



PROYECTO FIN DE CICLO  
**PROCESADO DE MUESTRAS Y TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA**

Remedios Gutiérrez Cortés | 2ºAP&C – B

## Índice

1. Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM) .....	3
1.1 Ubicación .....	3
1.2 Historia.....	5
1.3 Entorno .....	5
1.4 Organigrama del centro .....	6
1.5 Organigrama del personal.....	7
1.6 Trabajo del laboratorio .....	7
1.7 Áreas del departamento .....	8
1.8 Mapa del centro .....	9
2. Técnica Manual: Tinción de hematoxilina-eosina .....	9
2.1 Prolegómeno:.....	9
2.1.1 Introducción .....	9
2.1.2 Antecedentes históricos.....	10
2.1.3 Artículos de investigación .....	10
2.2. Objetivos de la técnica.....	12
2.3. Material y reactivos .....	12
2.4. Tipo de técnica .....	13
2.5. Muestra utilizada y obtención de la misma .....	13
2.6. Preparación de las muestras .....	14
2.7. Corte al micrótopo.....	15
2.8. Tinción de hematoxilina-eosina .....	16
2.9. Resultados.....	19
2.9.1. Individuo hembra.....	19
2.9.2. Individuo macho .....	22
2.10. Reconstrucción de fotografías.....	24
2.11. Comparación con la tinción de Cajal.....	25
3. Conclusiones .....	26
4. Referencias bibliográficas .....	27
5. Anexos .....	29
Anexo 1. Thunnus thynnus [21] .....	29
Anexo 2. Preparación de las muestras .....	31

2.1. Fijación .....	31
2.2. Deshidratación.....	31
2.3. Inclusión .....	33
Anexo 3. Corte al micrótopo .....	34
Anexo 4. Estado de madurez gonadal utilizado en peces [18] .....	38
Anexo 5. Fotografías.....	39
Anexo 6. Tinción tricrómica de Cajal .....	41

# 1. Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM)

## 1.1 Ubicación

El centro andaluz superior de estudios marinos, conocido como CASEM, se localiza en la Avenida República Árabe Saharaui, s/n, 11510 en Puerto Real, Cádiz. (Figura 1)

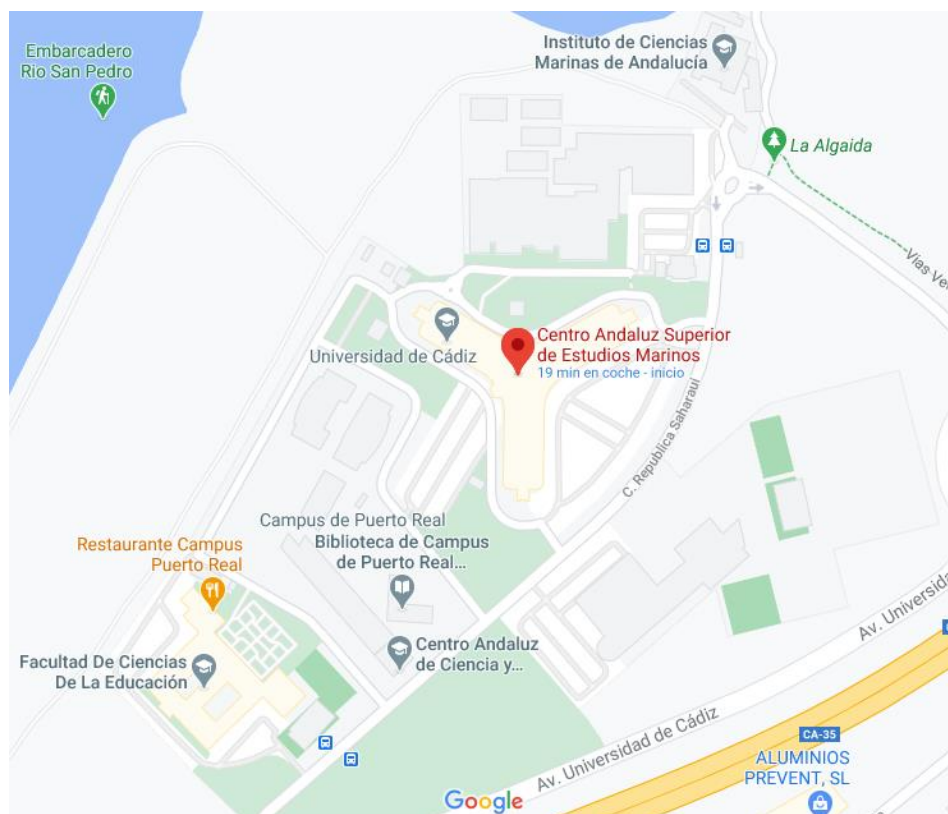


Figura 1: Visual de google maps de la localización del centro.

Su largo tamaño y curiosa forma de hélice lo distingue de los edificios de su alrededor, los cuales incluyen los centros donde se estudian las carreras relacionadas con las ciencias puras y educación. (Figura 2)



Figura 2: Fotografía aérea del campus de Puerto Real. [1]

Aquí se muestra también un plano del campus, donde puede observarse con diferentes colores la localización de los diversos edificios y centros que conforman la universidad de Puerto Real. (Figura 3)



Figura 3: Plano del campus de Puerto real. [2]

## 1.2 Historia

La UCA fue fundada el 15 de septiembre de 1965, pese a no contar con un espacio físico para impartir las clases hasta el 30 de octubre de 1979, fecha en la cual se constituyó el primer Claustro. Durante los primeros años de su creación las clases se realizaban en los locales de la iglesia de Don Rúa, y posteriormente se compartió espacios con el Colegio Externado de San José.

Con el aumento constante de la matriculación, en 1968 se decidió adquirir un terreno propio donde erigir el futuro campus universitario, al sur de la capital. Desde 1990, se ha ido ampliando con nuevos edificios para cubrir la demanda constante; la nueva Facultad de Filosofía y Letras, el Complejo Andaluz Superior de Estudios Marinos, la Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales; la Facultad de Ciencias del Trabajo y el Aulario La Bomba. En Jerez, se inauguró en 2004 el nuevo campus, acogiendo la Facultad de Derecho; y la escuela de Ciencias de la Salud en el Campus de Algeciras. Además, desde el año 2014, el campus también cuenta con la Escuela Superior de Ingeniería. [3]

## 1.3 Entorno

El Campus de Puerto real se localiza en un entorno natural privilegiado, pues se encuentra rodeado por el Parque Natural de la Bahía de Cádiz y el centro geográfico de los municipios que conforman la Mancomunidad de la Bahía de Cádiz. Este campus acoge la mayor concentración de centros científico-tecnológicos, creando un entorno industrial que incluye grandes empresas de sectores tan importantes como el metalúrgico, de automoción, electrónico, aeronáutico, naval y de agroalimentación. (Figura 4)

Se trata de un campus muy bien comunicado al poder accederse a él mediante transporte público, utilizando las líneas de autobuses directas desde cualquier población de la Bahía. Además, se halla estratégicamente situado en el corazón de ésta junto al nuevo puente de la Constitución de 1812.

También cuenta con un apeadero de RENFE en el campus, lo que proporciona un acceso continuo y rápido desde cualquier localidad de la Bahía y de Jerez.

Este Campus está constituido por seis centros universitarios; la Escuela de Ingeniería Naval y Oceánica, la de Ingenierías Marina, Náutica y Radioelectrónica, Superior de Ingeniería, Facultad de Ciencias, de Ciencias de la Educación y de Ciencias del Mar y Ambientales. Donde pueden estudiarse la totalidad de 22 títulos de grado relacionados con estas ramas de conocimiento.

Cabe destacar que se trata del único campus del sistema de universidades español en el cual es posible cursar todas las titulaciones relacionadas con los estudios del mar. Además, en éste se ubican las especialidades científico-tecnológicas dedicadas a los estudios marino-marítimos, los cuales cuentan con numerosos grupos de investigación en el centro. [4]



Figura 4: Embarcadero del río San Pedro, parque de los Toruños. Localizado a espaldas del campus. [5]

## 1.4 Organigrama del centro

La universidad de Cádiz es una institución metódicamente organizada y con una clara jerarquía que puede observarse en la imagen inferior (Figura 5). Como componente principal de la cadena de mando nos encontramos al rector, de quien dependen los diversos vicerrectorados, gerencia y secretaría general de la institución.

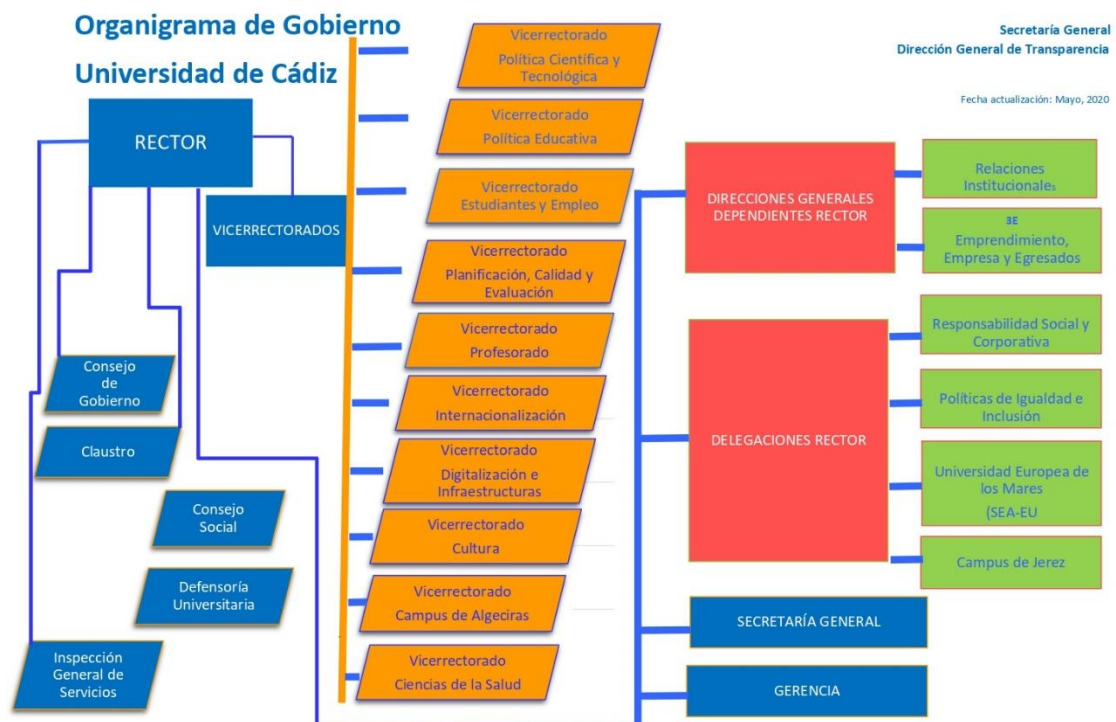


Figura 5: Organigrama de Gobierno de la Universidad de Cádiz. [6]

## 1.5 Organigrama del personal

En el caso que nos ocupa, debemos hablar de la organización del departamento de biología. En este, se puede observar una gestión general realizada por el director del departamento, de quien dependen los profesores y técnicos que llevan a cabo los diversos proyectos de investigación y la realización diaria de las prácticas para los estudiantes.

Dentro de un grupo de investigación se encuentra el equipo que se muestra a continuación (Figura 6)

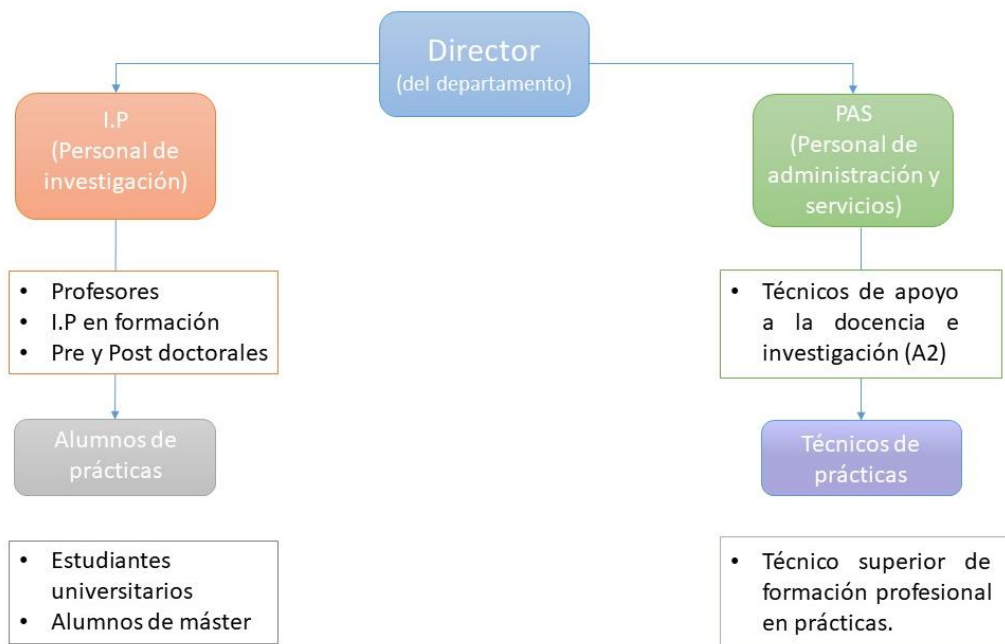


Figura 6: Organigrama del personal interno.

## 1.6 Trabajo del laboratorio

El laboratorio desarrolla una investigación sobre los ciclos de alimentación y reproducción del atún azul (*Thunnus thynnus*) en el Estrecho de Gibraltar. Para ello, se realizan análisis del contenido del estómago de los individuos y de los isótopos estables de nitrógeno y carbono.

El análisis de los isótopos estables de hígado y músculo se utiliza para establecer las relaciones tróficas de la especie. Éstos nos proporcionan información acerca de la dieta del individuo y los patrones de alimentación producidos durante un periodo de tiempo determinado, para así poder conocer sobre los cambios de poblaciones en la cadena trófica y las variaciones alimenticias del atún durante su ciclo biológico según sus necesidades energéticas.

El personal investigador del laboratorio se encarga del desarrollo del proyecto preparando las muestras para su liofilización y posterior molturación para el análisis de isótopos. Además, el personal técnico se ocupa de las mismas funciones cuando se requiere y de prestar su apoyo a los docentes cuando es necesario, por ejemplo, para la realización de las prácticas de los alumnos de la universidad. [7]



Relacionándose con la histología, se analizan cortes histológicos de las gónadas de los individuos, evaluando de esta forma su madurez reproductiva. Así que podemos mencionar que el trabajo que el alumno ha desarrollado durante estas prácticas ha sido:

- Proceso de inclusión de muestras y bloques de parafina.
- Corte histológico con el micrótomo.
- Tinción de muestras.

El trabajo realizado durante estas prácticas se desarrolló en el laboratorio 610, área de zoología, del edificio de CASEM, perteneciente al departamento de Biología.

## 1.7 Áreas del departamento

El Departamento de Biología es uno de los más importantes de la UCA, tanto a nivel docente como de investigación y cuenta con más de 70 miembros repartidos entre personal investigador, técnico, docente y gestor.

Alberga 5 Áreas de Conocimiento, las cuales son impartidas en los grados de Ciencias del Mar, Ciencias Ambientales, Enología, Biotecnología y Química; éstas son: Ecología, Zoología, Fisiología Vegetal y Antropología Física.

Muchos de los proyectos de investigación que se llevan a cabo en el Departamento han sido publicados en las revistas científicas más prestigiosas, con una gran variedad de estudios relacionados con: la biología evolutiva en ecosistemas mediterráneos, limnología, o diferentes aspectos sobre la oceanografía biológica [8]. También sobre la biología de peces, cuyo proyecto en desarrollo por el equipo de Zoología ya ha sido mencionado en el apartado anterior y del cual pueden encontrarse numerosos artículos.

## 1.8 Mapa del centro

El edificio del Centro Andaluz Superior de Estudios Marinos (CASEM) está compuesto por un sótano, una planta baja y hasta una tercera planta, divididas en tres áreas A, B y C, además de la cúpula que ha sido transformada en una sala de estudio. La actividad de las prácticas se realiza en el laboratorio número 20, perteneciente al área de Zoología. (Figura 7)

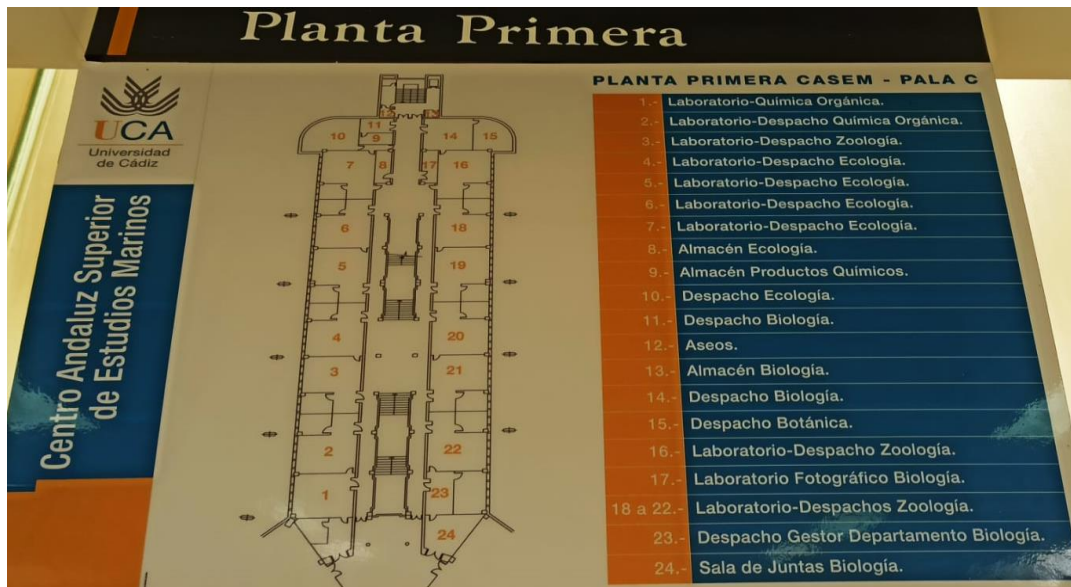


Figura 7: Mapa de la primera planta de CASEM.

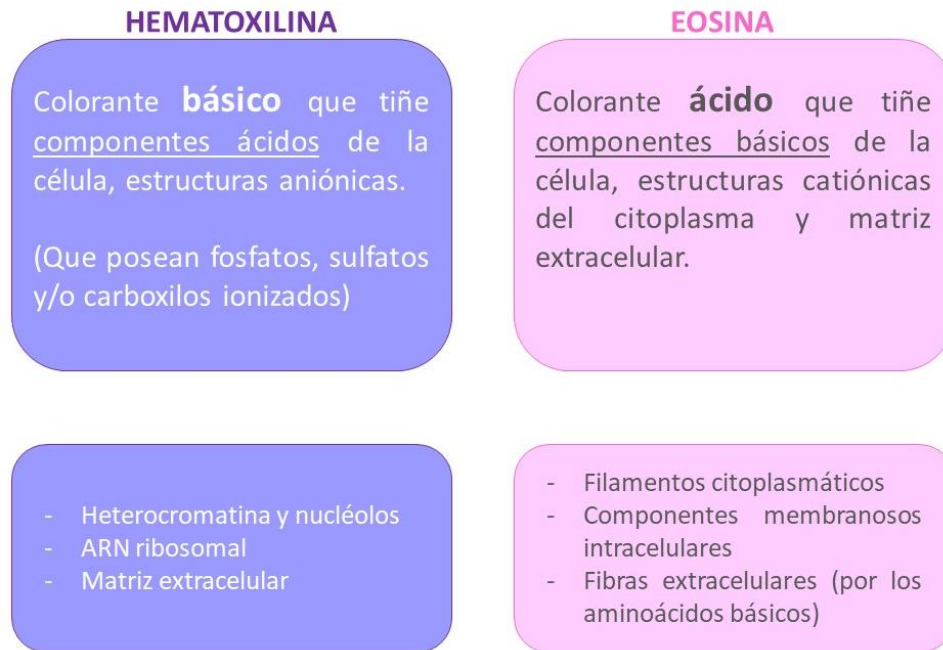
## 2. Técnica Manual: Tinción de hematoxilina-eosina

### 2.1 Prolegómeno:

#### 2.1.1 Introducción

La tinción de hematoxilina-eosina consiste en una técnica de coloración que combina los colorantes hematoxilina y eosina. Estos actúan a la perfección al combinarlos pues uno es un colorante básico, la hematoxilina, y la eosina se trata de un colorante ácido.

Esto se refiere a la afinidad de los colorantes; la hematoxilina, al tratarse de un colorante básico, catiónico, teñirá estructuras ácidas, como los núcleos celulares, mientras que la eosina, aniónico, teñirá estructuras básicas, como el citoplasma de las células. Es por esta razón que se trata de la técnica de referencia para las tinciones histológicas, pues permite diferenciar en dos colores las diversas estructuras celulares, permitiéndonos obtener información sobre las características, forma y estructura celular de una muestra tisular. (Figura 8)



*Figura 8: Esquema de la tinción Hematoxilina-eosina*

Se teñirán de un azul violeta intenso las estructuras ácidas, y de un rosado-rojizo las básicas. [9]

### 2.1.2 Antecedentes históricos

La mezcla de hematoxilina-eosina se dice que fue introducida por Wossowzky en el 1875 por primera vez. Hasta entonces se utilizaban por separado. Pero también ha sido atribuida a Reynaud en 1876 y a Busch en 1878.

El uso de la eosina era común a finales del siglo diecinueve. Se utilizaban indistintamente dos tipos: la eosina B y la eosina Y, pues las diferencias entre ambas eran apenas visibles durante las tinciones. Su utilización en la histología ha sido atribuida tanto a Dreschfeld como a Fischer en la década de 1870. Por otro lado, la hematoxilina fue introducida de forma independiente por F. Zur Böhmer en Múnich en 1865, siendo utilizada entonces junto a alumbre como mordiente, obteniéndose una distintiva pero imprecisa tinción para los núcleos celulares. [10] [11] [14]

### 2.1.3 Artículos de investigación

#### *2.1.3.1 Detección de biofilms con la tinción de hematoxilina-eosina*

Los biofilms son comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo. Se trata de la forma habitual de encontrar a las bacterias en la naturaleza. [12]

Un artículo del 2010 asegura que la hematoxilina-eosina puede ser utilizada para detectar la presencia de biofilm bacteriano en pacientes con sinusitis crónica. Esta enfermedad consiste en la hinchazón o inflamación de los espacios dentro de la nariz y la cabeza, los senos paranasales, durante un periodo de tiempo superior a tres meses pese al tratamiento. Sus

causas más frecuentes son las infecciones bacterianas, producidas por lo común en la superficie de la membrana mucosa.

Las dificultades más importantes durante el diagnóstico se presentan por lo complicado que resulta identificar las especies bacterianas del biofilm, pues en este pueden existir más de un tipo de éstas. Además de que poseen varios mecanismos de defensa, impidiendo en ocasiones la respuesta frente a antibióticos. Las bacterias residentes de un biofilm viven en una comunidad protegida por una sustancia extracelular polimérica y tridimensional que constituye el 90% del volumen y que comprende más del 50% del contenido de carbono total. Las especies bacterianas más comunes en los biofilm implicados en las enfermedades sinonasales son *Staphylococcus* y *Pseudomonas*.

Durante el estudio, realizado por varios autores, se afirmó que la técnica de tinción de la hematoxilina-eosina sí es un método fiable para la identificación de estos grupos bacterianos, pues éstos fueron detectados en 15 de 24 pacientes con sinusitis crónica, y en uno de los diez pacientes control. [13]

#### *2.1.3.2 Modificación de la tinción hematoxilina-eosina para su uso con resinas Epoxy.*

Las resinas de tipo epoxy se utilizan para la realización de cortes que serán observados con un microscopio electrónico de transmisión. Por ello, se debe obtener secciones ultrafinas, y para conseguirlo se necesitará endurecer enormemente el tejido; función que cumplen este tipo de resinas, que se infiltran en el tejido de forma líquida, para posteriormente polimerizar sin afectar a la estructura celular de la muestra. [16]

La tinción de hematoxilina-eosina es por lo común utilizada en cortes de bloques incluidos en parafina, pero existe un procedimiento que modifica la tinción para poder ser utilizada también con aquellos cortes que procedan de bloques realizados con resinas epoxy. Para ello se realiza:

1. Una fijación con glutaraldehído.
2. Una post-fijación con tetraóxido de osmio.
3. Infiltración de resina epoxy, se embebe el tejido.

Con los cortes obtenidos del bloque, se realiza a continuación:

1. Un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 4% durante 4 minutos.
2. Lavado y secado.
3. Teñir con hematoxilina según Gill III a 37°C durante 90 minutos.
4. Lavado.
5. Pavonado con hidróxido de amonio durante 1 minuto.
6. Lavado.
7. Teñir con eosina Y al 1% durante 5 minutos.
8. Enjuagar con etanol al 100%.
9. Continuar con el proceso de deshidratación y posterior montaje con Permont.

Durante la observación se podrá comprobar que tanto los colores como la calidad obtenida serán similares a los presentes en tinciones de hematoxilina-eosina realizadas en cortes estándar de bloques de parafina. [15]

## 2.2. Objetivos de la técnica

- Tinción de rutina para cortes histológicos por la fácil identificación de células y estructuras.
- Tinción de fibras nerviosas gruesas.
- Tinción en coprocultivo para la identificación de amibiasis por Entamoeba histolytica y Entamoeba dispar. [9]

## 2.3. Material y reactivos

El material utilizado para la tinción de hematoxilina-eosina es el mismo que se utilizaría al realizar cualquier otra tinción, lo que engloba:

- Papel de filtro, para cubrir la superficie y evitar manchas provocadas por los colorantes.
- Cubetas de tinción.
- Cesta para los portaobjetos, así se sostendrán mientras se va cambiando de cubeta.
- Cubreobjetos.

Por otro lado, en cuestión a los reactivos:

- Etanol de 50º, 70º, 80º, 90º y 100º.
- Xileno.
- Hematoxilina de Mayer.
- Eosina.
- Agua destilada y del grifo.
- Medio de montaje Eukitt.

Antiguamente, los colorantes y sus componentes eran realizados por rutina en el laboratorio, pues los reactivos ya preparados y comercializados eran caros y difíciles de encontrar. No es de extrañar entonces que la forma más económica de realizar la tinción de hematoxilina-eosina fuese preparando los colorantes uno mismo, práctica que aún se sigue llevando a cabo a día de hoy [17] (Figura 9). La forma de preparar la hematoxilina y la eosina es la siguiente:

### Hematoxilina de Harris

1. Disolver 1gr de hematoxilina en 10-12 ml de etanol absoluto.
2. Disolver 20gr de aluminio potasio sulfato (SO<sub>4</sub>)AlK en 400 ml de agua destilada.
3. Calentar las dos soluciones al fuego temperatura máxima) y llevar a ebullición.
4. Retirar del fuego y añadir 0.5 gr de óxido rojo de mercurio (Mercurio II óxido)
5. Volver a colocar al fuego y llevar a ebullición.
6. Retirar para que se enfríe y guardar en nevera.
7. Filtrar y guardar en frasco topacio.

### Eosina

1. Disolver 0.25 gr de eosina en 50 ml de agua destilada.
2. Añadir 50 ml de etanol absoluto.
3. Agitar y añadir 2 gotas de ácido Acético.



Figura 9: Hematoxilina y Eosina preparadas en frascos topacio.

## 2.4. Tipo de técnica

La técnica de tinción de hematoxilina-eosina provee una clara imagen para comprender en profundidad la microestructura de los órganos y tejidos. La hematoxilina tiñe de forma precisa componentes nucleares, incluyendo la heterocromatina y los nucléolos, mientras que la eosina colorea los componentes citoplasmáticos, como el colágeno, las fibras elásticas, musculares o las células sanguíneas. [17]

Por la claridad de observación que proporciona esta tinción, además de la facilidad de su preparación y utilización, es de lejos la de preferencia a utilizar para procedimientos de rutina por los patólogos. Incluso pueden variarse algunos tiempos durante la tinción para controlar la intensidad con la que las muestras serán teñidas, lo que proporciona un enorme control para obtener los resultados de preferencia y así, a posteriori, poder realizar una cómoda observación.

## 2.5. Muestra utilizada y obtención de la misma

Las muestras utilizadas durante el procedimiento de las prácticas fueron gónadas de atún (*Thunnus Thynnus*) de diversos especímenes. (Figura 10 y 11) [Anexo 1]

Es preciso que cada ejemplar del cual se extraen las muestras esté claramente identificado por su especie, por un número, fecha y lugar de captura para que así no se mezclen después los datos. Además, éstos son los que van reflejados en el etiquetado de las muestras para histología.

Al localizar las gónadas se distinguen de la siguiente manera: los ovarios se encontrarán como numerosas estructuras esféricas que pueden llegar a abarcar hasta el 70% del peso total. Por otro lado, los testículos pueden abarcar hasta el 12% del peso total. En individuos maduros éstos tienen la apariencia de un órgano blanco y suave que se encuentra suspendido en la

pared dorsal del cuerpo. Si las gónadas no son visibles, entonces se trataría de un espécimen inmaduro.

Por otro lado, si las gónadas están desarrolladas, se procede a determinar el sexo del ejemplar. Éstas se pesan y para el estudio histológico, se extraen del animal recién muerto y se conservan en formol tamponado. Es de interés que las fracciones obtenidas para cortes histológicos comprendan porciones tanto de las partes distales como del interior de la gónada, para examinar las diferencias en el tamaño y maduración de los oocitos.



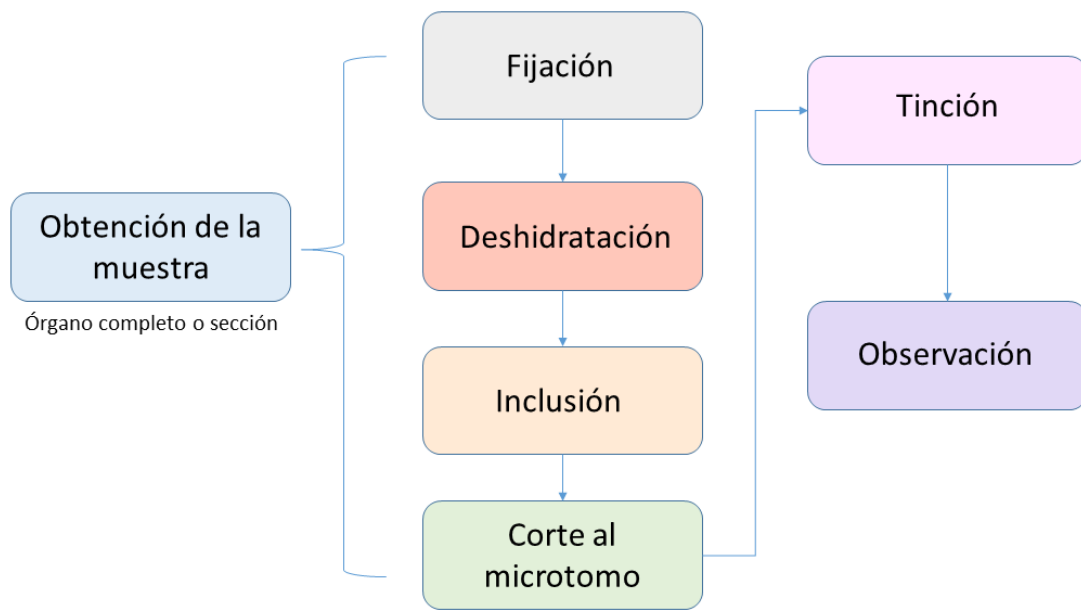
*Figura 10: Muestras de gónadas de atún en etanol 70%.*



*Figura 11: Muestras talladas; testículo a la izquierda y ovario a la derecha.*

## 2.6. Preparación de las muestras

Se considera la preparación de las muestras como una serie de métodos y técnicas utilizados para que, al final del proceso, sea posible estudiar las características morfológicas de los tejidos. Los pasos a seguir son los siguientes:



*Figura 12: Esquema del procesado de muestras*

Tras obtener las muestras a procesar se continúa con la fijación, la cual sirve para mantener su estructura celular y molecular en el mismo estado que cuando se recoge la muestra. Para ello, se sumerge la muestra un mínimo de 48 horas en formol 35-40% en tampón fosfato 0.1M y pH: 7.5. La proporción del fijador es 1:9. Tras la fijación la muestra se vuelve más consistente, se podría proceder con el tallado, que consiste en la selección de la parte más representativa del tejido o continuar con la muestra entera. Y una vez fijada la muestra, se enjuaga para eliminar el exceso del fijador, luego se realizan baños de etanol 50% y 70%, se deja en este último como conservante.

La deshidratación se realiza para poder incluir más tarde la muestra en parafina, pues ésta es hidrófoba. Se realizan baños de etanol crecientes y se termina con xilol, un agente aclarante que sustituye al etanol y que es miscible en parafina. Éste último debe ser desechado en un recipiente para disolventes no halogenados, y siempre se debe manipular en campana.

La inclusión es el proceso por el cual se elimina por completo el agua del tejido, sustituyendo ésta por un componente sólido que mantenga su estructura y que impida su fragmentación durante el corte, además, endurecerá el tejido y servirá para su preservación. La sustancia más común es la parafina, la cual se infiltra en estado líquido para que tras el proceso de enfriamiento se obtenga un bloque sólido en el cual se halle el tejido.

Los procedimientos y fotografías de cada uno de los pasos se pueden encontrar en el anexo 2.

## 2.7. Corte al micrótopo

Los micrótopos son instrumentos de precisión con los que se obtienen cortes de tejido de un grosor determinado y uniforme, lo suficientemente delgados para ser examinados bajo el microscopio (Figura 13). El grosor del corte puede ser modificado, para desbastar se utiliza 12  $\mu\text{m}$ , y para el corte 7  $\mu\text{m}$ .





Figura 13: Área de trabajo, con un micrótopo de tipo minot y un baño de flotación.

Los utilizados para cortar preparaciones de parafina son los más comunes, los de tipo minot, y se componen de varias partes: una cuchilla, un portamuestras y un sistema mecánico que permite acercar el bloque de parafina a la cuchilla, a la distancia que corresponda con el grosor de la sección que se desee obtener, previamente establecida en la pantalla superior girando la ruedecilla, y realizar el corte. [12]

El procedimiento de corte de muestras puede encontrarse en el anexo 3.

## 2.8. Tinción de hematoxilina-eosina

Es la tinción más utilizada en histología para cortes en parafina. Utiliza un colorante básico y otro ácido para teñir de diferente color las estructuras ácidas y básicas de la célula. El procedimiento puede realizarse con cubetas de tinción, soportes donde caiga el exceso de tinte o baterías de tinción, la cual ha sido utilizada durante esta práctica debido a su comodidad. (Figuras 14 y 15)



Figura 14: Batería para la rehidratación de la preparación y su deshidratación tras la tinción.



*Figura 15: Cubetas separadas para la tinción, escurriendo las preparaciones del colorante eosina.*

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Primero se debe eliminar el exceso de parafina, para lo cual se realizan dos baños de xilol durante 10 minutos.
2. A continuación, hay que rehidratar la muestra, se prepara una batería de hidratación que consiste en alcoholes de concentraciones descendentes:
  - a. Etanol 100% 10 minutos.
  - b. Etanol 100% 10 minutos.
  - c. Etanol 90% 10 minutos.
  - d. Etanol 70% 10 minutos.
  - e. Agua corriente 10 minutos.
3. Se procede con la tinción. Se debe recordar filtrar los colorantes antes de utilizarlos para evitar que se adhieran a las preparaciones cualquier impureza que pudiesen contener. (Figura 16)



*Figura 16: Filtrando los colorantes eosina y hematoxilina.*

Para ello, se filtran con papel de filtro sobre un embudo en un matraz Erlenmeyer;

- a. Teñir la preparación con hematoxilina filtrada durante 6 minutos.
  - b. Lavar la muestra en agua corriente durante 10 minutos.
  - c. Teñir con eosina filtrada durante 1-2 minutos (según la actividad de la eosina)
  - d. Si la actividad es muy fuerte, lavar en agua destilada muy rápido.
4. Antes de proceder con el montaje se debe realizar una batería de deshidratación para la correcta conservación de la preparación.
- a. Rápido enjuague en etanol 70%.
  - b. Etanol 90% durante 3-4 minutos.
  - c. Etanol 100% 10 minutos.
  - d. Etanol 100% 10 minutos.
  - e. Xilol 10 minutos.
  - f. Xilol 10 minutos.
5. Para la conservación y posterior observación de la preparación al microscopio se utiliza el Eukitt como medio de montaje. Éstos se caracterizan por un secado rápido, una óptica cristalina, una baja fluorescencia, un índice de refracción ideal, una buena fluidez y un bajo encogimiento. Las preparaciones son estables durante muchos años sin agrietarse ni descolorarse. Además, este medio de montaje es incoloro y no modifica ni la forma, estructura o color del material a examinar. Los pasos a seguir son:
- a. Mantener los portaobjetos en xilol mientras se realiza el montaje para evitar el secado de la preparación.
  - b. Escurrir con cuidado el exceso de xilol presionando los bordes de portaobjetos sobre un papel de filtro.
  - c. Orientar hacia arriba el portaobjetos sobre un papel de filtro. Para ello se debe procurar escribir la identificación de la muestra con lápiz, ya que la tinta de bolígrafo podría emborronarse o desaparecer debido a los procesos de deshidratación.
  - d. Añadir una gota justo sobre el tejido, y tras escoger el cubreobjetos del tamaño adecuado, ir soltándolo poco a poco encima con el soporte de un palo o varilla para ir haciendo presión y evitar que se formen burbujas de aire que puedan dificultar la observación al microscopio. (Figuras 17 y 18)



*Figura 17: Depositando una gota del pegamento sobre la preparación teñida.*



*Figura 18: Presionando el cubreobjetos sobre la preparación con el pegamento.*

- e. Se deja secar overnight (durante toda la noche) y, una vez solidificado el pegamento, se rasca los restos que pueda haber rebotado por los bordes.
- f. Por último, se procede a la observación al microscopio, donde se realizan fotos de la preparación.

## 2.9. Resultados

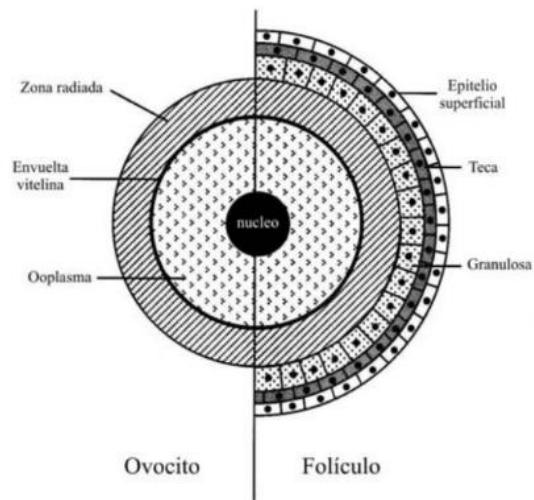
Se teñirán de un azul violeta intenso las estructuras ácidas y de un rosado-rojizo las básicas:

<b>Hematoxilina</b>	Violeta azulado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material genético de la célula</li> </ul>
<b>Eosina</b>	Rosa anaranjado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Citoplasma</li> <li>• Tejido conjuntivo</li> <li>• Estructuras que rodean y sostienen a la célula</li> </ul>

### 2.9.1. Individuo hembra

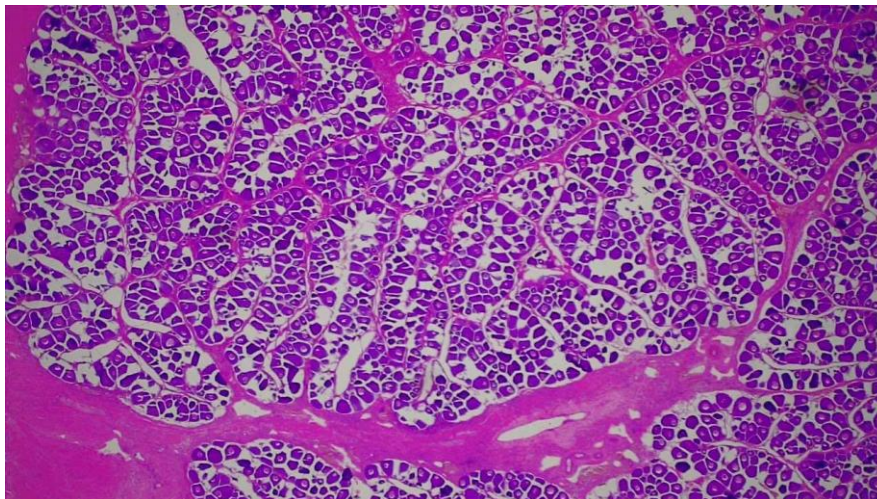
Los ovocitos de los peces se desarrollan a partir del epitelio del lumen del ovario. Se distingue el ovocito como el conjunto del núcleo y ooplasma rodeado del oolema (envuelta vitelina) y zona radiada; las dos capas que originan el corion. El folículo es el ovocito junto a los tejidos que lo envuelven: granulosa, teca y epitelio superficial en un folículo maduro y pared folicular.

El desarrollo de los ovocitos comprende: crecimiento primario, alveolos corticales, vitelogénesis y maduración. (Figura 19) [19]

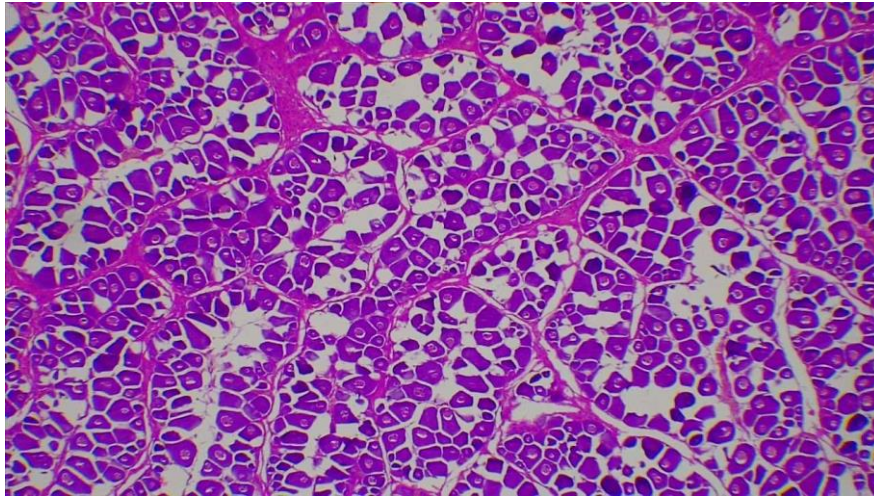


*Figura 19: Partes diferenciadas de un ovocito y un folículo.*

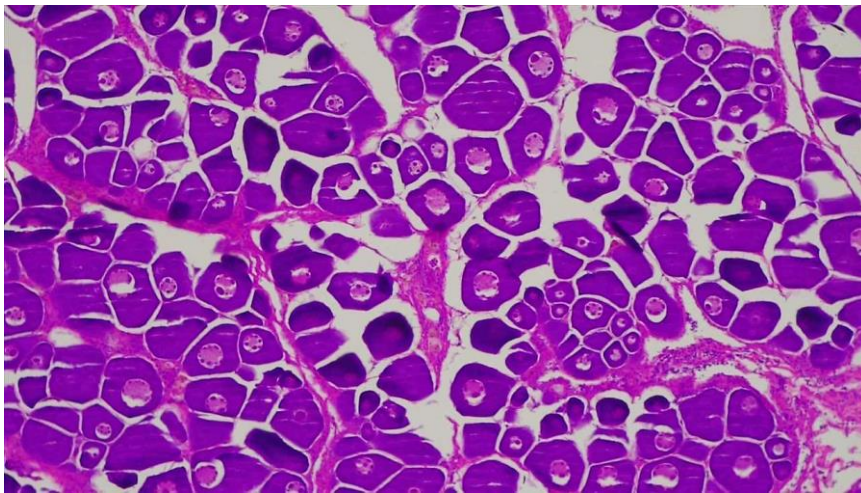
Las fotografías obtenidas durante la observación son las siguientes, otras pueden encontrarse en el anexo 5:



*Figura 20: Imagen al microscopio de ovario de atún 2,5x*

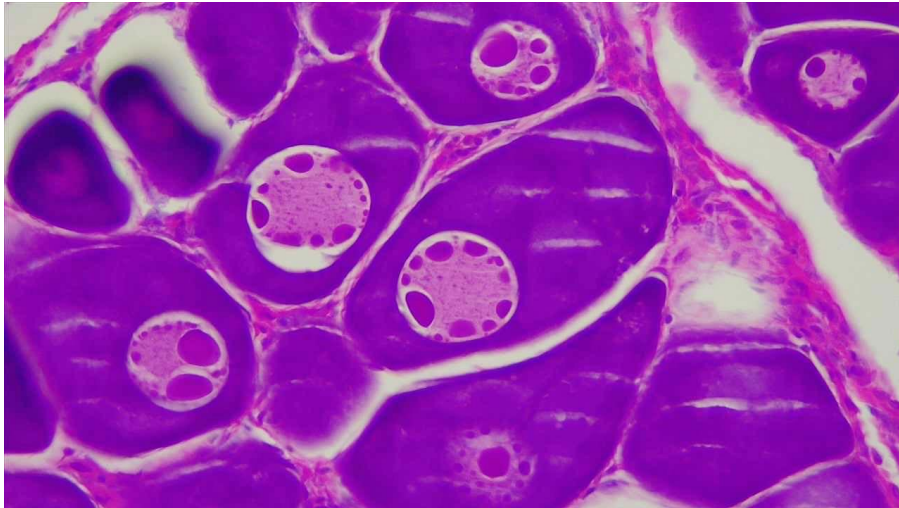


*Figura 21: Imagen al microscopio de ovario de atún 4x*

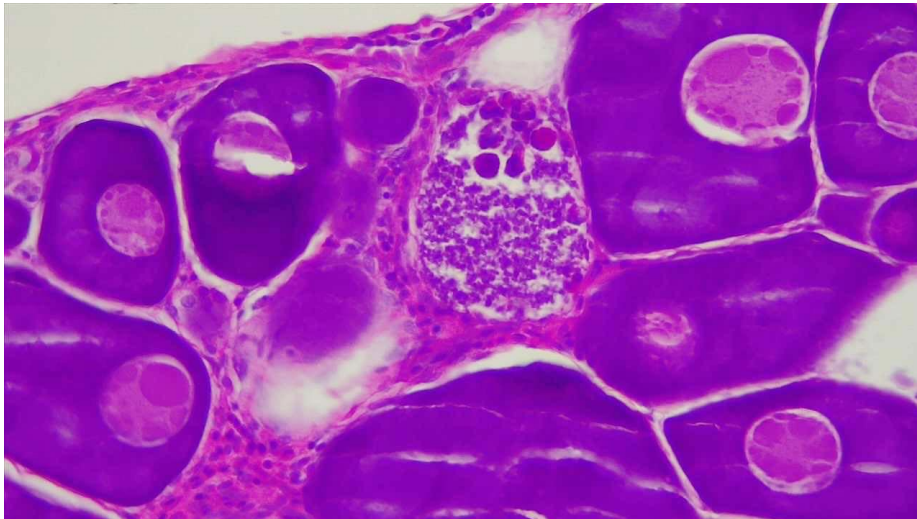


*Figura 22: Imagen al microscopio de ovario de atún 10x*

Las líneas blancas que se muestran en el interior de las células corresponden a un error durante la realización del corte al micrótopo. Se requiere de un ritmo constante al girar la manivela. Si en algún momento se fuerza o se ralentiza esta rotación, puede provocar estas pequeñas grietas sobre la muestra. (Figura 22)



*Figura 23: Imagen al microscopio de ovario de atún 40x*



*Figura 24: Imagen al microscopio de ovario de atún 40x*

Al observar estas fotografías se puede concluir que se trata de un ovario inmaduro, pues las células se encuentran muy poco desarrolladas, apenas ocupando un tercio del espacio. [Anexo 4]

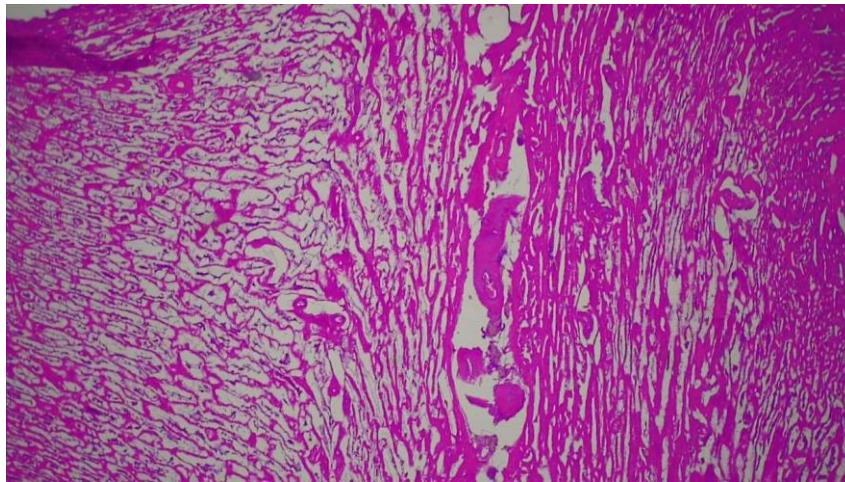
Dato curioso, en la figura 24 se puede observar la aparición de la vitelogénesis. Ésta se caracteriza por la aparición de esferas o glóbulos llenos de vitelo. Al principio los gránulos son de pequeño tamaño y se hacen mayores al avanzar este estado. Las esferas de vitelo pueden mantener su integridad a lo largo de toda la fase de crecimiento del ovocito, fusionándose al final formando una masa fluida continua, que le da a los ovocitos su típico aspecto transparente. [19]

### **2.9.2. Individuo macho**

Durante el ciclo reproductivo de ejemplares macho de atún, como sucede en otros teleósteos, la espermatogénesis incluye una serie de transformaciones complejas que sufren las células

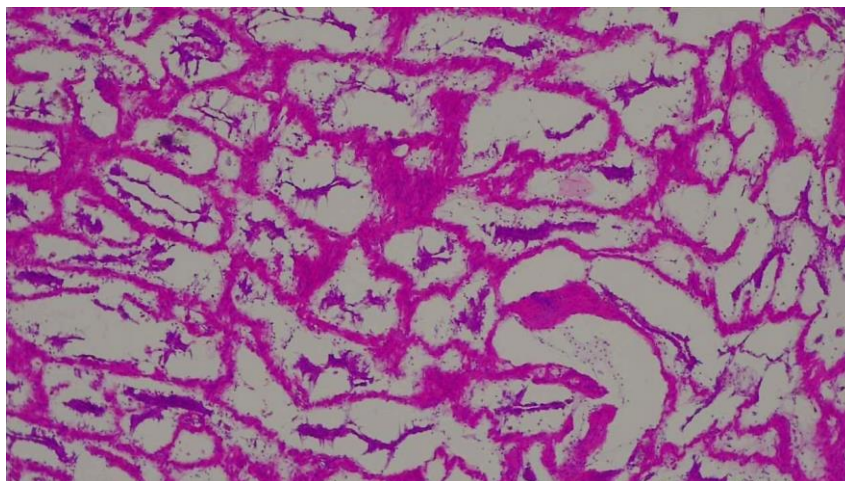
germinales o espermatogonias hasta transformarse en espermatozoides, las cuales se resumen en 4 fases [20]:

1. Espermatocitogénesis o Fase de activación gonial que incluye a las espermatogonias (A y B).
2. Fase de 1ª división meiótica. Incluye a los espermatocitos I.
3. Fase de 2ª división meiótica. Incluye a los espermatocitos II.
4. Fase de Espermiogénesis. Incluye al estadio de espermátidas.
5. Fase de Espermiación. Una vez finalizada la espermatogénesis, los espermatozoides maduros son liberados del epitelio seminífero a la luz de los túbulos.



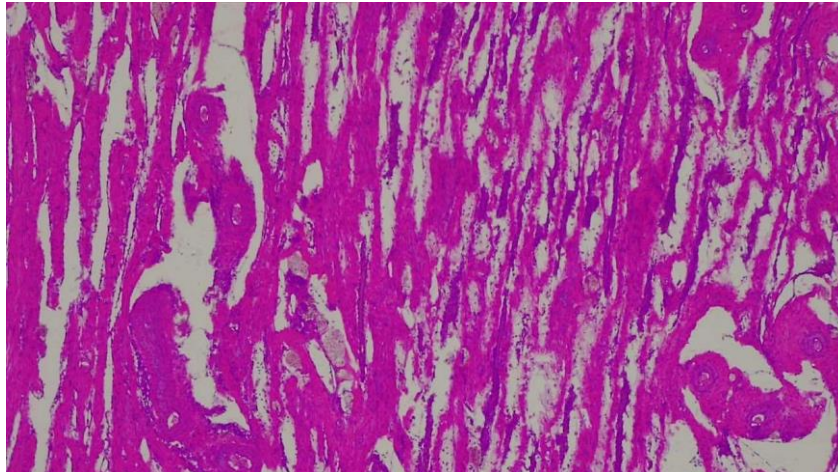
*Figura 25: Imagen al microscopio de testículo de atún 2'5x*

En las fotografías se distinguen dos zonas diferenciadas, la zona germinativa a la derecha, lugar donde se lleva a cabo la espermatogénesis (producción de espermatozoides). Y la zona tubular a la izquierda, por donde se desplaza el esperma hasta el centro, el conducto espermático principal, que se encargará de expulsarlo al exterior. (Figura 25)

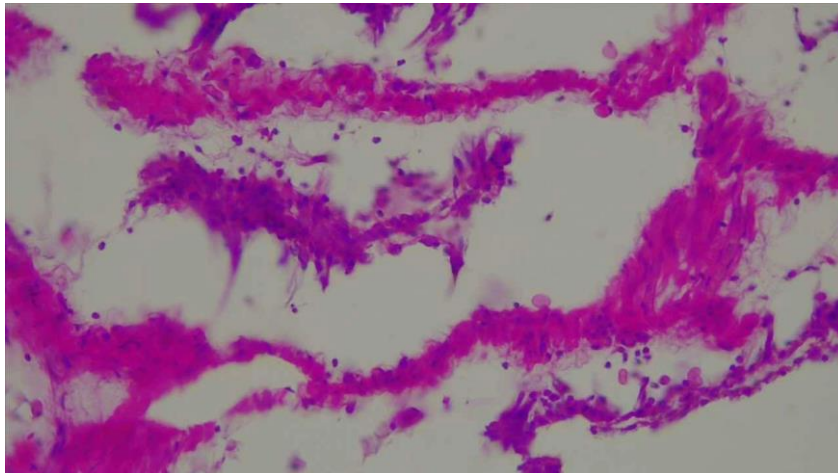


*Figura 26: Imagen al microscopio de testículo de atún 10x*





*Figura 27: Imagen al microscopio de testículo de atún 40x*



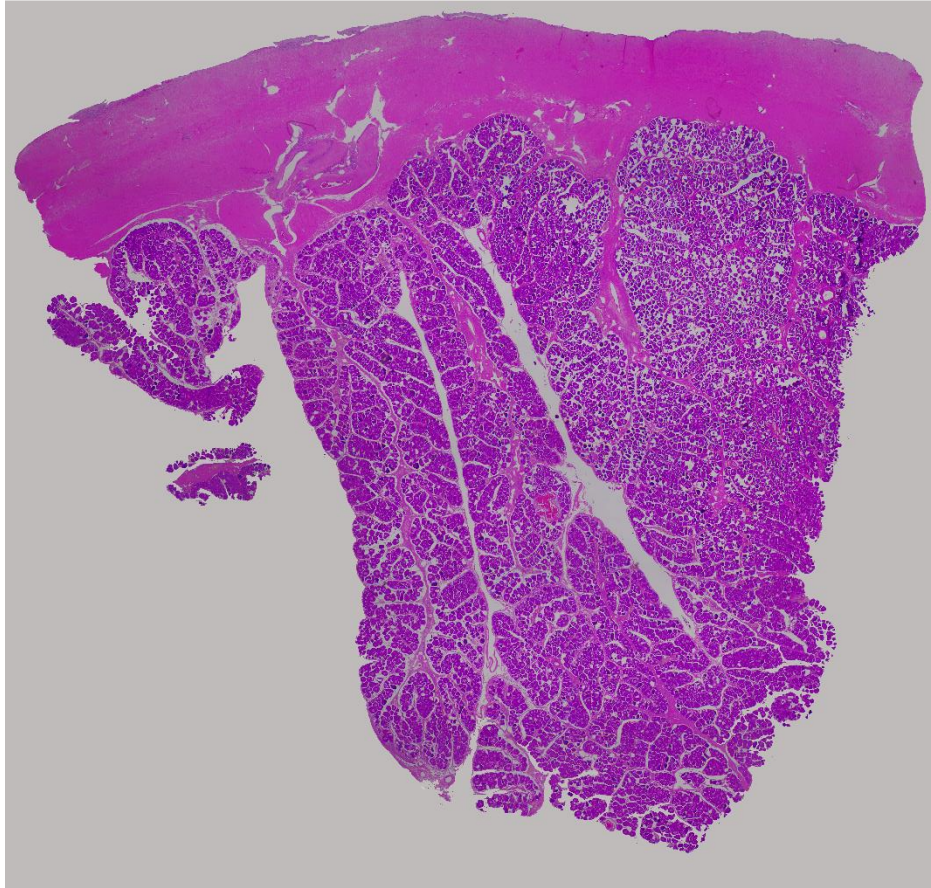
*Figura 28: Imagen al microscopio de testículo de atún 40x*

En relación al anexo 4 se puede afirmar que se trata de un testículo inmaduro, pues la celularidad es escasa en la zona germinativa.

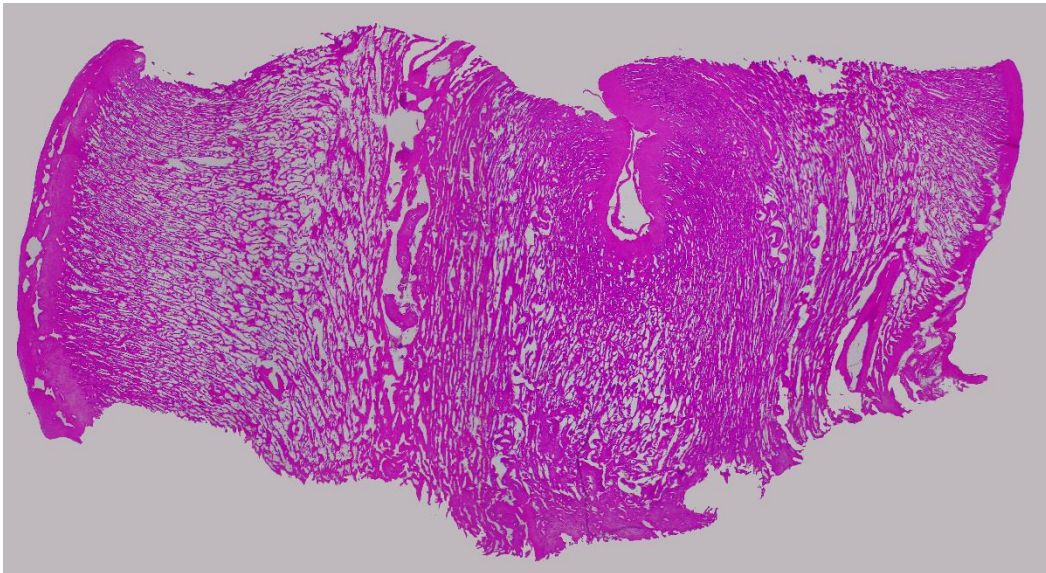
## 2.10. Reconstrucción de fotografías

Durante la toma de fotografías al microscopio solo es posible capturar secciones específicas de la preparación, siendo incapaz el técnico de poder observar el corte en su totalidad.

Gracias a la tecnología es posible remediar esto. Durante las prácticas se utilizó un programa de edición fotográfico para conseguir obtener una imagen de la preparación al completo. Para ello, se realizaron multitud de fotografías de cada sección, las cuales unió en una sola imagen el programa. (Figuras 29 y 30)



*Figura 29: Imagen al microscopio de corte de ovario de atún. Hematoxilina-eosina 4x*



*Figura 30: Imagen al microscopio de corte de testículo de atún. Hematoxilina-eosina 4x*

### 2.11. Comparación con la tinción de Cajal

Los métodos tricrómicos se utilizan para la identificación de fibras colágenas y músculo. Durante las prácticas se preparó y utilizó esta tinción para el estudio de unos cortes de una

anémona desconocida. La técnico del laboratorio trabaja en una reconstrucción de las fotografías de las secciones para la identificación de la especie de la anémona.

También se tiñeron algunas preparaciones de atún con la misma técnica, pero pese a que es utilizada en cortes de ovarios humanos, las fotografías resultaron borrosas y difícilmente identificables. Las fotografías tomadas pueden encontrarse en los anexos. [Anexo 6]

### 3. Conclusiones

- ❖ La técnica de tinción de la hematoxilina-eosina consiste en un procedimiento rápido y fácil que cualquier laboratorio de investigación puede realizar. Los colorantes utilizados pueden realizarse en el mismo laboratorio a través de disoluciones con los componentes sólidos, lo cual evita que los colorantes a utilizar se echen a perder, pues pueden prepararse poco tiempo antes de comenzar con el procedimiento.
- ❖ La tinción de hematoxilina-eosina es ampliamente utilizada con muestras incluidas en parafina o procesadas por congelación. Además, también es posible modificarla para poder ser utilizada con muestras incluidas en resinas epoxy. Esto le otorga una gran versatilidad.
- ❖ Se utiliza de forma regular como tinción de rutina para cortes histológicos debido a la fácil identificación de células y estructuras. También es de utilidad para la observación de fibras nerviosas y para la identificación bacteriana de *Entamoeba histolytica* y *dispar* en los coprocultivos. Esto es debido a su capacidad de teñir componentes tanto basófilos como acidófilos.
- ❖ La hematoxilina-eosina no es una tinción comúnmente utilizada para la detección de biofilms debido a la complejidad del proceso, pero un estudio demostró que ésta sí que es un método fiable para la detección de estos grupos bacterianos.

## 4. Referencias bibliográficas

1. UCA [Internet]. Red de Observatorios de Buenas Prácticas de Dirección Estratégica Universitaria en América Latina y Europea; 2017 [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://admpuertoreal.uca.es/noticia/telescopi/>
2. UCA [Internet]. Información del campus [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://admpuertoreal.uca.es/informacion-del-campus/>
3. UCA [Internet]. Historia de la Universidad de Cádiz. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://www.uca.es/historia-de-la-universidad-de-cadiz/>
4. UCA [Internet]. Campus de Puerto Real. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://www.uca.es/los-campus/puerto-real/>
5. Puerto Campamento [Internet]. Parque de los Toruños. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://puertocampamentos.es/parque-de-los-toruños/>
6. Transparencia UCA [Internet]. Organigrama de Gobierno. (2020, 21 de mayo). [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://transparencia.uca.es/>
7. Varela, J. L, Carrera, I., & Medina, A. (2019) [Internet]. Seasonal feeding patterns of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Strait of Gibraltar. *Marine environmental research*, 104811. Advance online publication. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104811>
8. UCA [Internet]. Departamento de Biología. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://d138.uca.es/>
9. Elaborate UCA. [Internet]. Documentos del departamento de Biología. [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://elaborate.uca.es/biologia-documentos/>
10. Gil, Marielsa [Internet] (2019, 7 de agosto). Tinción de hematoxilina-eosina: características, usos, técnicas. *Lifeder* [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/tincion-hematoxilina-eosina/>.
11. LinkFang [Internet] (2020, 19 de diciembre) Eosina [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: [https://es.linkfang.org/wiki/Eosina#Historia,\\_origen\\_y\\_evoluci%C3%B3n](https://es.linkfang.org/wiki/Eosina#Historia,_origen_y_evoluci%C3%B3n)
12. Megías M, Molist P, Pombal MA. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas. [citado el 26 de marzo de 2021] Recuperado de: <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
13. Lasa, I., Pozo, J. L. del, Penadés, J. R., & Leiva, J.. [Internet] (2005). Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 28(2), 163-175. [citado el 26 de marzo de 2021] Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es).
14. Hochstim CJ, Choi JY, Lowe D, Masood R, Rice DH. [Internet] Biofilm Detection With Hematoxylin-Eosin Staining. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010;136(5):453–456. doi:10.1001/archoto.2010.62 [citado el 26 de marzo de 2021]. Recuperado de: <https://jamanetwork.com/journals/jamaotolaryngology/article-abstract/496279>
15. Cook, H. C. [Internet] (1997). Origins of tinctorial methods in histology. *Journal of clinical pathology*, 50(9), 716. [citado el 6 de abril de 2021]. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC500167/>
16. K.A. Pasyk, C.A. Hassett. [Internet] (1989). Modified Hematoxylin and Eosin Staining Method for Epoxy-Embedded Tissue Sections, *Pathology – Research and Practice*, Volume 184, Issue 6, 1989, Pages 635-638, ISSN 0344-0338. [citado el 6 de abril de 2021]. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0344033889801700>
17. Sampias, C., Rolls, G. [Internet] (2021). H&E Staining Overview: A Guide to Best Practices. [citado el 6 de abril de 2021]. Recuperado de: <https://www.leicabiosystems.com/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>
18. J.A. Hernando Casal, M.C Soríguer Escofet, C.V Allespin Gomez. (1993). Cuaderno de prácticas de ictiología. Facultad de Ciencias del Mar (UCA). [citado el 12 de abril de 2021]

19. Saborido-Rey, F. (2008, 19 de septiembre). Ecología de la reproducción y potencial reproductivo en las poblaciones de peces marinos. [citado el 22 de abril de 2021]. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/10261/7260>
20. Cárdenas, Salvador. (2001). Contribución a la biología reproductiva del atún rojo, *Thunnus thynnus*. Estudio de la espermatogénesis. [citado el 5 de mayo de 2021]. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/258221629\\_Contribucion\\_a\\_la\\_biologia\\_reproductiva\\_del\\_atun\\_rojo\\_Thunnus\\_thynnus\\_Estudio\\_de\\_la\\_espermatogenesis](https://www.researchgate.net/publication/258221629_Contribucion_a_la_biologia_reproductiva_del_atun_rojo_Thunnus_thynnus_Estudio_de_la_espermatogenesis)
21. IctioTerm. *Thunnus thynnus*. [citado el 5 de mayo de 2021]. Recuperado de: [http://www.ictioTerm.es/nombre\\_cientifico.php?nc=141](http://www.ictioTerm.es/nombre_cientifico.php?nc=141)

## 5. Anexos

### Anexo 1. *Thunnus thynnus* [21]

*Thunnus thynnus* es un pez óseo, de gran tamaño, comestible, muy apreciado y de gran importancia comercial. Presente en todo el litoral andaluz, es una especie conocida por todos los informantes entrevistados. En todas las encuestas obtuvimos respuestas y las confusiones fueron mínimas.

La denominación más frecuentemente empleada es *atún*, que encontramos en todos los puertos del área de estudio, seguida de *atún rojo*, que también se emplea por toda la costa en alusión al color rojo de la carne. *Atún* viene del árabe *tun*, que a su vez procede del latín *thunnus* 'atún' y este del griego *thýnnos* 'atún' (Corominas y Pascual, 1980).

En El Puerto recogimos *atún azul*, para indicar que se trata del atún "de almadraba", o "atún auténtico". Informantes de Caleta de Vélez especifican que este atún es "el de la orejilla chica (aleta pectoral pequeña)", para diferenciarlo de *Thunnus alalunga*, el *orejón* (Ayamonte), que tiene las aletas pectorales muy largas.



Figura 1: *Thunnus thynnus*. Atún azul.

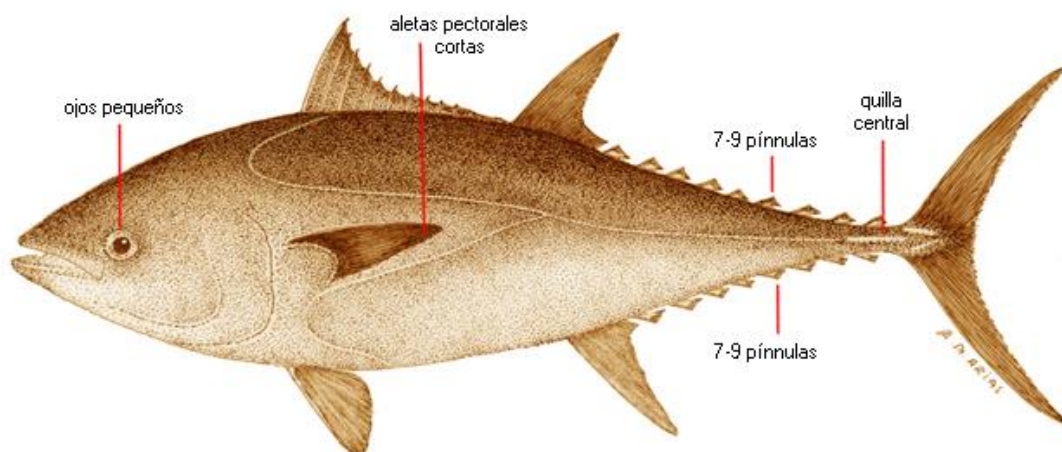


Figura 2: Características comunes del atún azul.

Como ocurre con otras especies de gran valor económico, al *atún* recibe varios nombres según el tamaño de los ejemplares, expresado en peso, pero no hay consenso en las denominaciones léxicas. Así, en El Terrón, llaman:

- **atunillo** y *cachorreta* ("el cachorro del atún"), es el ejemplar pequeño, de 2 a 20 kg;
- *atuarro* ("el hijo del atún"), o *atún* un poco más grande, que pesa de 20-30 a 40 kg ("dos atuarros es igual a un atún", dicen);
- *atún*, de más de 50 kg.

Sin embargo, en Barbate, Rodríguez-Roda (1960) distingue entre:

- *cachorreta*, que tiene 6-7 kg,
- *albacora* (no confundir con *Euthynnus alletteratus* ni con *Thunnus alalunga*), que pesa entre 10 y 12 kg,
- *atuarro*, de 45 a 50 kg, y
- *atún*, cuando tiene más de 50 kg.

En Algeciras llaman **cimarrón** al atún muy grande, de 200 a 300 kg "y más". *Cimarrón* es un americanismo con varios significados, entre ellos, 'salvaje, silvestre', probablemente derivado de *cima*, por los montes a donde huían los cimarrones (Corominas y Pascual, 1980). Para los ejemplares muy grandes de atún tal vez se refiera a su apariencia voluminosa, fuerte y salvaje que recuerda a los animales que reciben este mismo calificativo: caballos cimarrones, cabras cimarronas, etc.

Los nombres en **negritas** son neologismos de ICTIOTERM para la ictionimia andaluza.

En la bibliografía ictionímica para Andalucía, Medina Conde (1789) cita *tollina* y *toñina* en las costas de Málaga, variantes de *atún* que vendrían de la forma primitiva de rematar a golpes a los atunes una vez que se sacaban de las redes de las almadrabas, ya que *tollina* es 'paliza' y 'castigo a golpes'. Alvar (1989) recoge *zarda* en San Fernando y *atún janco* en Algeciras. Creemos que se trata de confusiones debidas a la escasa calidad de las imágenes mostradas a los informantes. *Zarda* (*sarda*) correspondería a *Euthynnus alletteratus* y *atún janco* a *Thunnus alalunga*.

## Anexo 2. Preparación de las muestras

### 2.1. Fijación

Las muestras obtenidas para su estudio histológico son fijadas para mantener la estructura celular y molecular en el punto inicial de recogida de la muestra. Este proceso no sólo preserva estas estructuras, sino que además asegura que éstas permanezcan invariables durante los diversos procesos a los que se someterá la muestra

La fijación debe realizarse inmediatamente, pues el paso del tiempo puede secar el tejido y acelerar el proceso de autólisis, la rotura celular.

Para este proceso se sumerge la muestra un mínimo de 48 horas, o más si la muestra es de gran tamaño, en formol 35-40% en tampón fosfato 0'1M y pH: 7'5. La proporción de este fijador es de 1:9, 1ml de fijador por 9ml de tampón.

Para preparar el tampón fosfato:

Tampón fosfato 0,1 M pH 7,2		
900 ml	450 ml	1800 ml
3,93 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pm=156,01)	1,866 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pm=156,01)	7,86 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (pm=156,01)
9,171 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pm=141,96)	4,586 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pm=141,96)	18,342 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pm=141,96)

Tras la fijación la muestra se vuelve más consistente, se podría proceder con el tallado, que consiste en la selección de la parte más representativa del tejido. En este caso, y tratándose del sector de la investigación, de este proceso se encarga el mismo técnico, hay que tener en cuenta que en el sector sanitario el tallado siempre lo realiza el personal facultativo.

Una vez fijada la muestra se lava con agua corriente del grifo o destilada, con lo cual se retira el exceso del fijador. Se pueden realizar de 2 a 3 lavados de 5 minutos cada uno. Tras ello, se deja durante 1 hora en etanol al 50%, y luego pasa a etanol al 70%, en el cual se puede dejar la muestra más tiempo debido a su propiedad de conservador.

### 2.2. Deshidratación

A continuación, se comienza con el proceso de deshidratación. La mayoría de los medios de infiltración, como la parafina con la que se realizan los bloques, son hidrófobos, así que el agua debe ser eliminada del tejido antes de procesarlo. Para ello, se va reemplazando el agua de forma gradual con un solvente orgánico, el etanol (Figura 1). Se procede de la siguiente forma:

- Alcohol de 90% durante 1-2 horas.
- Alcohol de 100% durante 1-2 horas.
- Alcohol de 100% durante 1-2 horas.
- Alcohol de 100% durante 1-2 horas.
- Xilol durante 20 minutos.
- Xilol durante 20 minutos.





*Figura 1: Preparando el cambio a etanol 100%.*

Los cambios de etanol pueden verterse al fregadero, pero el xilol se debe desechar en un recipiente adecuado para disolventes no halogenados. Además, el cambio de xilol siempre debe ser realizado en campana debido al riesgo de aspirar gases. (Figura 2)



*Figura 2: Realizando el cambio de xilol en campana de flujo laminar.*

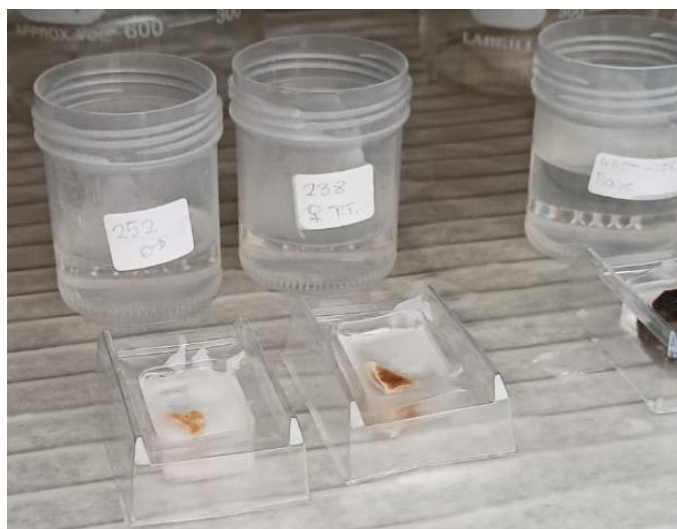
El xilol consiste en un agente aclarante que permite sustituir al deshidratante, el etanol, por una sustancia miscible en el medio de inclusión.

Para obtener las secciones finas que son necesarias para la observación de una muestra se requiere el endurecimiento de ésta. Tras el proceso de fijación se obtiene una consistencia que permite realizar cortes de 20 a 30  $\mu\text{m}$ . Ya que son necesarios cortes aún más finos, se procede con la inclusión.

### 2.3. Inclusión

Es el proceso por el cual se elimina al completo el agua en un tejido, sustituyéndola por un componente sólido que permita mantener la estructura de éste, impidiendo su fragmentación durante el corte. Se realiza para endurecer el tejido, consiste en infiltrar la muestra con una sustancia líquida que tras un proceso de enfriamiento se solidificará sin afectar a la calidad del tejido. Además, también sirve como medio de preservación de la muestra por un largo periodo de tiempo. La sustancia utilizada más común es la parafina.

Tras retirar el xilol, se lleva la muestra a la parafina, previamente calentada en estufa a 56-57°C. Se deja la muestra 1h en parafina, se cambia por parafina limpia transcurrido el tiempo, este nuevo baño debe durar un mínimo de 2h, pero es recomendable que dure toda una noche para asegurar una buena infiltración. Se realiza entonces el montaje de las muestras en los moldes para los bloques, proceso que también puede llevarse a cabo con ayuda de un parafinero (Figura 3). Se deja que solidifique para entonces desmontarlos con unos ligeros golpes (Figura 4). Antes de colocarlos para el corte con el micrótomos es recomendable dejarlos en la nevera, pues con el calor la parafina puede ablandarse y dificultar el corte preciso de la muestra.



*Figura 3: Muestras colocadas en sus moldes con parafina en la estufa.*



*Figura 4: Bloques de parafina sólidos y ya desmontados.*

### Anexo 3. Corte al micróscopo

Antes de comenzar a cortar con el micróscopo se puede retallar el bloque para hacer una pirámide truncada. Con este proceso se considera cuál de las caras del bloque será la primera que entre en contacto con la cuchilla, además de escoger una buena orientación para las secciones de corte una vez se coloque en el portaobjetos. En este caso, al tratarse de muestras grandes que necesitaban todo el ancho del bloque, no se realizó este retallado, sino que se orientaron los cortes en el baño de flotación antes de colocarlos sobre el portaobjetos. (Figura 1)

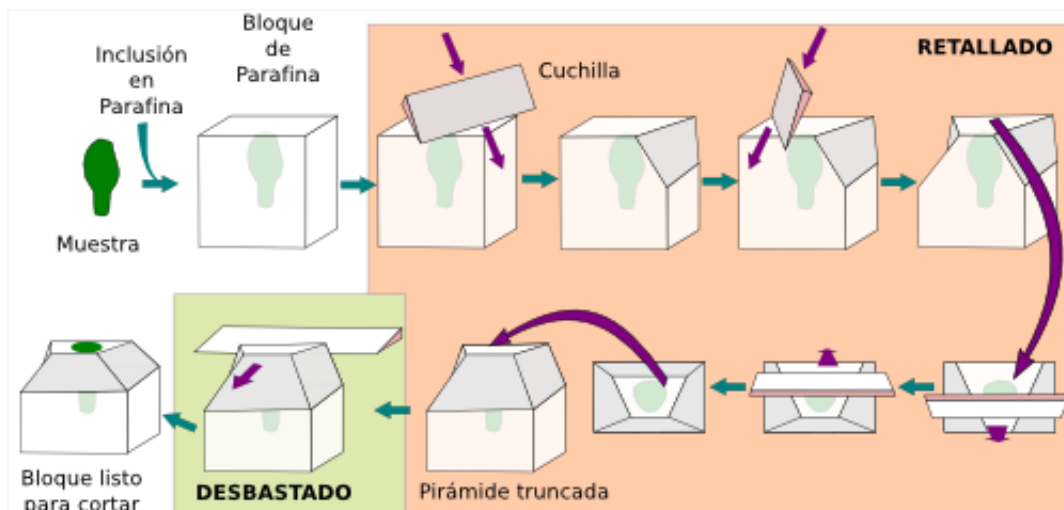


Figura 1: Proceso de retallado para realizar la pirámide truncada y de desbastado.

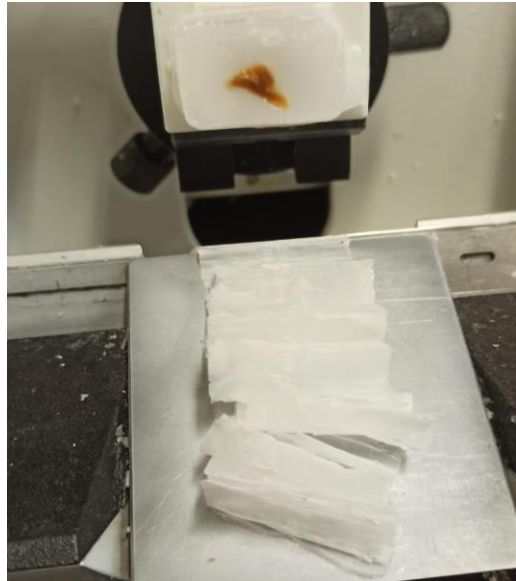
Se entiende por desbastado al proceso de eliminación del espesor de parafina que existe entre la superficie del bloque y la muestra. En el momento de retirar toda esta parafina se utiliza otra cuchilla, preferiblemente gastada, pues se trata de eliminar el sobrante y así podrá reservarse la cuchilla afilada para la realización del corte, consiguiendo alargar la vida útil de ésta. (Figura 2)



*Figura 2: Cambio de cuchilla para comenzar con el corte. Cuchilla para desbastar marcada con D.*

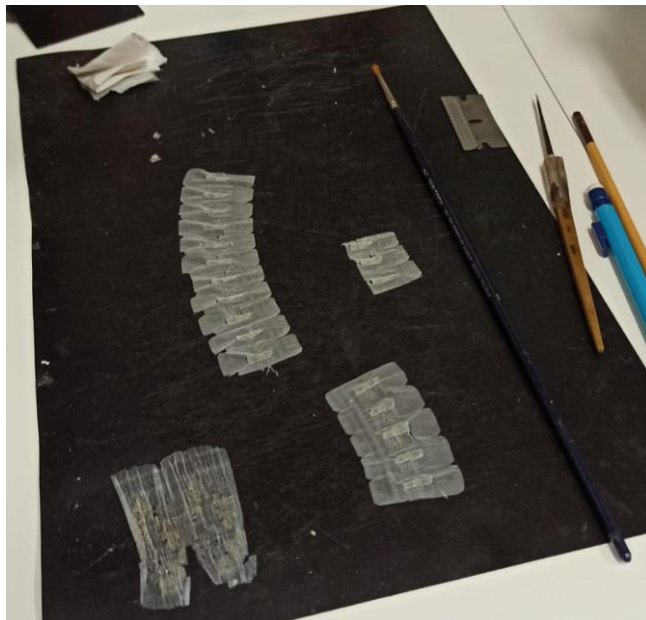
A continuación, para la realización del corte:

1. Se debe colocar el bloque de parafina sobre el portabloques y orientar la cuchilla. Para ello, se hace descender el brazo del portabloques hasta que la superficie del corte entre en contacto con la cara interna de la cuchilla. Se prueba la precisión de la orientación observando si al mover la palanca de rotación, la muestra se aleja o acerca a la cuchilla, incluido el ángulo. Si no se asegura que el bloque y la cuchilla estén paralelos, puede ocurrir que se corte una zona del bloque antes de otra, incluso no conseguir un corte real y romper la muestra. Una vez realizado esto, se debe comprobar que el bloque y la cuchilla se encuentran de forma paralela.
2. Una vez obtenida la orientación adecuada, se fija el bloque de parafina al portamuestras. A continuación, se fija el portacuchillas, utilizando como guía también el bloque de parafina. La orientación de la cuchilla la indicará el ángulo de la misma respecto al bloque. El ángulo medio se encuentra entre los 10 y 15 °, y se ajusta utilizando las palancas de la base del portacuchillas.
3. Se selecciona también el grosor del corte utilizando como guía la ruedecilla situada arriba a la derecha del equipo, junto al panel donde se muestra el grosor numéricamente.
4. Se retira la protección de la cuchilla y se comienza a desbastar el bloque de parafina, una vez se observe que los cortes traen consigo parte de la muestra, se retiran éstos con un pincel para despejar la superficie. Para este procedimiento se utiliza un grosor aproximado de 12  $\mu\text{m}$ . (Figura 3)



*Figura 3: Desbastando el bloque de parafina.*

5. Se continúa con la realización de los cortes, se ajusta el grosor a 7  $\mu\text{m}$ , girando la ruedecilla siempre a la derecha, y se comienzan a realizar los cortes del bloque. Para ello, se deben realizar movimientos rotatorios y continuos del volante de avance, para así obtener una tira continua de cortes que, con la ayuda de las pinzas, se van sujetando para que no se plieguen unas con otras.
6. Una vez que se obtiene la tira de cortes del tejido, se pasa a la cartulina negra con las pinzas, donde con la ayuda del bisturí se realizan cortes sobre las diferentes secciones de la tira para así obtener un único corte. (Figura 4)



*Figura 4: Cortes colocados sobre cartulina negra para su separación.*

7. Posteriormente, se toma un corte y se pasa al baño de flotación con la ayuda del pincel con la punta previamente humedecida. En este apartado se debe tener especial

atención ya que, es imprescindible colocar la cara brillante del corte hacia la superficie. (Figura 5)



*Figura 5: Cortes introducidos en el baño de flotación.*

8. Tras rotular con el lápiz un portaobjetos, se comienza a tomar los cortes introduciendo éste hasta casi hundirlo dentro del baño, levantándolo con un ángulo inclinado una vez la muestra esté colocada en su superficie.
9. Una vez terminado, se colocan los portaobjetos sobre una superficie lisa para permitir que terminen de secarse y adherirse las muestras. Pueden dejarse sobre el borde del baño de flotación siempre y cuando se tenga cuidado de no tirarlos, ya que con el calor que éste desprende podrán secarse más rápidamente. (Figura 6)

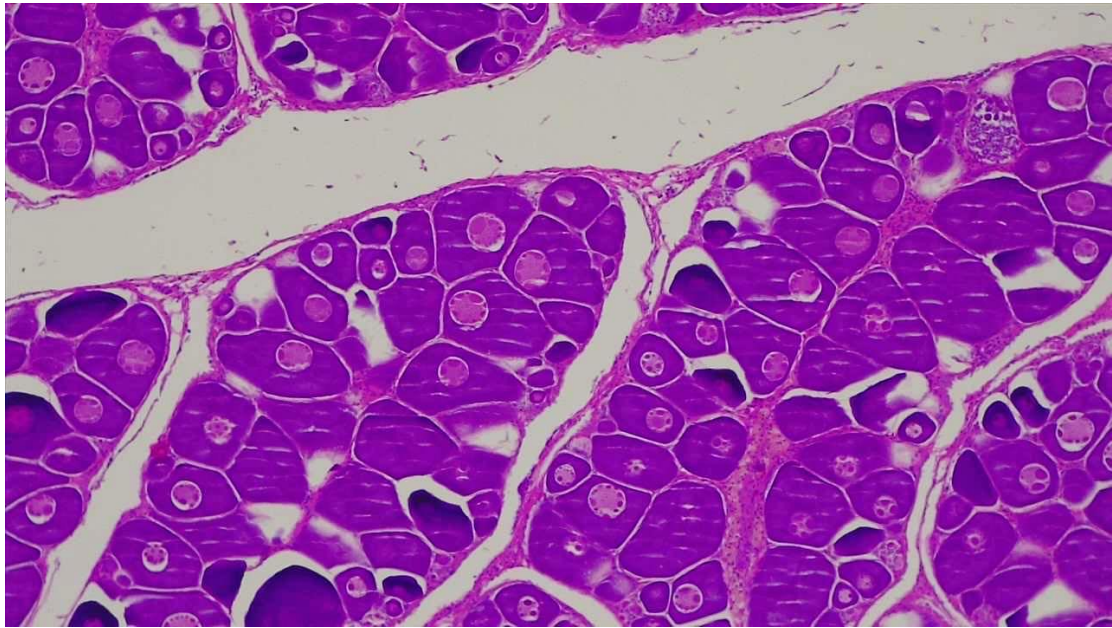


*Figura 6: Cortes ya colocados en los portaobjetos, secándose.*

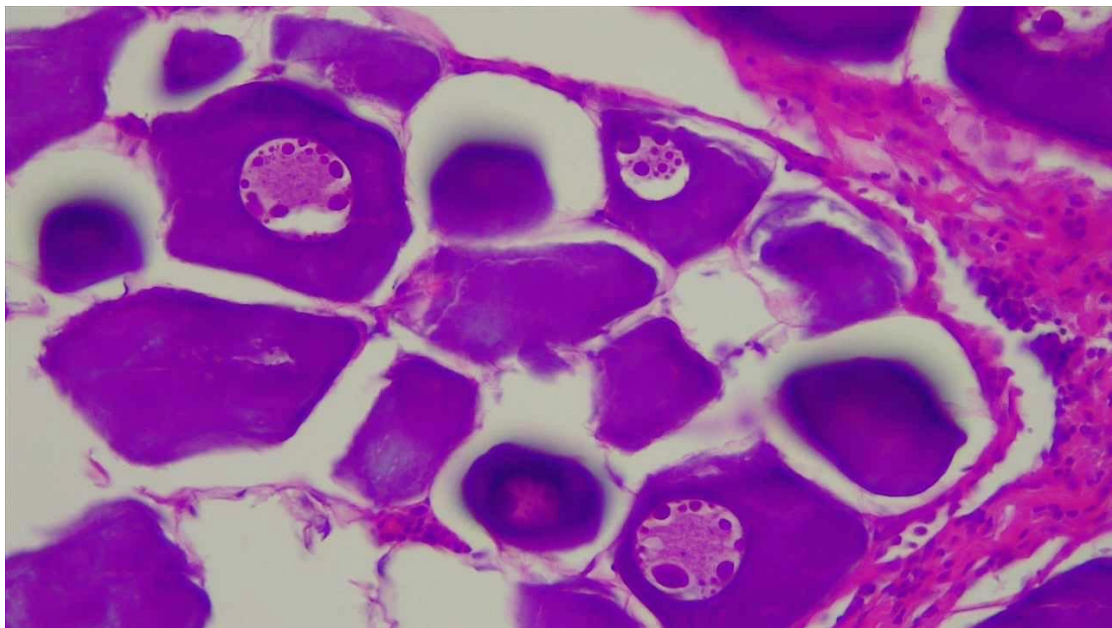
## Anexo 4. Estado de madurez gonadal utilizado en peces [18]

Peces en general	Peces planos (sólo para hembras)
<p><b>1. Inmaduro (EMS I):</b> testículos y ovarios muy pequeños y delgados. Testículos de aspecto blanquecino, ovarios traslúcidos sin ovocitos a simple vista.</p>	<p><b>1. Inmaduro:</b> ovarios muy finos y poco desarrollados. No ocupan toda la longitud del cuerpo. No se ven ovocitos.</p>
<p><b>2. En desarrollo o recuperación (EMS II):</b> ovarios y testículos formados pero de pequeño tamaño. Ovarios de color débilmente rosáceo o amarillento, sin ovocitos a simple vista.</p>	<p><b>2. En desarrollo:</b> ovarios más grandes, pudiendo ocupar todo el cuerpo. Color anaranjado. Con ovocitos opacos.</p>
<p><b>3. Prepuesta o maduración (EMS III):</b> ovarios y testículos más gruesos y formados. Ovarios de color naranja o naranja-amarillo, siendo visibles los ovocitos a través de la membrana ovárica dándole aspecto granuloso, pero sin presencia de ovocitos hidratados. Testículos de color blanco.</p>	<p><b>3. Prepuesta:</b> ovarios muy desarrollados, ocupando todo el cuerpo. Se empiezan a ver ovocitos traslúcidos.</p>
<p><b>4. Puesta o maduro (EMS IV):</b> ovarios y testículos ocupando casi toda la cavidad abdominal. Ovarios de color naranja con bastante vascularización, observándose ovocitos maduros grandes y transparentes listos para la puesta. Testículos de color blanco y aspecto lechoso. Una ligera presión abdominal es suficiente para hacer fluir los huevos o el esperma.</p>	<p><b>4. Puesta:</b> ovarios llenos de ovocitos traslúcidos. Los ovocitos discurren con una leve presión del cuerpo.</p>
<p><b>5. Postpuesta (EMS V):</b> notable reducción de las gónadas, de aspecto laxo y vacío. Ovarios de color rojo oscuro, conteniendo restos de ovocitos que no han alcanzado la maduración y que degenerarán. Testículos con vestigios de hemorragias que les confieren un color blanco muy oscurecido.</p>	<p><b>5. Postpuesta (opacos):</b> ovarios flácidos, con restos de ovocitos. Gónadas atrésicas, muy vascularizadas.</p>

## Anexo 5. Fotografías

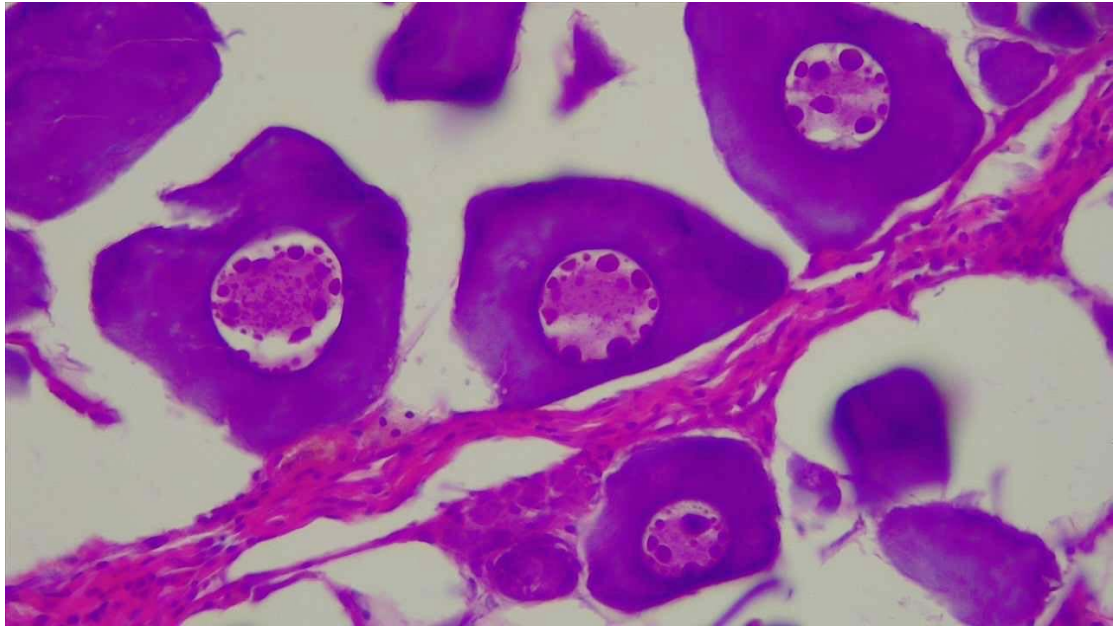


*Figura 1: Imagen al microscopio de ovario de atún 10x*



*Figura 2: Imagen al microscopio de ovario de atún 40x*





*Figura 3: Imagen al microscopio de ovario de atún 40x*

## Anexo 6. Tinción tricrómica de Cajal

### Reactivos:

- **Fucsina básica de Ziehl**

1gr de fucsina básica (diamante) y 5gr de fenol (5ml) en 10 ml de etanol de 96% y 90 ml de agua destilada.

- **Pícrico-indigocarmín**

Disolver 0.4gr de indigocarmín en 100ml de una solución saturada de ácido pícrico (1.5gr)

- **Agua acetificada**

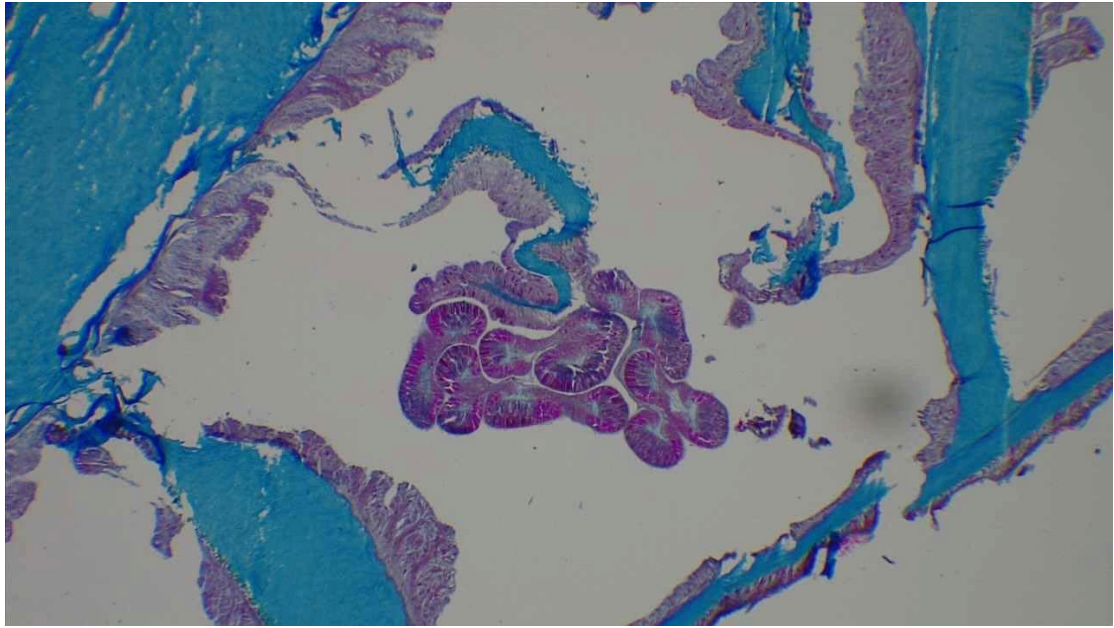
Acético al 0.3-0.5% en agua destilada.

### Procedimiento:

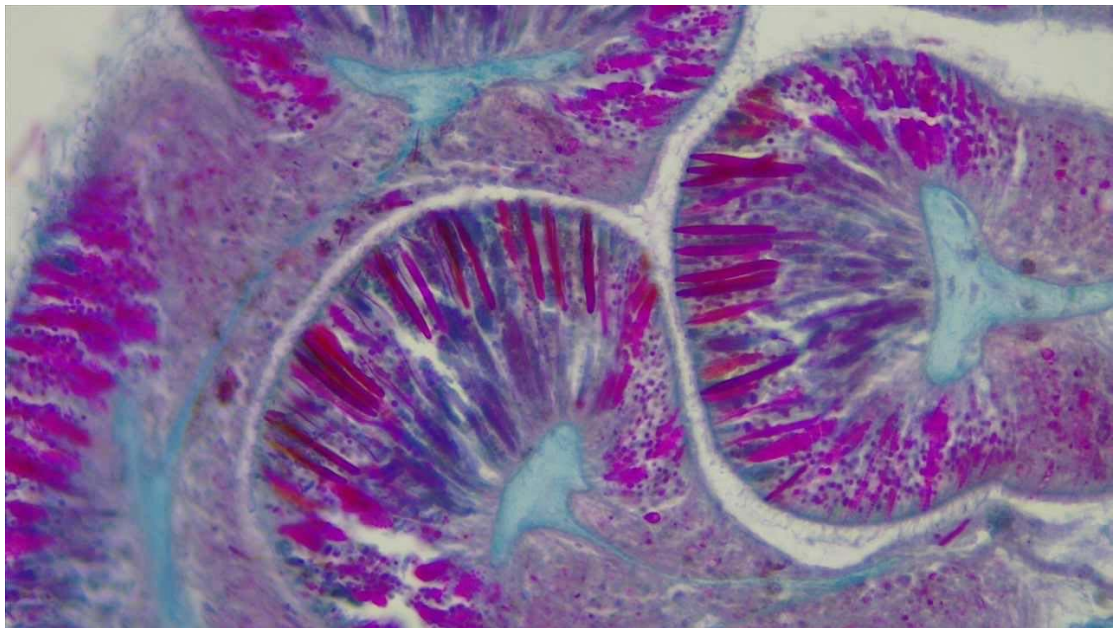
1. Colorear durante 10-15 minutos a temperatura ambiente con una solución 1:9 de Fucsina de Ziehl y Agua destilada (máximo de la actividad de la tinción de 48 horas)
2. Enjuagar el exceso de colorante en una cubeta con agua acetificada una o dos veces. Colorear durante 10 minutos con la tinción pícrico-indigocarmín.
3. Diferenciar el exceso de colorante en 3 pasos de alcohol. El primero de 70% y los dos restantes de 100.
4. Al final del último alcohol de 100 los cortes deben tener una tonalidad gris perla a gris celeste.
5. Cuando consigamos esta tonalidad, se pasan rápidamente a una cubeta con xilol, donde se para la diferenciación. Las muestras deben entrar suavemente en el xilol para no crear turbulencias.
6. Si esta última es de aspecto lechoso significará que la deshidratación de los cortes no ha sido completada y probablemente hayamos perdido el resultado esperado.
7. Finalmente, los cortes se montan con eukit.

La coloración que se observará en la anémona es la siguiente:

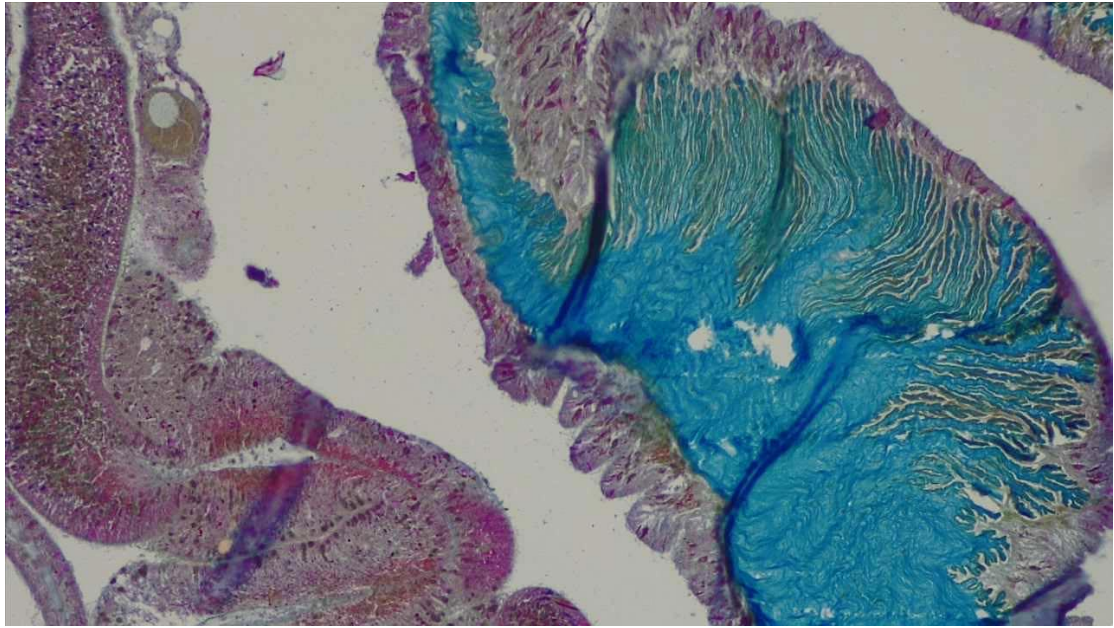
Mesoglea	Celeste
Musculatura	Verde
Epitelios	Rosados
Células granulosa y nematocistos	Rojo intenso



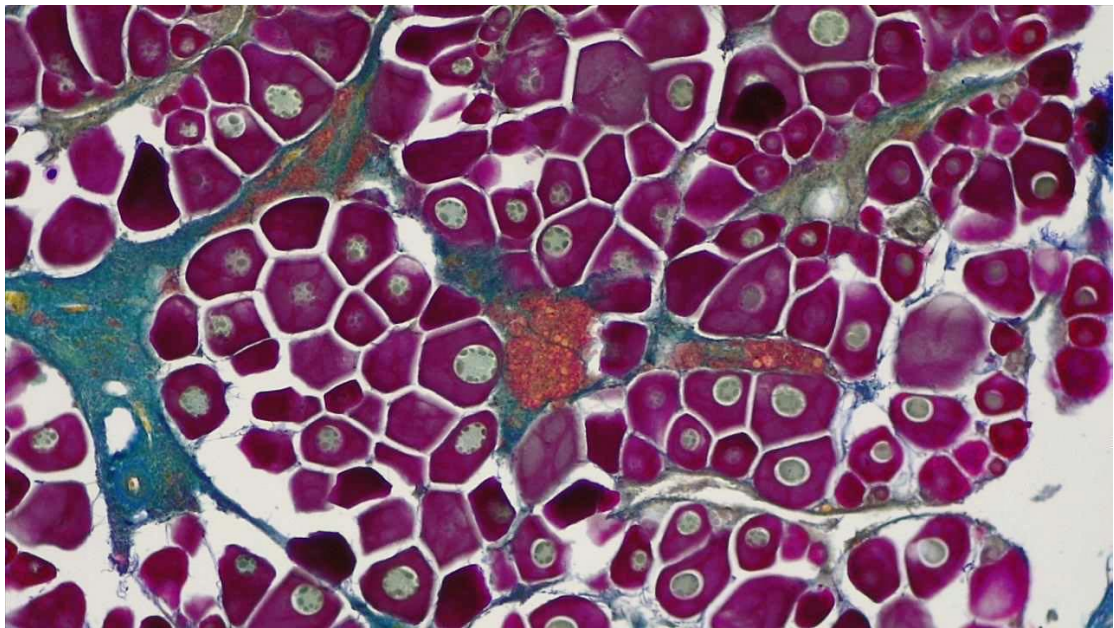
*Figura 1: Imagen al microscopio de anémona desconocida. 4x*



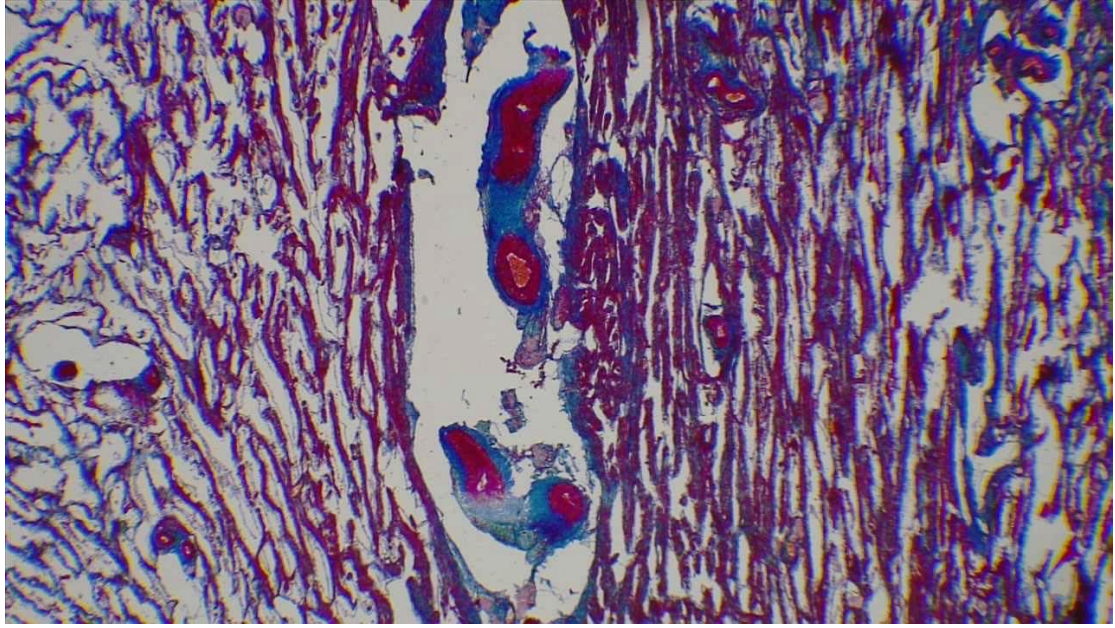
*Figura 2: Imagen al microscopio de anémona desconocida. 40x*



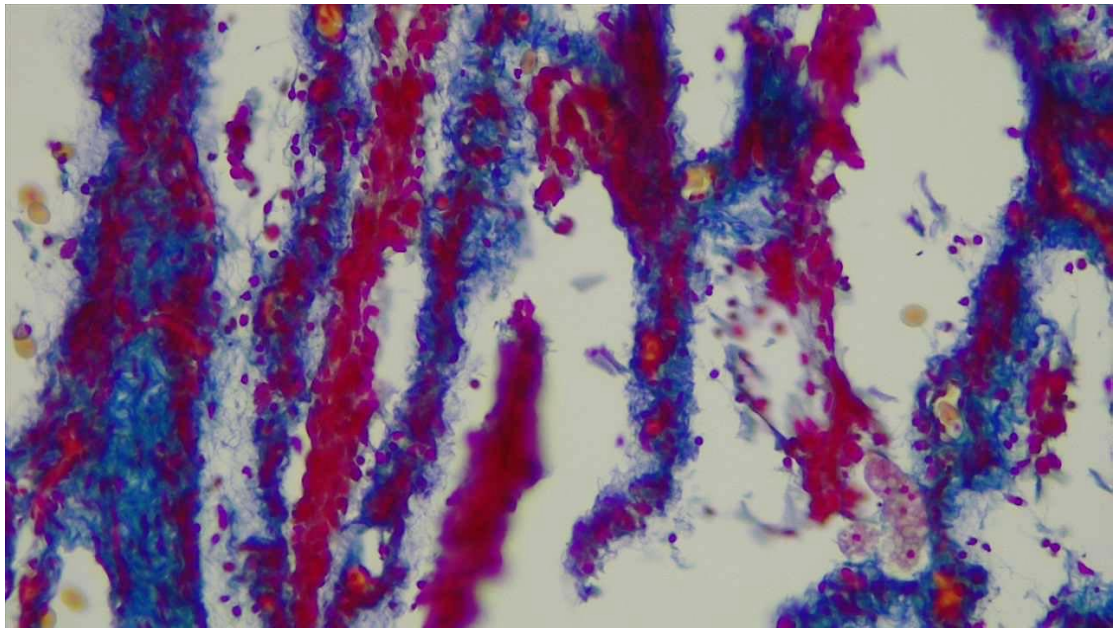
*Figura 3: Imagen al microscopio de anémona desconocida. 10x*



*Figura 3: Imagen al microscopio de ovario de atún 10x.*



*Figura 4: Imagen al microscopio de testículo de atún. 4x*



*Figura 5: Imagen al microscopio de testículo de atún. 40x*