parenquimatosas, tejido estromal y vasos sanguíneos.
- 6.2. El ácido carmínico al 10%, se comporta como colorante basófilo reemplazando a la hematoxilina en la técnica de coloración hematoxilina-eosina.

CAPÍTULO VII

REFERENCIAS

Alvarado, I. 2000. Histología Veterinaria 23ava Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España .pp 274-280. (Internet) 22 de Noviembre del 2015. (Disponible) <http://www.nonografías.com/trabajos/estorago-cerdo>.

Allevi, P. 1991. The 1st Total Synthesis of Carminic Acid. Journal of the Chemical Society-Chemical Communications 18:1319-1320. Resumen Científico. (Internet) 20 junio del 2015. (Disponible) http://www.lajoyaeximport.com/cochinilla_cochineal.html

Bancks. 1996. Histología Veterinaria Aplicada. Segunda Edición. Editorial Manual Moderno México. p. p. 480. (Internet) 12 de octubre del 2015. (Disponible) <http://ciartsbijengronen.nl/histología-veterinaria-aplicada-Bancks.htm>

Bartolo, R. 2004. Histología. Primera Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires. Argentina.

Ham, Arthur. 1998. Tratado de Histología. Novena Edición. Editorial Interamericana. Caracas Venezuela pp. 935. (Internet) 10 octubre del 2015. (Disponible) <http://listado.Libros-ciencias-médicas-naturales/tratado-de-histología-Artur-w-ham>

Francis, F. 1987. Cochinilla. Descripción y Características. Lesser-Known food colorante. Food Tecnolo. (Internet) 22 de junio 2015). (Disponible) <https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cidocarm%C3%ADnico>.

Márquez, M. 2002. Estudio Económico Productivo del Perú. Cría, y Producción de la cochinilla. Perú. (Internet). 20 enero del 2015. (Disponible)

http://es.wikipedia.org/Dactylopius_coccus

Genecer, F. 2000. Histología Sobre bases biomoleculares. Tercera Edición. Editorial Interamericana. Madrid España. p.p. 814. (Internet). 22 de junio del 2015. (Disponible).

<http://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/4146/Histologia.html>

Prieto, Motta. 1998. Histological Methods. Theory and Practice. Bloxham, UK: Secion. ISBN 9781904842422. (Internet). 23 de Noviembre del 2015. (Disponible)

<http://hatml.rincondelvago.com.textilcoloración-hemtoxilina-eosina-html>

Sisson y Grossman. 1999. Anatomía de los Animales Domésticos. Quinta Edición. Editorial SALVAT EDITORES S. A. Barcelona España. (Internet). 13 de mayo del 2015. Pp. 2203. (Disponible)

[http://books.google.com.p./books/tratado_d_Anatomía Animales Domésticos.](http://books.google.com.p./books/tratado_d_Anatomía_Animales_Domésticos)

Ulrich, W. 2014. Histología Con la colaboración de Thomas Deller. Tercera Edición. Editorial Sobotta. Cedro 512 México. pp. 593. (Internet) 14 de mayo del 2015. (Disponible)

<http://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/5122/eBook-Sobotta-Histologia.html>

Valdivia, R. 2002 Cochinilla. Revista Científica. Sembrío y Producción. Lima Perú. . (Internet). 10 Octubre del 2015. (Disponible)

http://es.wikipedia.org/Dactylopius_coccus

Velásquez, C. 2015. Uso del colorante natural Carmín-Acido Carmínico 5%, obtenido de la Cochinilla (*Dactylopius coccus*), en la Técnica de Coloración Hematoxilina Eosina, en Tejidos de Hígado de Ovino-Cajamarca. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Cajamarca.

ANEXO

TESTIMONIO FOTOGRÁFICOS QUE MUESTRAN LOS PASOS DE LA METODOLOGÍA.



Fig. 6. Cosecha. Selección de los parásitos de Cochinilla (*Dactylopius coccus*).



Fig. 7. Selección de los parásitos *Dactylopius coccus*, para someterlo al proceso de matanza por asfixia.



Fig. 8. La fuente de aluminio que contiene a los parásitos *Dactylopius coccus*, es cubierta con plástico durante 48 horas, hasta la muerte por asfixia.



Fig. 9. Muertos los parásitos, se está procediendo a la deshidratación y secado por 25 días.

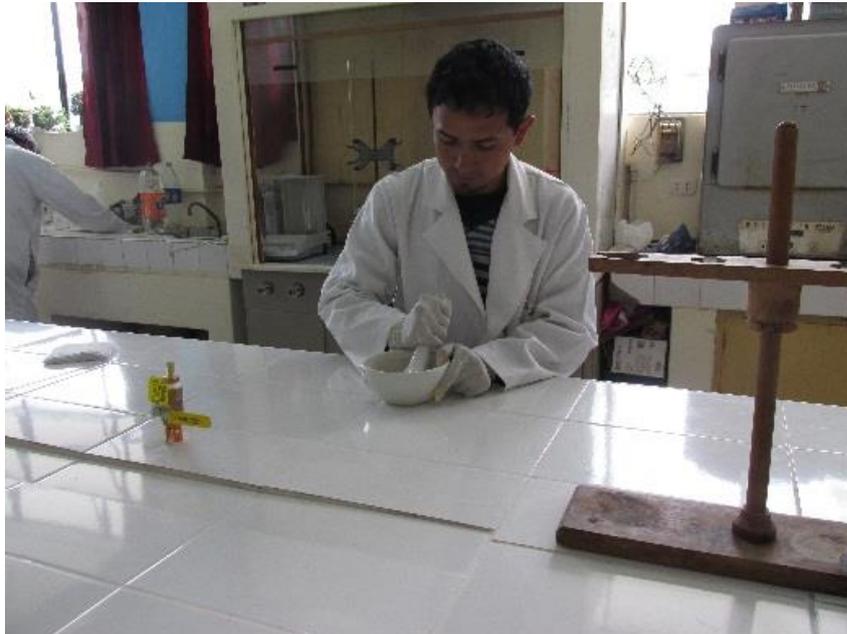


Fig. 10. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca. Proceso de trituración del parásito, *Dactylopius coccus*, (Cochinilla) en mortero para obtener un polvo suave y homogéneo.



Fig. 11. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca. Los parásitos *Dactylopius coccus* (cochinilla), triturados, en polvo se pesó 10 gramos para preparar la solución de ácido carmínico.

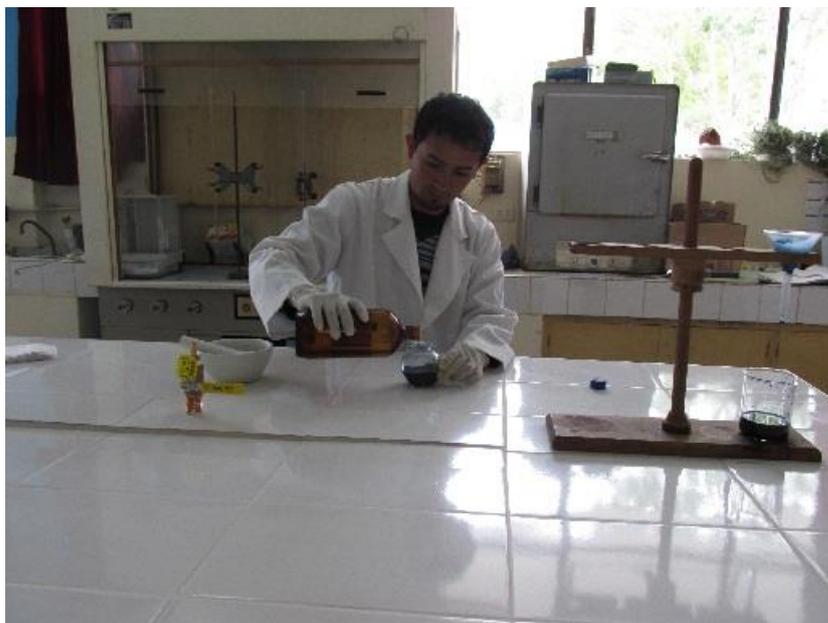


Fig. 12. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca. Los 10 gramos de ácido carmínico en polvo fueron disueltos en 100 ml de alcohol absoluto (etanol).



Fig. 13. Laboratorio de Ciencias Químicas y Dinámicas de la Universidad Nacional de Cajamarca. Los 10 gramos de ácido carmínico en polvo fueron disueltos en 100 ml de alcohol absoluto (etanol).

MÉTODO DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA E HISTOLOGÍA. FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA



Fig. 14. Método de Inclusión en Parafina. **Deshidratación** en alcoholes ascendentes (80°C, 95°C, 95°C, 100° C, 100°C, 100°C)



Fig. 15. Método de Inclusión en Parafina. **Aclaramiento** en 3 baños en Xilol por 3 horas



Fig. 16. Método de Inclusión en Parafina. **Impregnación** en 3 baños en parafina a 60°C



Fig. 17. Método de Inclusión en Parafina. **Inclusión.** Confección de tacos de parafina



Fig. 18. Diagnóstico histológico de láminas montadas. Laboratorio de Biología. Facultad de Educación.



Fig. 19. Laboratorio de Biología. Facultad de Educación. Microfotografía.

Tabla 3. Descripción General de los 10 Ovinos Sometidos al Estudio

Ovino	Edad (años)	Sexo	Peso (kg)	Raza
1	2.0	Hembra	14.0	Pelibuey
2	1.5	Hembra	18.5	Mestizo
3	2.0	Hembra	16.0	Mestizo
4	2.0	Macho	22.0	Mestizo
5	3.0	Macho	26.0	Mestizo
6	2.5	Macho	24.0	Mestizo
7	2.0	Macho	21.0	Mestizo
8	3.5	Macho	26.0	Mestizo
9	3.0	Macho	25.0	Mestizo
10	2.0	Macho	20.0	Mestizo

Preparación de Fosfato Bufferado Salino

FBS: 0,15 M CLORURO DE SODIO Y 0,01 M FOSFATO MISHEL, and STANLEY)

1. Dentro de un beaker con capacidad para un litro, se coloca una barra imantada.
2. El beaker es llenado con 800 ml de agua recientemente destilada.
3. Se coloca así el beaker, sobre el plato del agitador magnético, agitando lentamente.
4. Se adiciona 1,194 g de fosfato sódico dibásico anhidro y 0,256 g de fosfato sódico monobásico monohidratado. Se continúa agitando hasta que disuelva (se puede someter a calor si es necesario).
5. Si ha usado calor se espera a que enfríe y se mide el pH en un peachímetro, ajustándolo si es necesario con 1,0 N de hidróxido de sodio, hasta que el pH se encuentre 7,2 y 7,4.

Nota: La preparación del 1,0 N de hidróxido de sodio se hace disolviendo en un beaker con capacidad para 100 ml, 4 g de NaOH en 80 ml de agua destilada, se transfiere esta solución a un frasco volumétrico de 100 ml y agrega 20 ml de agua destilada agitando la solución.

6. Se continúa agitando la solución y se agrega 8,766 g de NaCl esperando que disuelva.
7. Se transfiere la solución hacia un frasco volumétrico de un litro y se adiciona 200 ml de agua destilada agitando constantemente.

SOLUCIÓN DE FORMOL BAFERADO NEUTRAL AL 10 %

Formol 40 %.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml
Fosfato sódico monobásico.....	4 g
Fosfato sódico di básico anhidro.....	65 g

GELATINA ADHESIVA AL. 5%

Gelatina farmacéutica.....	5 g
Agua destilada.....	100 ml

Disolver con ayuda de calor.

Adicionar varios cristales de timol para preservar.

Para uso, mezclar completamente tres cucharaditas de la solución de gelatina al 5% por 1000 ml, en el baño de flotación.

STOCK DE EOSINA ALCOHÓLICA AL 1%.

Eosina (amarillenta), agua soluble.....	1 g
Agua destilada.....	20 ml
Disolver y adicionar	
Alcohol 95%.....	80 ml

SOLUCIÓN DE EOSINA

Stock de eosina alcohólica al 1%..... 1 parte

Alcohol 80%.....3 partes

Justo antes de usar adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial por cada 100 ml de colorante y remover.

ALCOHOL ÁCIDO

Alcohol 70%.....100 ml

Ácido clorhídrico concentrado..... 30 ml

CARBONATO DE LITIO SATURADO AL 1%

Carbonato de litio..... 1 g

Agua destilada.....100 ml

Técnica de Deshidratación, Aclaramiento, Impregnación e Inclusión**DESHIDRATACIÓN**

1. Lavado en aguas corrientes..... 5'-10´
2. Alcohol 80° 1 hora
3. Alcohol 95° 2 horas
4. Alcohol 95° 1 hora
5. Alcohol 100° 1 hora
6. Alcohol 100° 1 hora
7. Alcohol 100° 1 hora

ACLARAMIENTO

8. Xilol..... 1 hora
9. Xilol..... 1 hora
10. Xilol..... 1 hora

IMPREGNACIÓN

11. Parafina 56° - 58° 2 horas
12. Parafina 56° - 58° 2 horas
13. Parafina 56° - 58° 2 horas

INCLUSIÓN

14. confección de tacos.

Técnica de Coloración Ácido carmínico 10% - Eosina

TIEMPO DE DURACIÓN

1. Xilol.....5 minutos.
2. Xilol.....5 minutos.
3. Alcohol absoluto al 100%.....3 minutos.
4. Alcohol absoluto al 100%.....3 minutos.
5. Alcohol absoluto al 95%.....3 minutos.
6. Alcohol absoluto al 95%.....3 minutos.
7. Alcohol absoluto al 70%.....3 minutos.
8. Agua destilada3 -5'
9. Ácido carmínico 10%.....5 -10´
10. Agua destilada 3 -5'
11. Alcohol ácido- enjuagar
12. Agua destilada- enjuagar
13. Carbonato de litio al 1%.....2 minutos.
14. Lavado con agua corriente.....10 minutos.
15. Lavado con agua destilada.....5 minutos.
16. Alcohol absoluto al 70%.....3 minutos.
17. Eosina..... 1- 5´.
18. Alcohol absoluto al 70%.....3 minutos.
19. Alcohol absoluto al 95 %.....2 minutos.
20. Alcohol absoluto al 95 %..... 2 minutos.
21. Alcohol absoluto al 100%..... 2 minutos.
22. Alcohol absoluto al 100%..... 2 minutos.
23. Xilol.....3 minutos.
24. Xilol.....3 minutos.
25. Xilol.....3 minutos.

26. Colocar una gota de Bálsamo de Canadá sobre la lámina portaobjeto y cubrir con la lámina cubreobjetos.