



Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE
Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura
Carrera de Ingeniería en Biotecnología

**Proyecto de Titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniero en Biotecnología**

“Evaluación histológica de tejido hepático porcino conservado en miel de abeja”

Ortiz Yépez, Carlos Eduardo

Director: Proaño Pérez, Freddy Wellington, Ph.D.

Sangolquí, 24 de agosto 2023



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



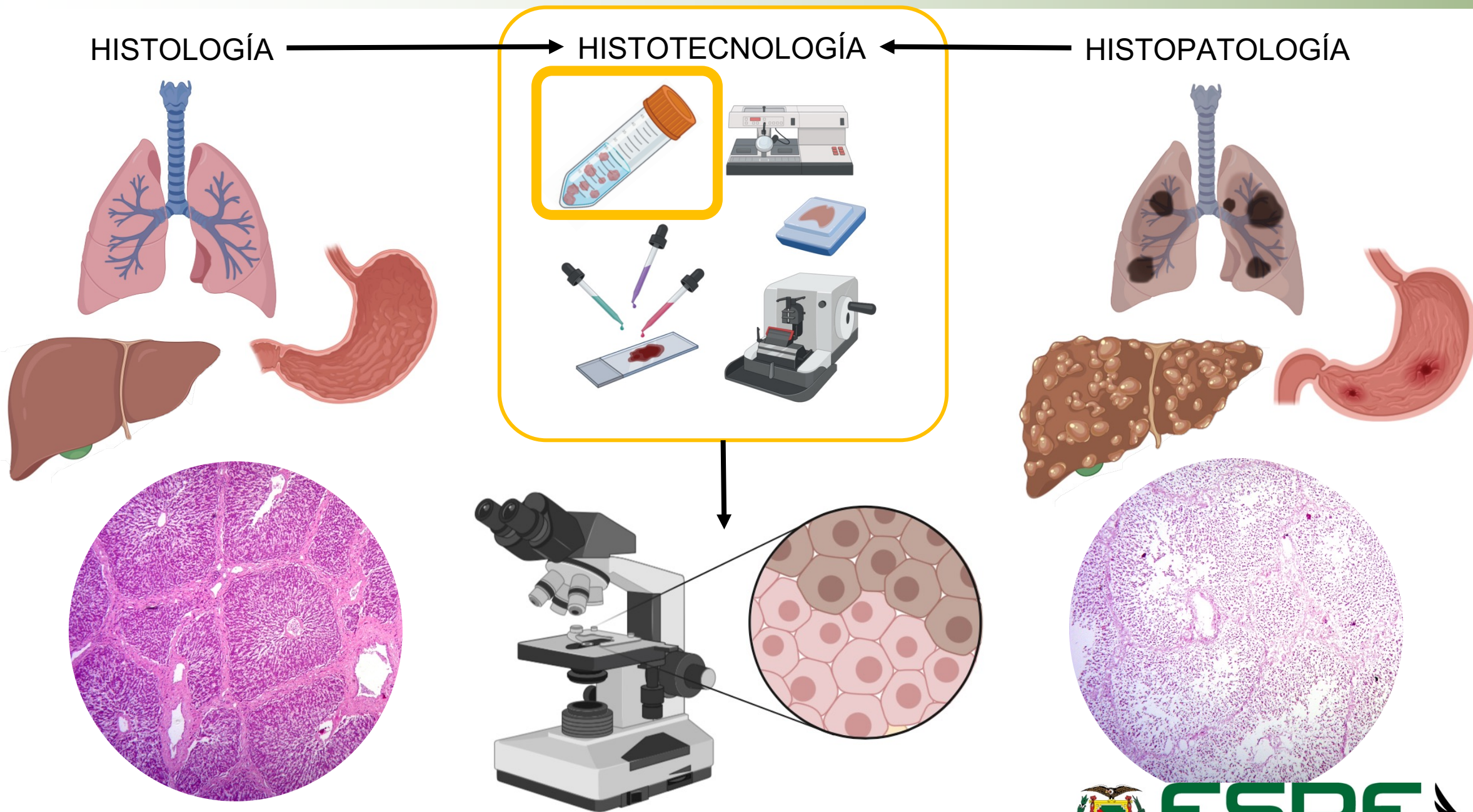
Conclusiones

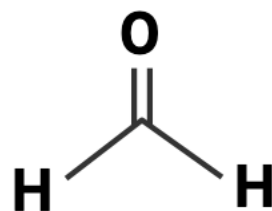


Recomendaciones



Introducción





FORMALDEHÍDO

Reg. No.: 50-00-0

IUPAC: Metanal

Comercial: Formalina, formol

Masa molecular relativa: 30.03

Gas incoloro de olor penetrante

Solución saturada al 40%

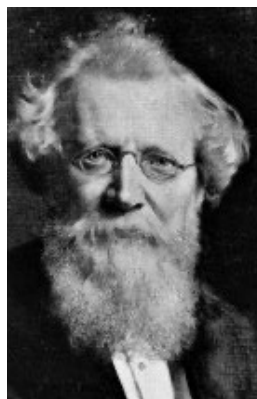


1859 Alexander Butlerov



DESCUBRIMIENTO

1868 Van Hoffmann



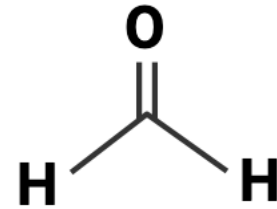
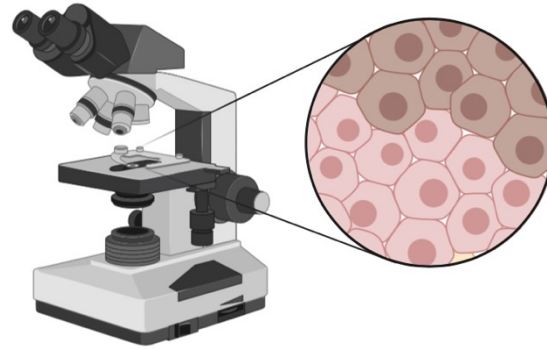
SÍNTESIS



Ferdinand Blum
1893

Médico

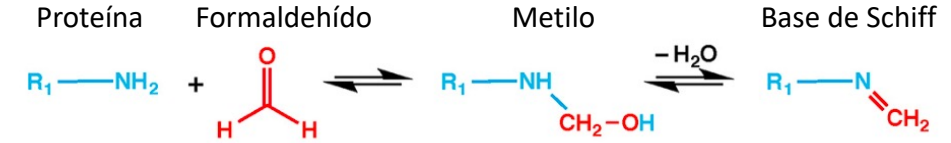
Bactericida
Conservante



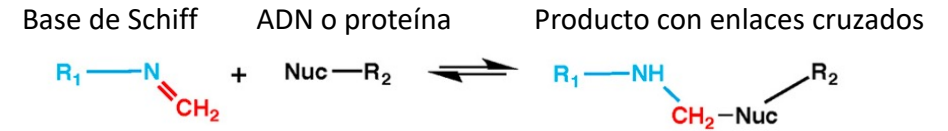
FORMALDEHÍDO

Formación de enlaces cruzados

Paso 1



Paso 2



International Agency
for Research on Cancer



Citotoxicidad
Genotoxicidad
Carcinogénesis



Fijador para histología
Solución formaldehído neutro 4%

Fijador/Conservante:

Interrumpir procesos de
descomposición (autólisis y la
putrefacción)

Conserva integridad estructural

Endurece los tejidos



ALTERNATIVA QUÍMICA



ALTERNATIVA BIOLÓGICA



Conservante o fijador
Histología
Fácil obtención
Económica
No tóxica

(Thamilselvan et al., 2021) (Titford & Horenstein, 2005).

Antioxidantes

Aldehídos,
furanos, cetonas,
bencenos y sus
derivados

Antibacterianas

Ácidos (pH 3.2 -
4.5): acético,
cítrico, glucónico y
otros.

17% H₂O
82% Azúcares

Aminoácidos
enzimas, vitaminas y
minerales

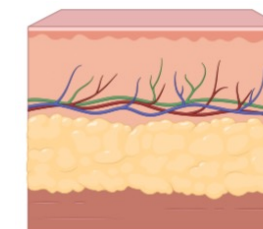
MIEL DE ABEJA



Apis mellifera



Producto biológico de composición
compleja y variable.



Mānuka Honey Ointment

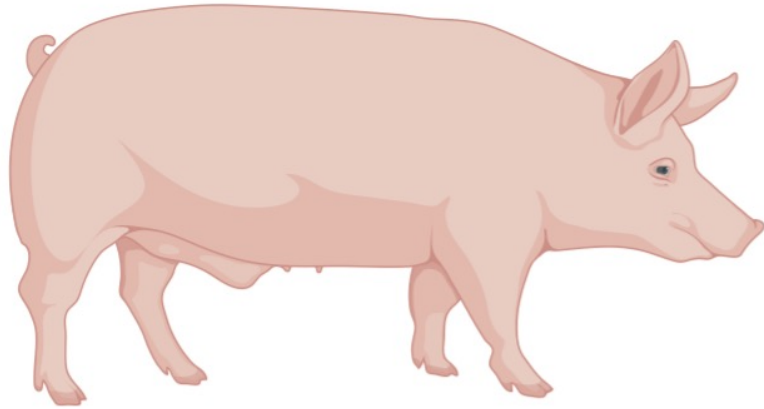
The natural choice
in first aid for minor
cuts and burns.

Net Weight
1oz – 28.4g

+
MEDICAL
GRADE
MĀNUKA
HONEY

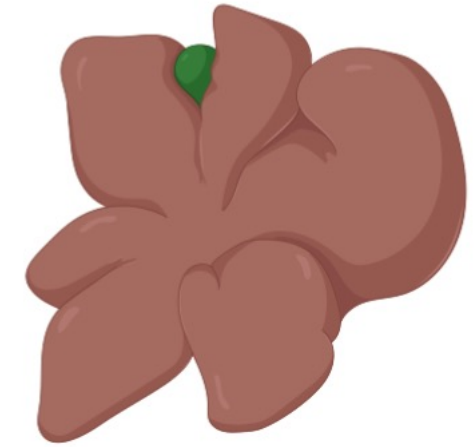
Momificación
Embalsamiento
Curación de heridas
Injerto de tejidos
Histología

MODELO PORCINO

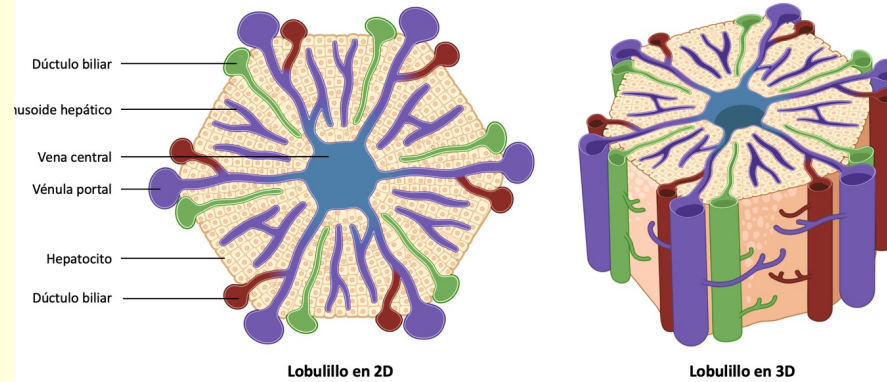
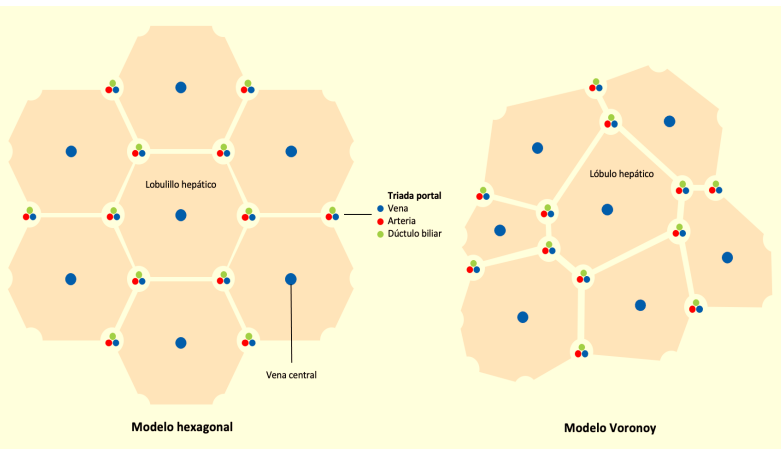


Fisiología y anatomía similar al humano

Aplicaciones:
Diagnóstico médico
Investigación
Ingeniería de tejidos



El hígado - funciones del metabolismo, desintoxicación, producción y excreción de bilis.

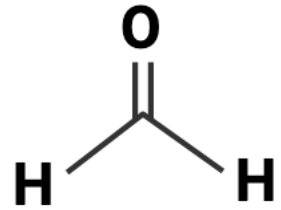


Los ángulos con triadas portales (Ducto biliar, vena portal, arteria hepática)

lobulillos de 1 a 2 mm, demarcados por tejido conectivo

80% Hepatocitos de entre 25 a 40 μm

100 000 y 200 000 hepatocitos ordenados en filas paralelas formando canales o sinusoides.



FORMALDEHÍDO



Disminuir o amortiguar
emisiones y exposición

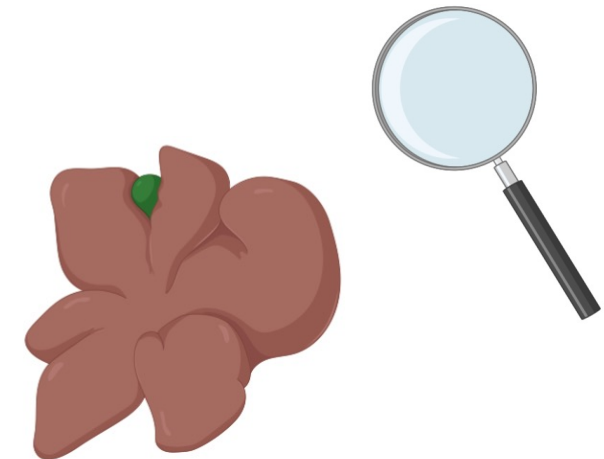


Medio de transporte conservante
provisional de tejidos

Alternativa ante la ausencia o riesgo de uso
del formaldehído

Hasta que la muestra llegue a un laboratorio
donde pueda ser fijada convencionalmente.

Existen diferencias estadísticas significativas en la histología de tejido hepático porcino conservado con miel de abeja.



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones



Objetivo General

Evaluar histológicamente tejido hepático porcino conservado en miel de abeja.

Objetivos Específicos

- **Valorar mediante criterios histomorfológicos, la arquitectura celular, autólisis, y calidad de la tinción hematoxilina/eosina** en muestras de tejido hepático porcino conservadas con solución de miel de abeja al 10% y 20%, solución de formaldehído al 4% y solución de suero fisiológico al 0.9%, durante 10 días.
- **Determinar los efectos de la contracción celular mediante morfometría de los perímetros y áreas celular y nuclear de hepatocitos** de muestras de tejido hepático porcino conservadas con solución de miel de abeja al 10% y 20%, solución de formaldehído al 4% y solución de suero fisiológico al 0.9% con tinción hematoxilina/eosina, durante 10 días.



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



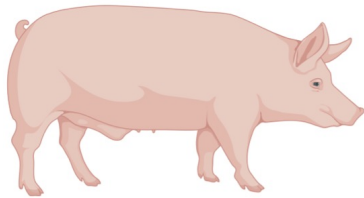
Conclusiones



Recomendaciones



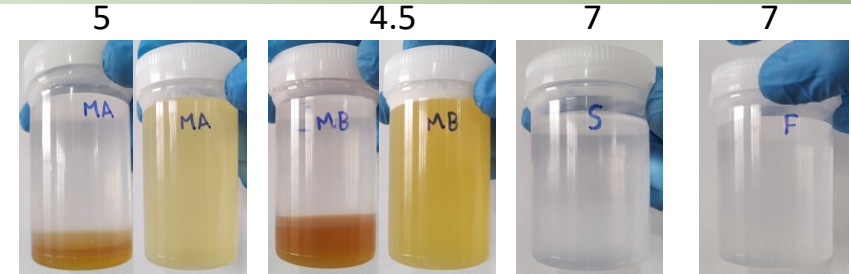
La muestra



Hígado sano y fresco
Peso: 1.375 kg
Macho adulto (100 kg)
Raza: Yorkshire
Edad: 22 semanas



pH

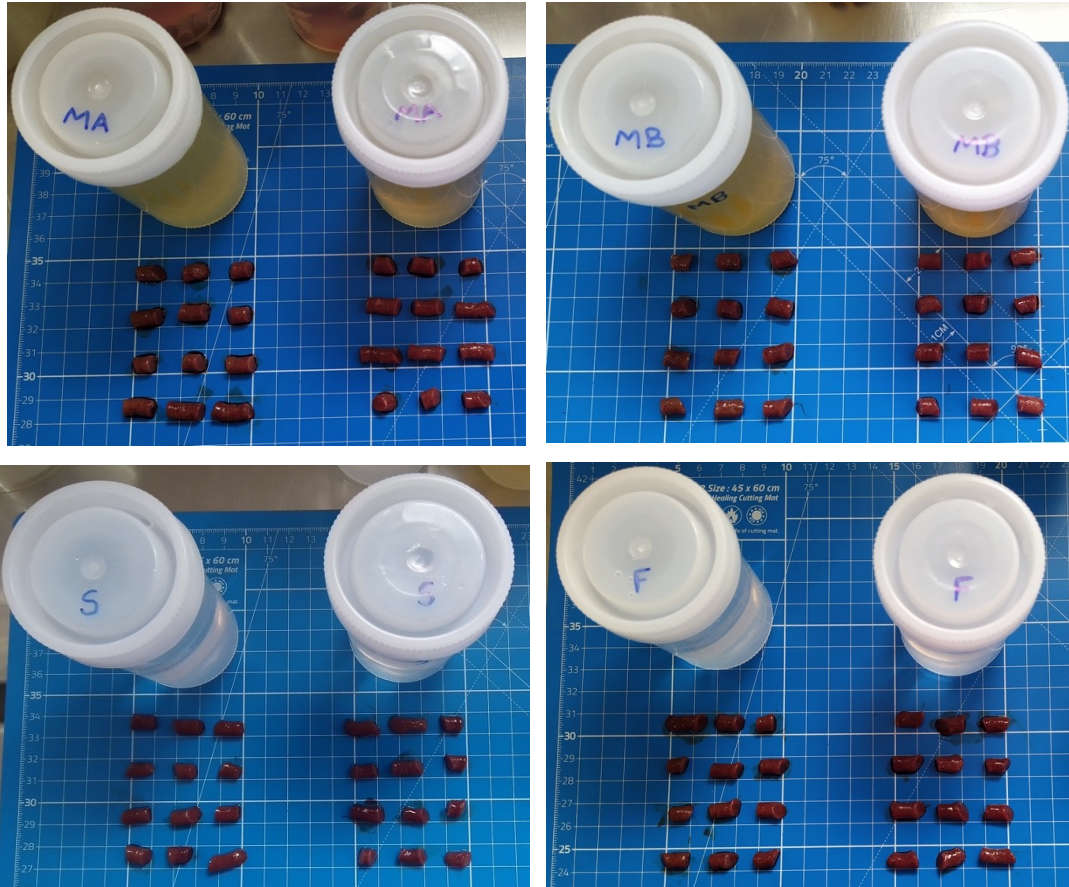


MA: Miel de abeja 10%
MB: Miel de abeja 20%
F: Formaldehído 4% (C +)
S: Suero fisiológico 0.9 (C -)



8 x 10 mm

TOTAL: 80 fragmentos de tejido hepático porcino



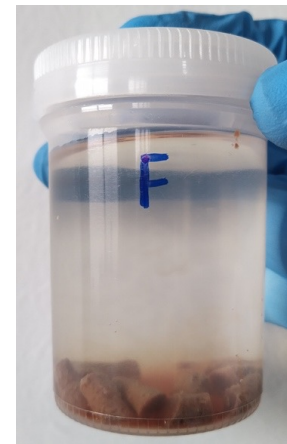
Miel de abeja
10%



Miel de abeja
20%



Formaldehído
4%



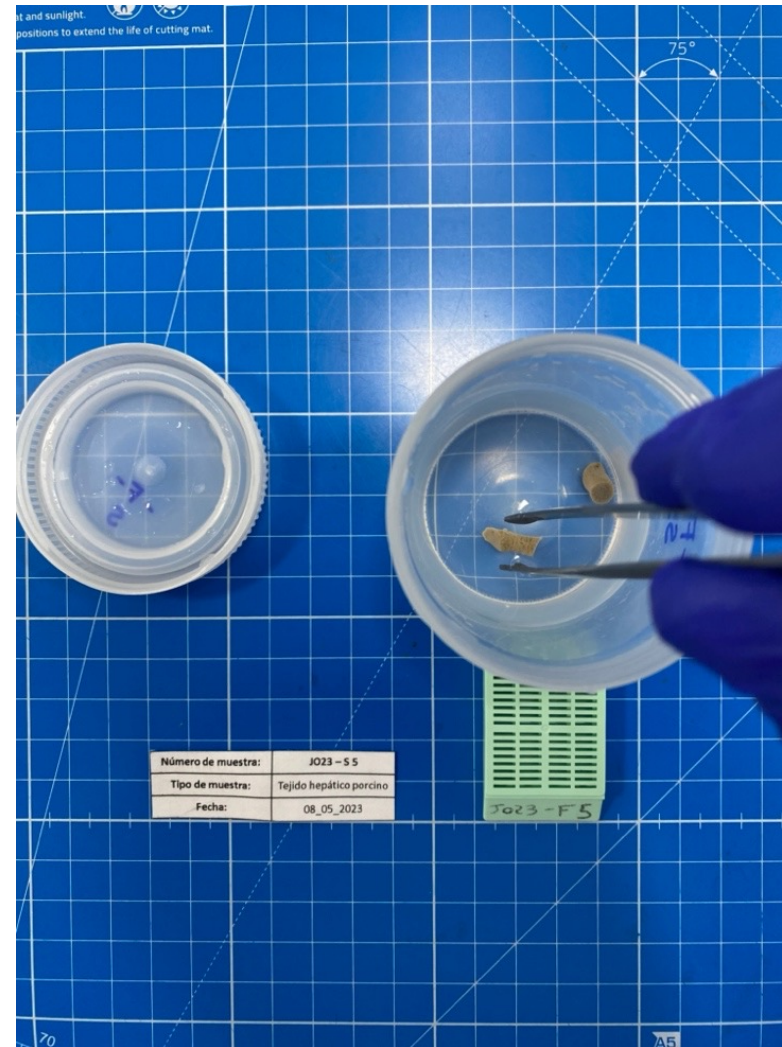
Suero fisiológico
0.9%



FIJACIÓN INICIAL

10 días
Cada día
2 fragmentos

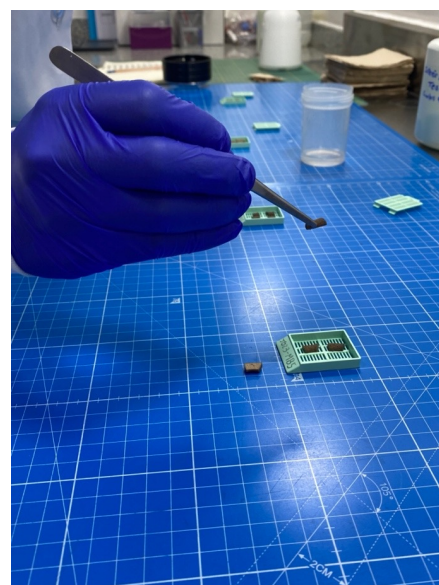
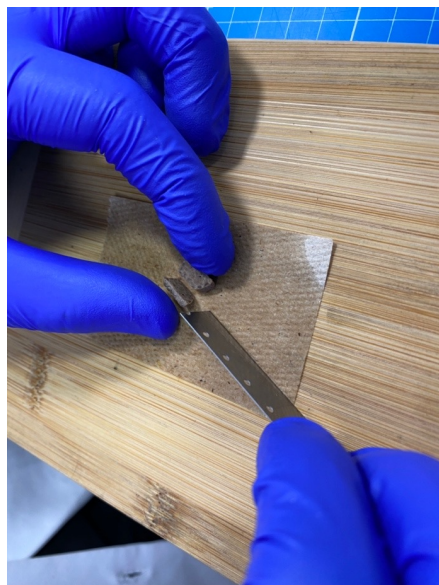
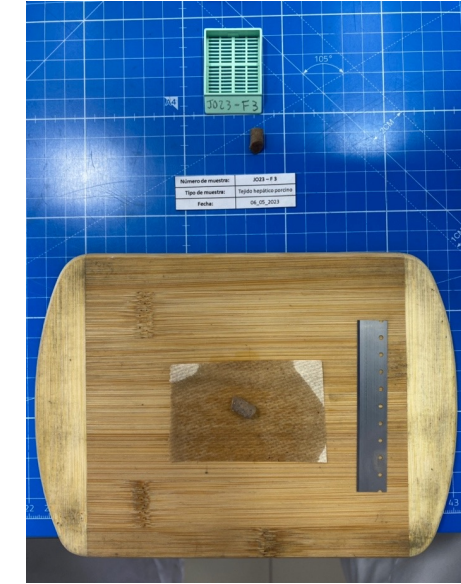
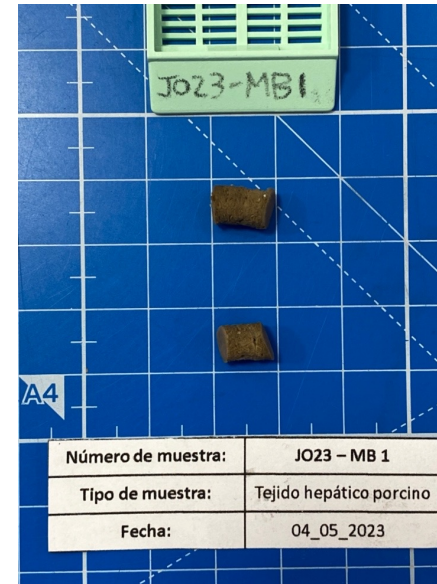
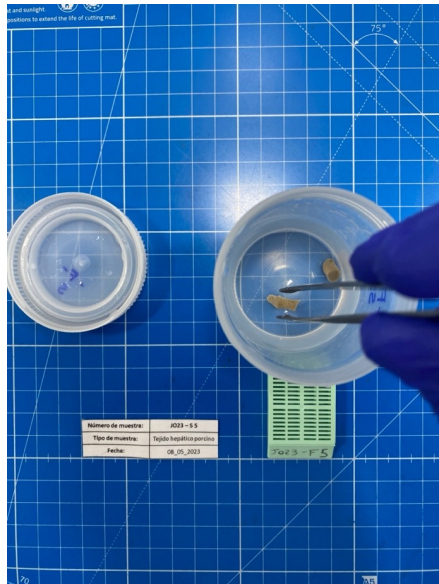
Solución fijadora de
formaldehído al 4%



Este proceso permitió
detener la descomposición
del tejido

Firmeza para facilitar su
corte

DISECCIÓN



HISTOTECNOLOGÍA

Fijación/Deshidratación (etanol)/Aclaramiento (Neo-Clear)/Infiltración (Histoplast)



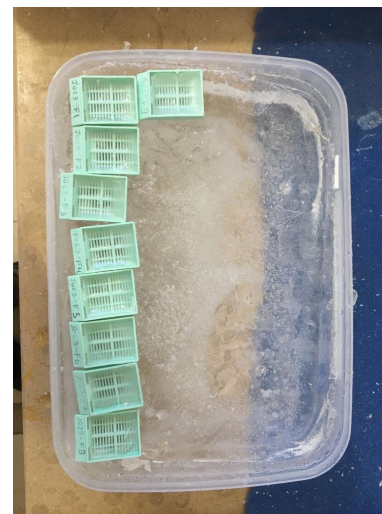
Incrustación



Bloqueo



Enfriamiento Crio- consola



Hidratación



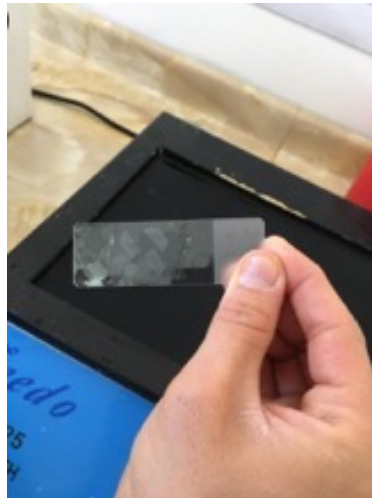
Microtomía



Microtomía



Microtomía



Estufa



Protocolo de tinción con hematoxilina/eosina

Reactivo	Tiempo (minutos)	Inmersiones (veces)
Xileno	2	10
Xileno	2	10
Xileno	2	10
Etanol al 100%	2	10
Etanol al 95%	2	10
Etanol al 95%	2	10
Agua corriente	2	10
Hematoxilina	10-15	50
Agua corriente	2	10
Agua corriente	2	10
Ácido hidrocórico al 1% en etanol al 70%	1-2	5-10
Agua corriente	2	10
Agua de amonio al 0.25%	10-30 segundos (azulado)	2-3
Agua corriente	2	10
Agua corriente	2	10
Eosina	1-3	10-20
Etanol al 70%	2-3	10-15
Etanol al 95%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Etanol al 100%	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15
Xileno	2-3	10-15

Tinción



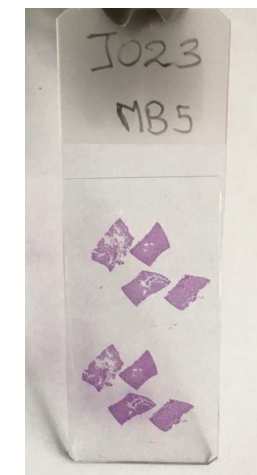
Tinción



Cubrimiento



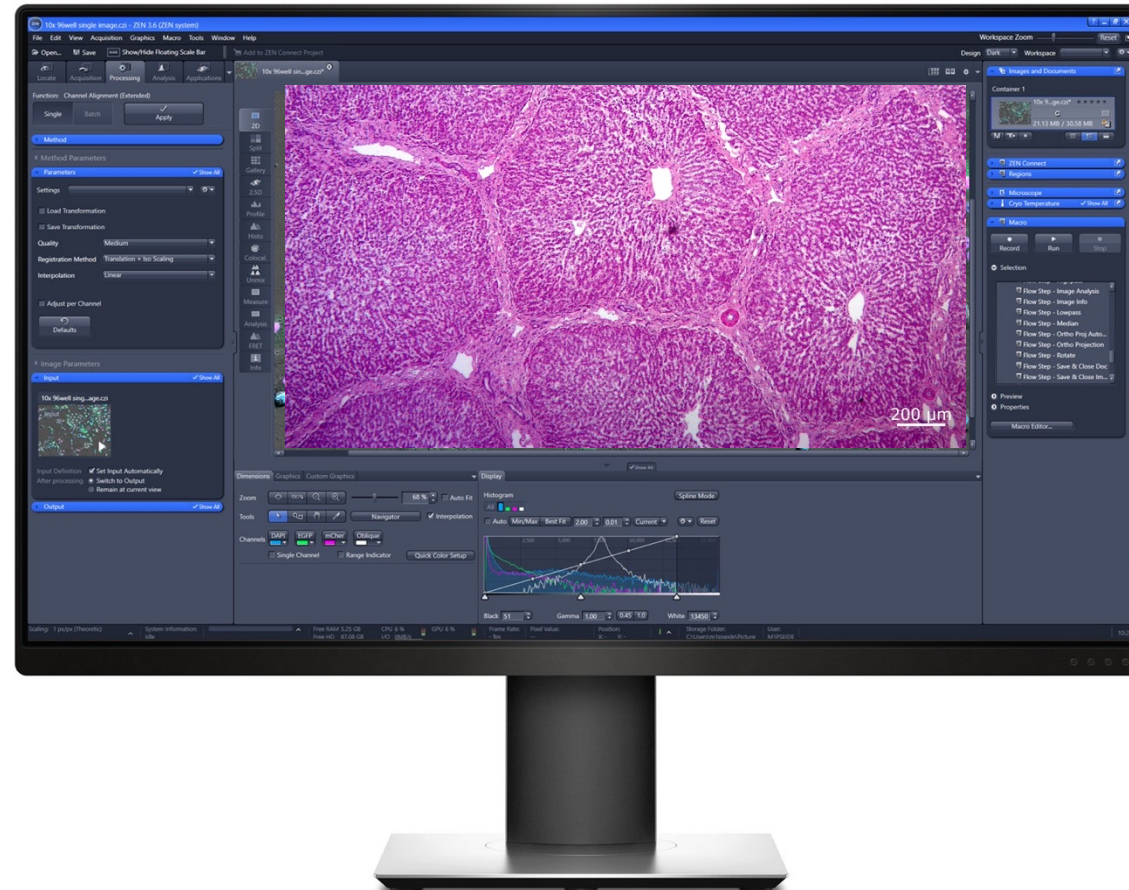
Laminilla





Microscopio óptico Primo Star (© Carl Zeiss)

ZEISS ZEN versión 3.8

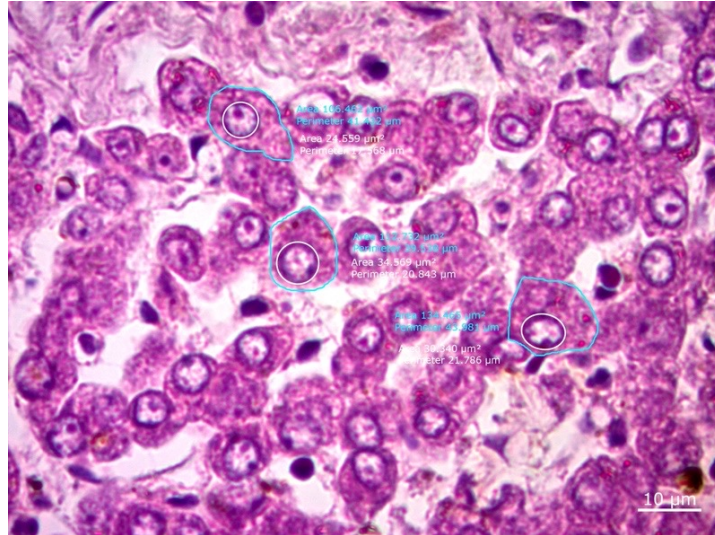


4X (para lobulillos),
10X (para lobulillos),
40X (para los
sinusoides y las
triadas portales)

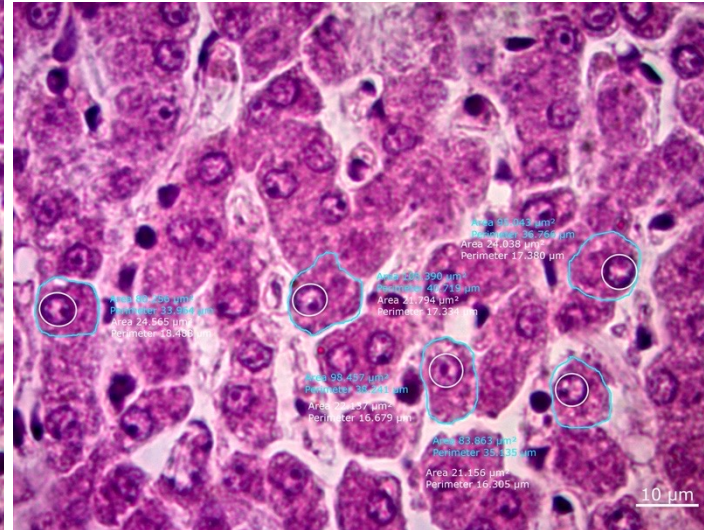
100X (para los hepatocitos en cinco campos ópticos / 6 hepatocitos por campo)

DETALLE CELULAR Y NUCLEAR MORFOMETRÍA DÍA 3 (100X)

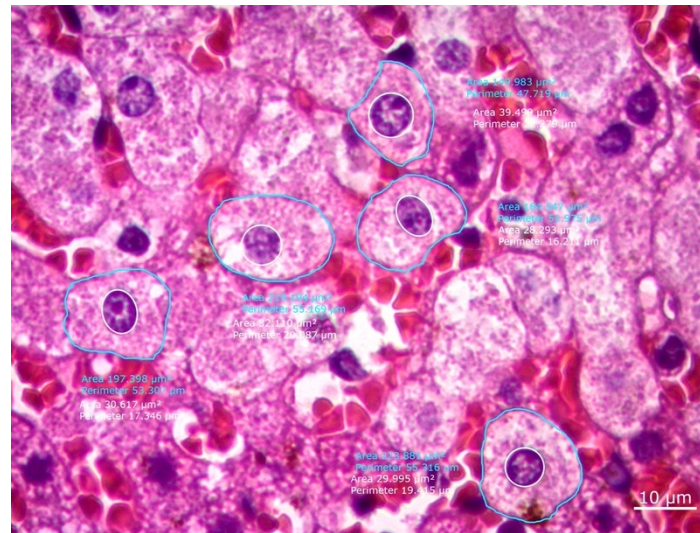
MA



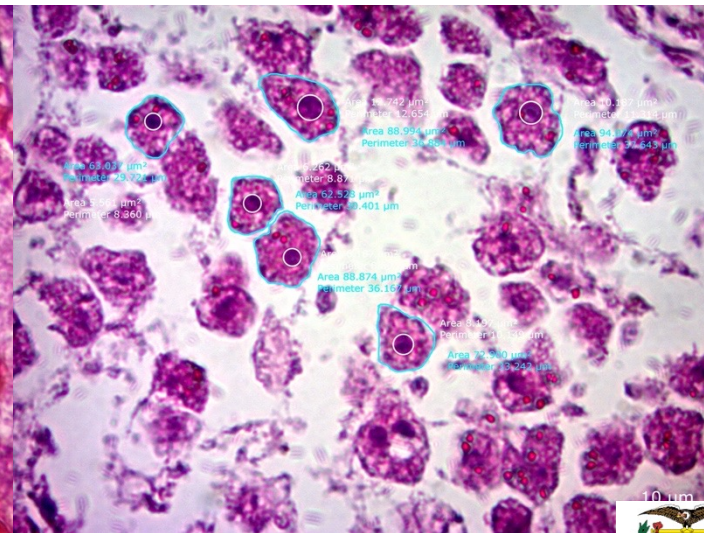
MB

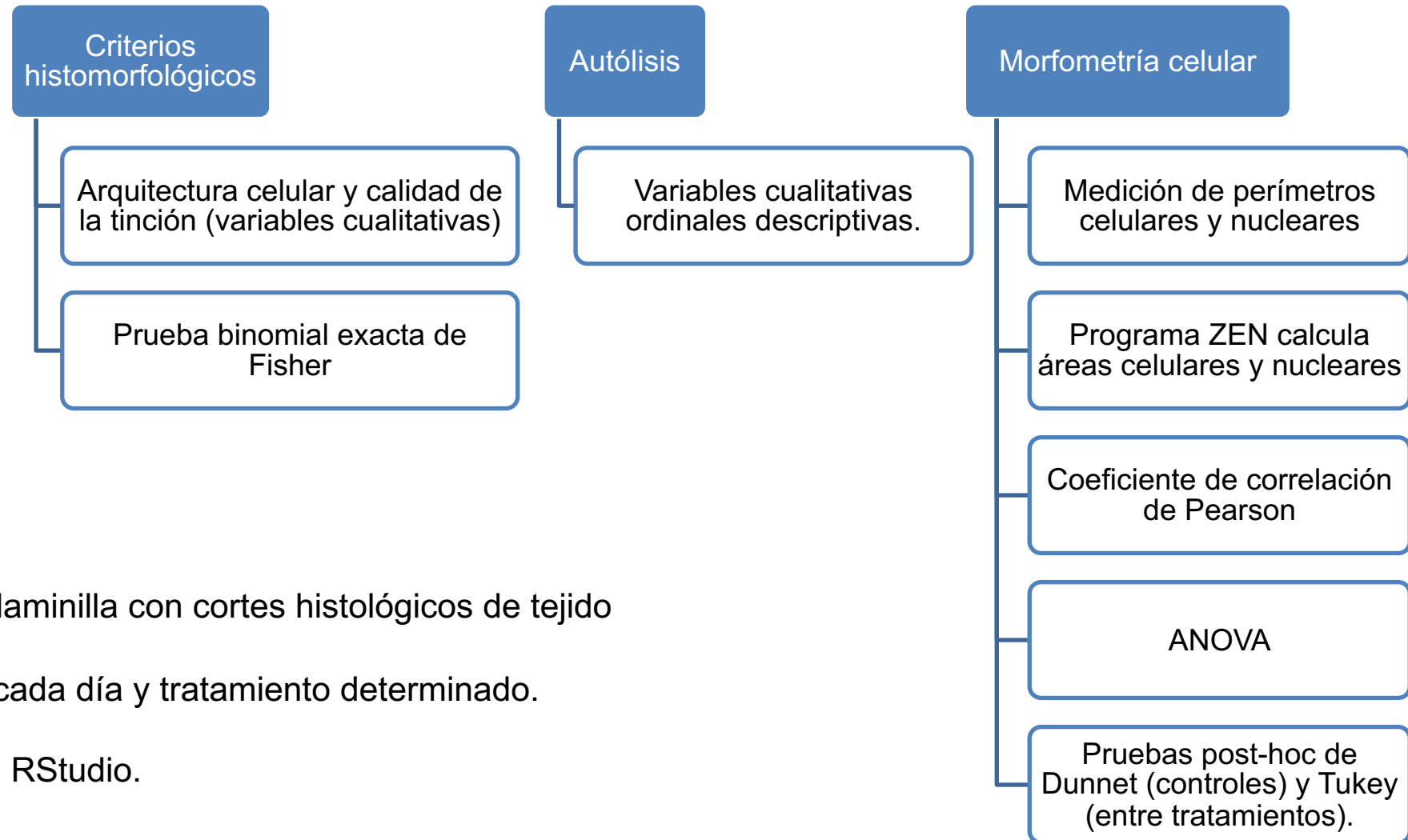


F



S





Análisis estadístico

Unidad experimental: laminilla con cortes histológicos de tejido

hepático porcino, por cada día y tratamiento determinado.

Análisis con programa RStudio.

valor-p ≤ 0.05

Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de arquitectura celular

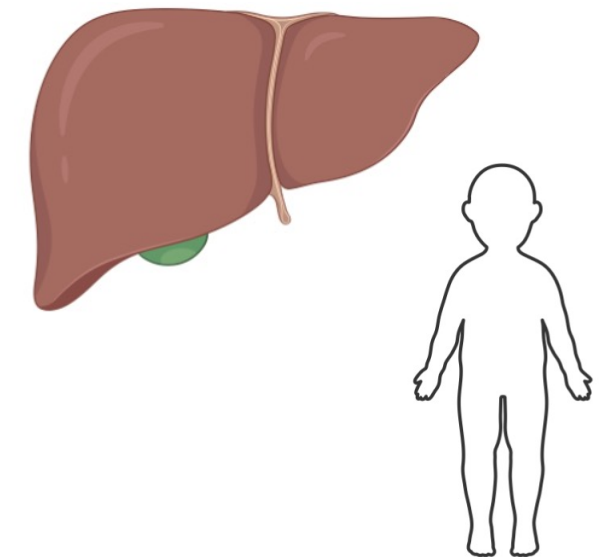
Variable		Puntuación
Detalle celular (hepatocito)	Detalle del núcleo (hepatocito)	1 (aceptable) 0 (inaceptable)
Membrana citoplasmática, delimitada e intacta Contraste Núcleo: Citoplasma marcado	Membrana nuclear Delimitada Intacta	1
Membrana citoplasmática, no delimitada o desintegrada Contraste Núcleo: Citoplasma indistinguible	Membrana nuclear No delimitada Desintegrada	0

Operacionalización de variables de la calidad de tinción Hematoxilina/Eosina

Variable		Puntuación
Tinción de citoplasma (hepatocito)	Tinción de núcleo (hepatocito)	1 (aceptable) 0 (inaceptable)
Citoplasma rosa	Núcleo violeta azulado	1
Citoplasma violeta	Núcleo violeta oscuro	0

Operacionalización de variables de criterios histomorfológicos de autólisis.

Lobulillos	Variables		Puntuación (0-5)
	Sinusoides	Triadas portales	
Distintos y distinguibles	Distintos y distinguibles Hepatocitos alineados	Distinguibles	0
Moderadamente distinguibles	Moderadamente distinguibles Pérdida leve de la alineación de hepatocitos	Moderadamente distinguibles Desintegración leve Dispersión del colágeno	1
Solitarios distinguibles	Poco distinguibles Pérdida moderada de la alineación de hepatocitos	Poco distinguibles Desintegración moderada Dispersión del colágeno	2
Poco distinguible	Difícilmente identificable Pérdida grave de la alineación de hepatocitos	Difícilmente distinguibles Desintegración avanzada Restos de colágeno	3
Difícil de distinguir	No identificable Pérdida completa de la alineación de hepatocitos	Desintegración completa Restos de colágeno	4
No identificable	No identificable	No identificable	5



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones



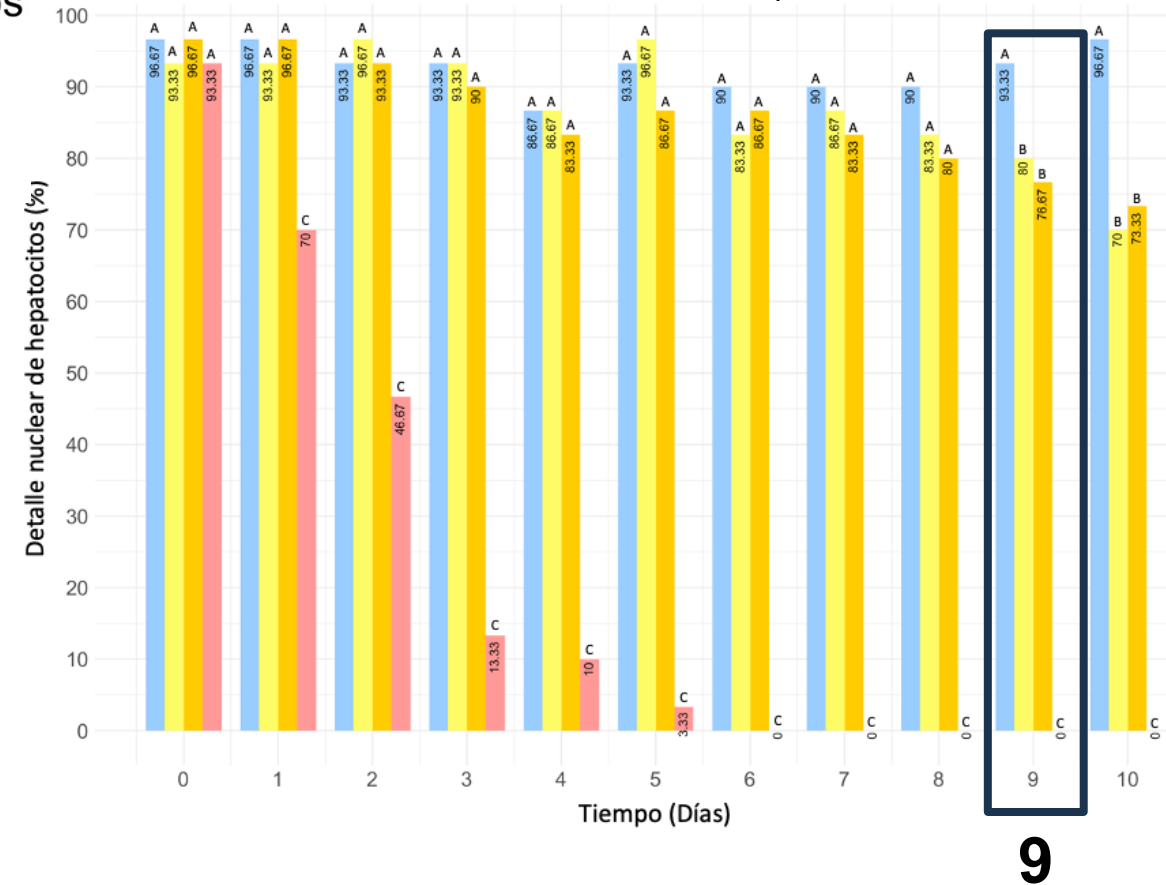
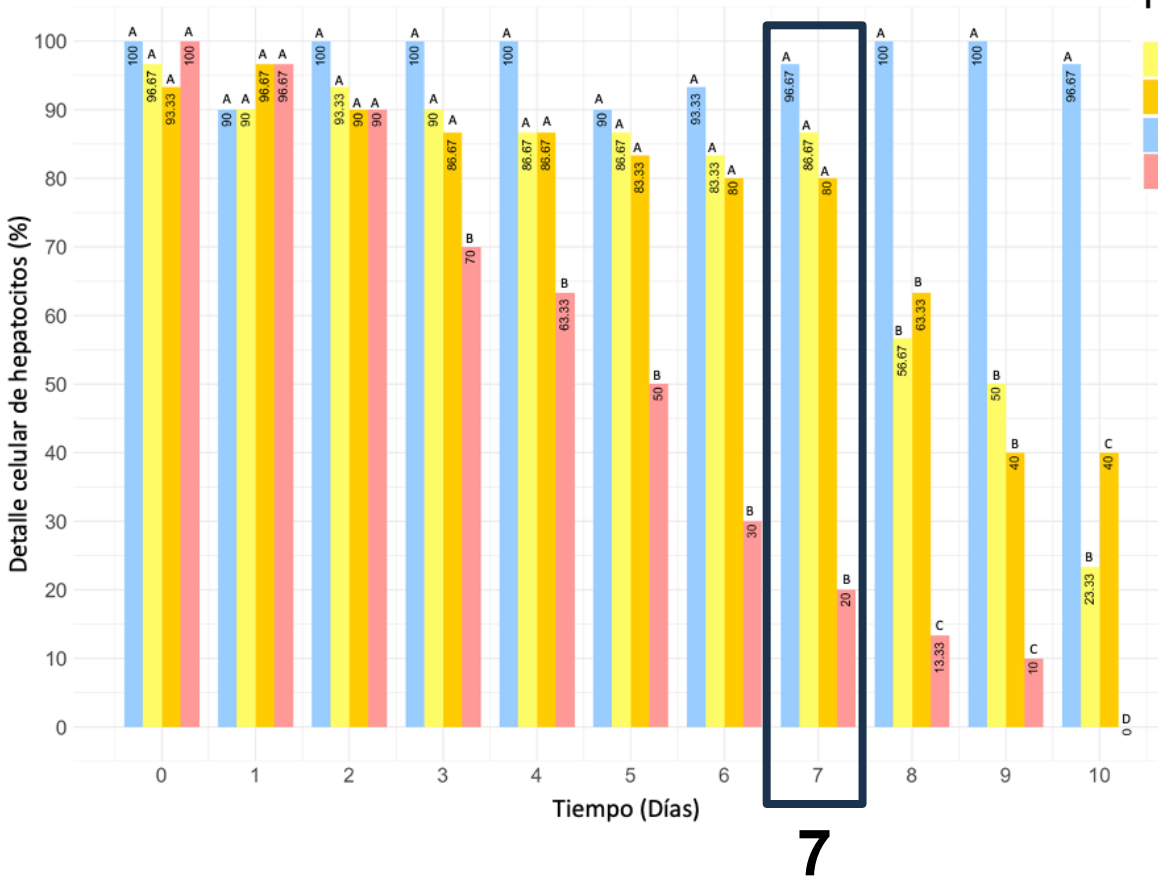
ARQUITECTURA CELULAR

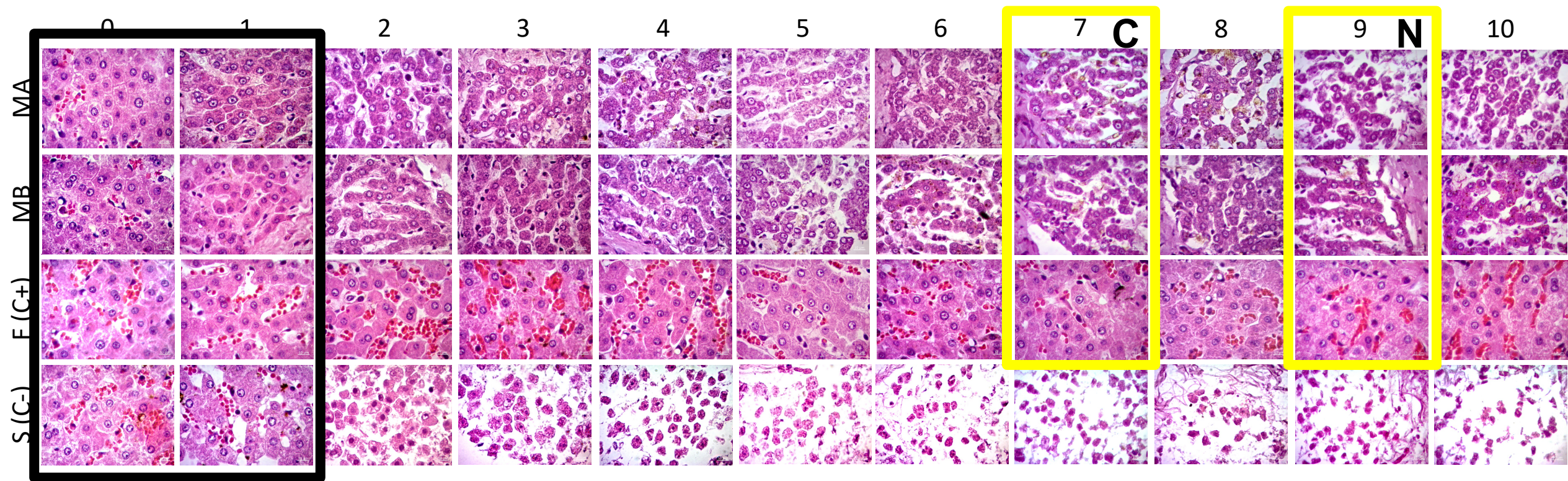
Detalle celular de los hepatocitos

Tratamientos

- MA
- MB
- F (C+)
- S (C-)

Detalle nuclear de los hepatocitos





24 horas

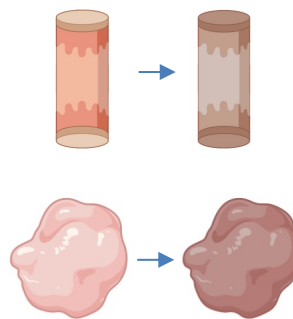


Tiempo mínimo



Hígado
24 horas
Miel de abeja al 10%

Excelentes
detalles
celulares



F: 1 mm/hora
M: ¿? mm/hora



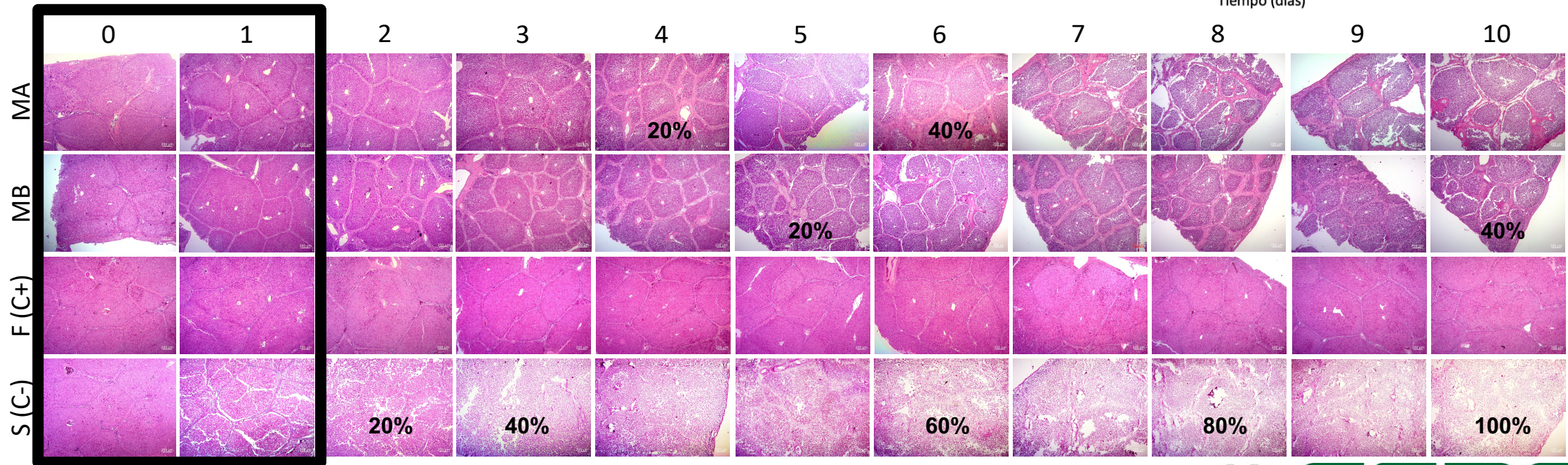
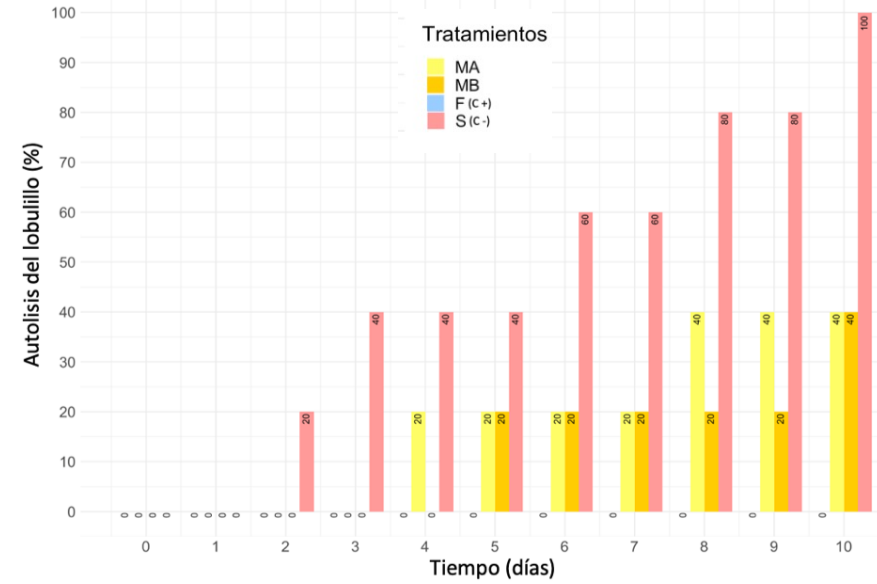
Buen detalle celular
(IHQ)



Miel pura
>30 días

Buen detalle celular

AUTÓLISIS LOBULILLOS

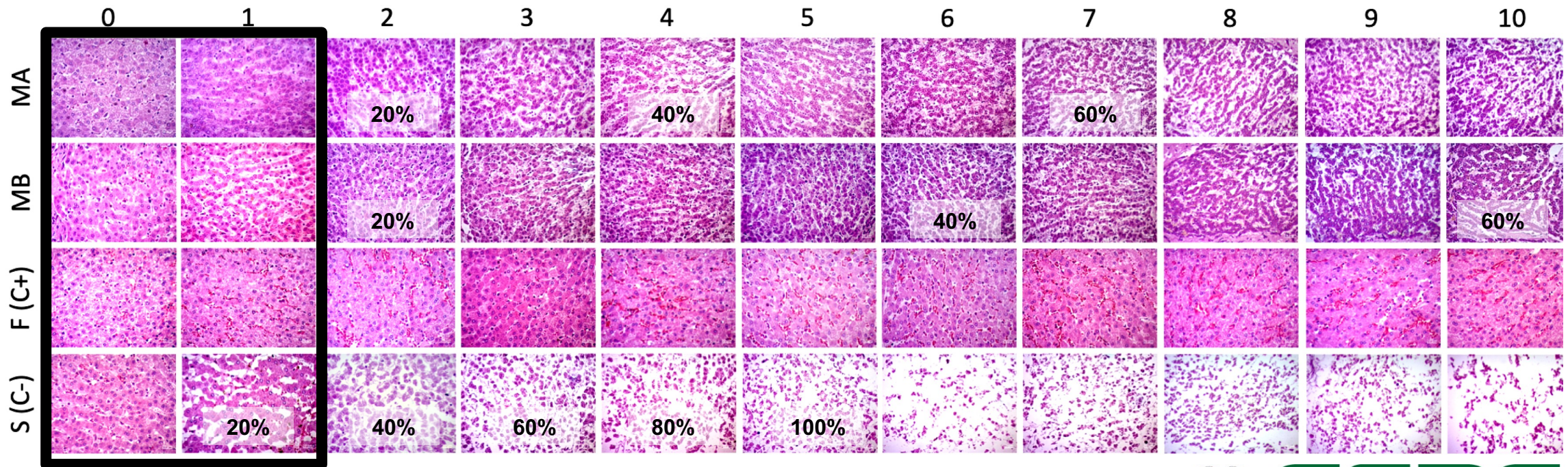
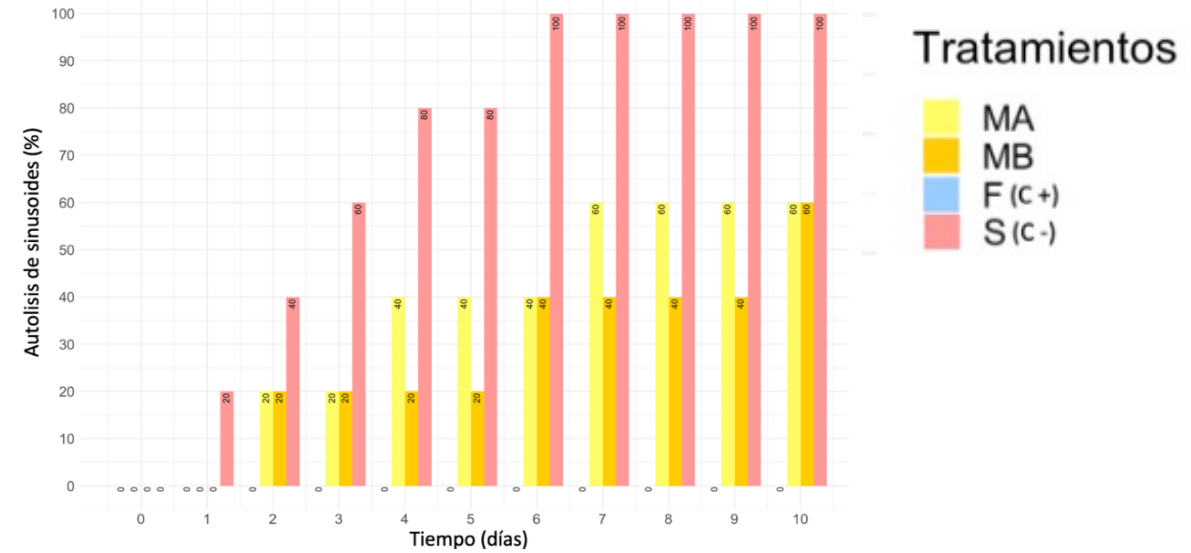


(Al-Maaini & Bryant, 2008).





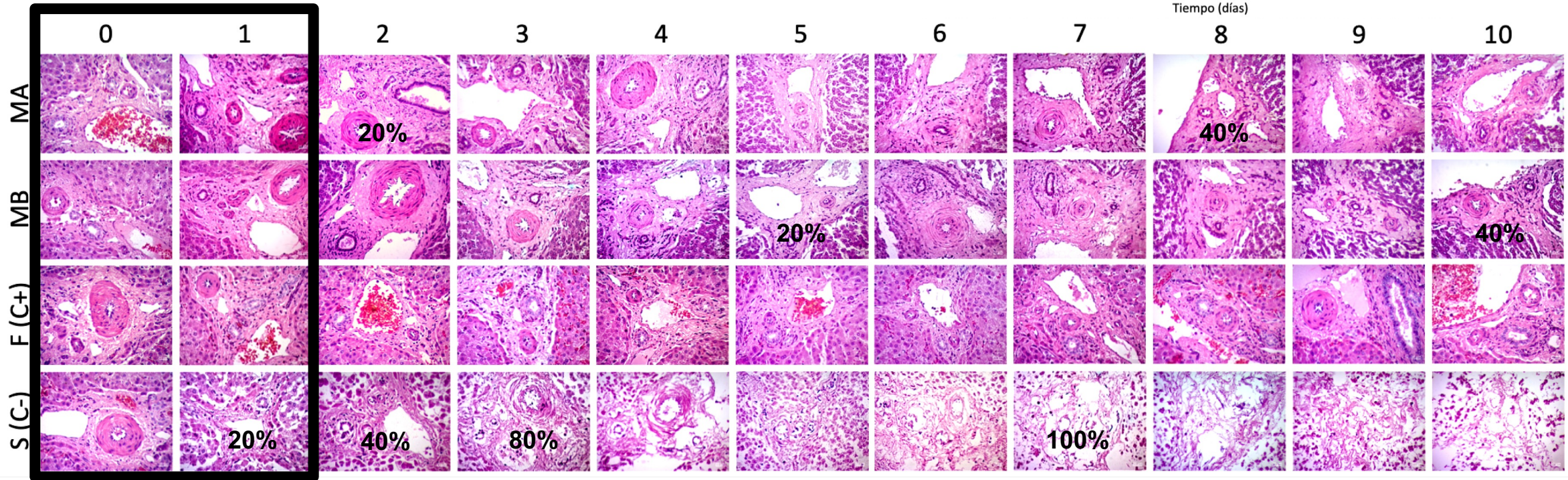
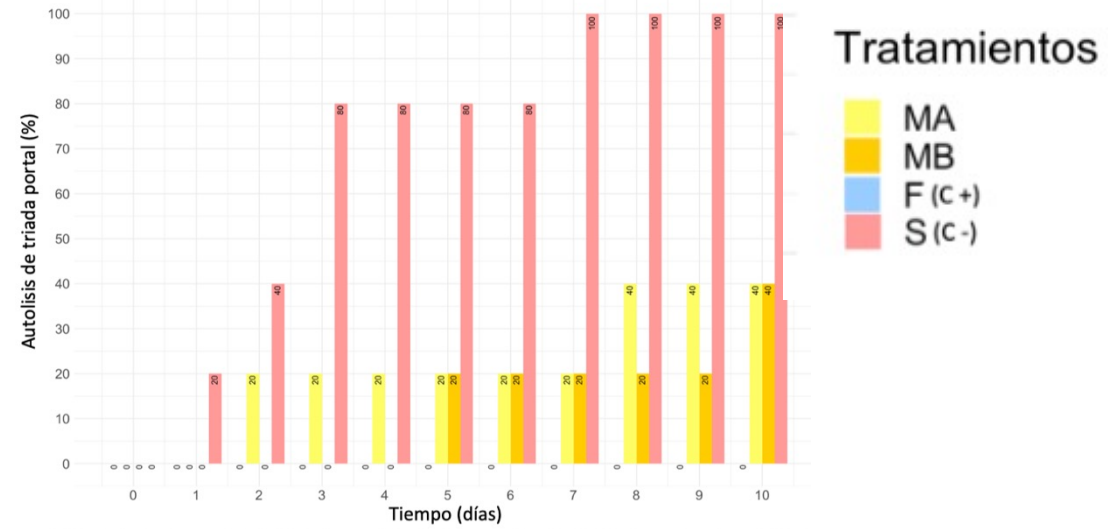
AUTÓLISIS SINUSOIDES



(Al-Maaini & Bryant, 2008).



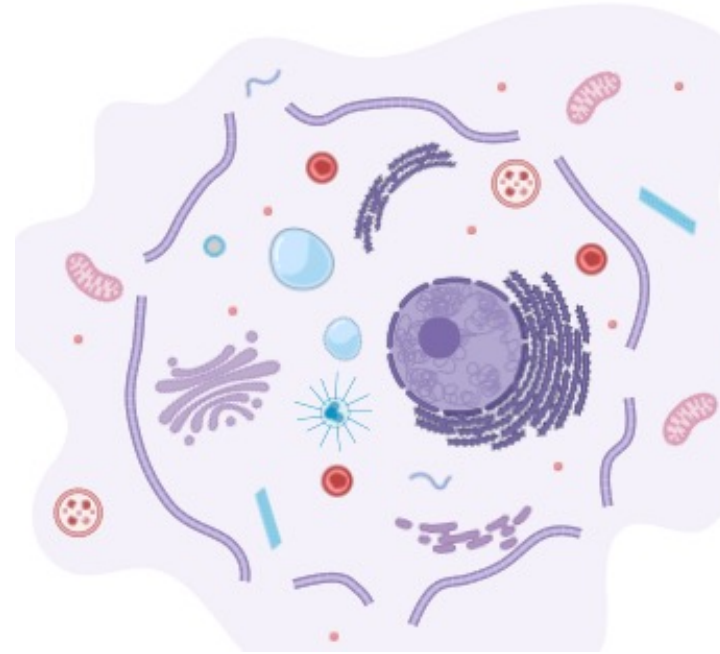
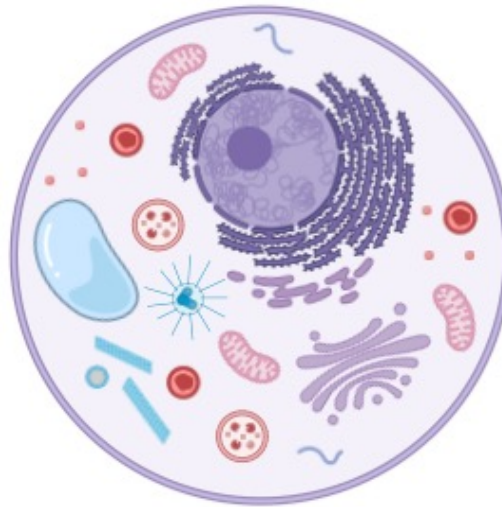
AUTÓLISIS TRIADA PORTAL



AUTÓLISIS

Digestión enzimática

- Natural
- Espontánea
- Compleja
- Rápida
- Continua
- Gradual

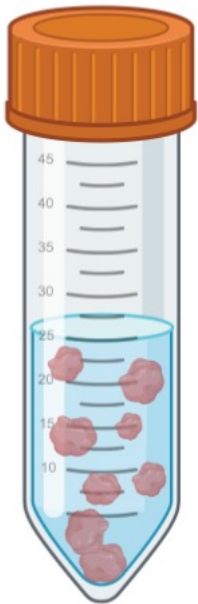


Puede evidenciarse en:

Retrasos en la fijación

Uso de fijador inapropiado

Cantidad y concentración de fijador

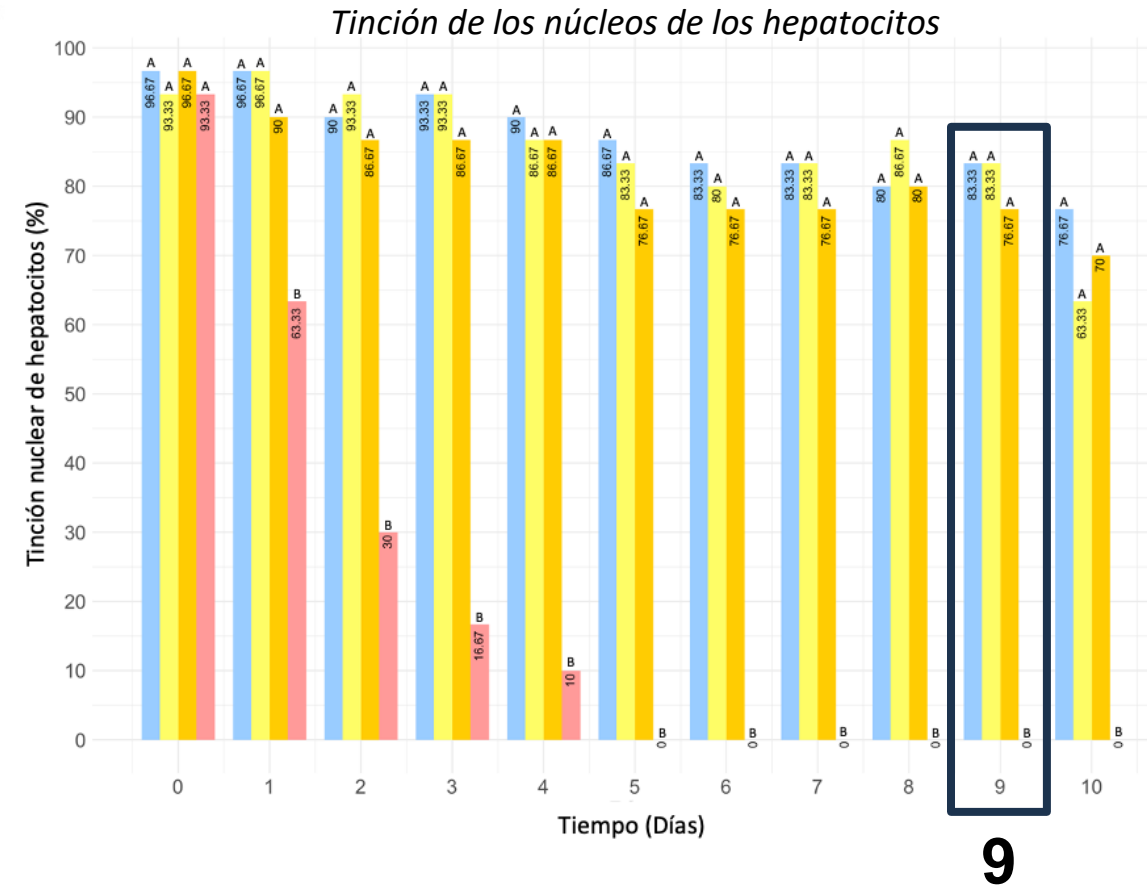
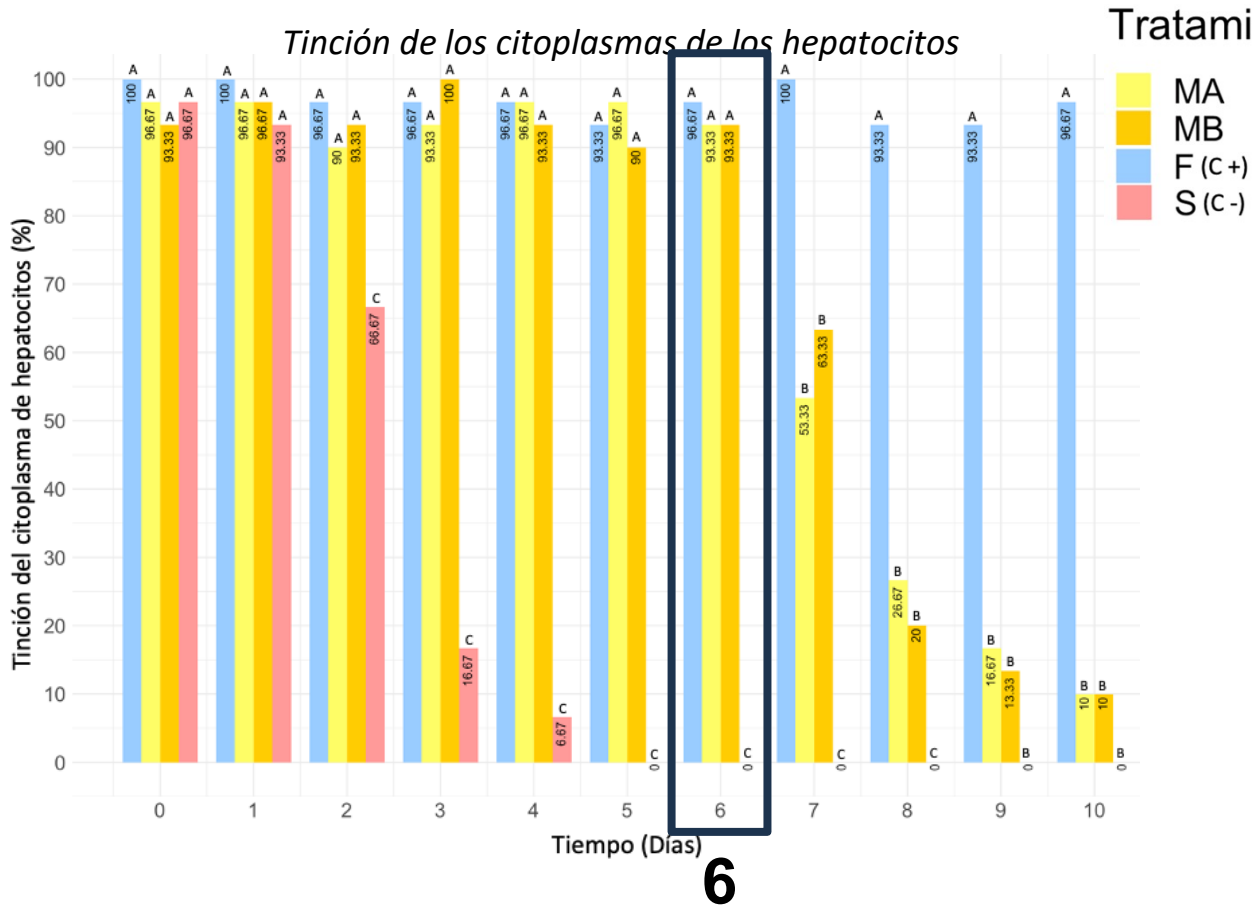


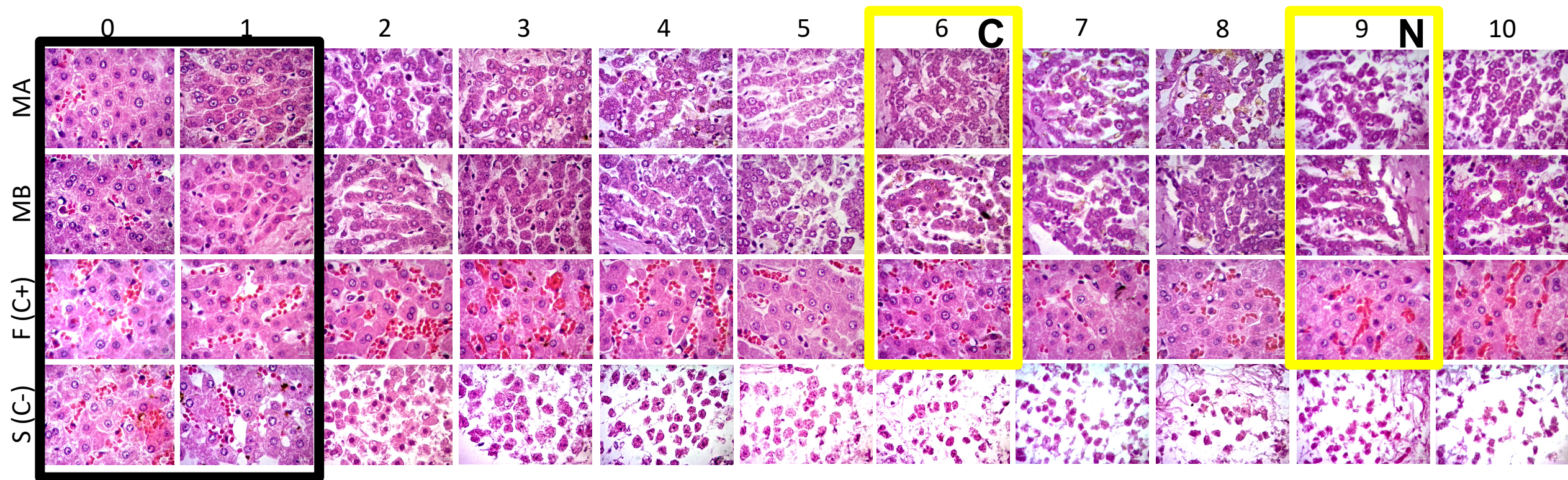
La fijación óptima
inmediatamente en
solución fijadora



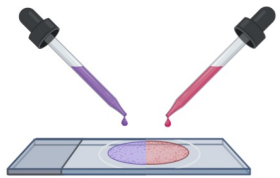
Puede detener los
procesos de autólisis

CALIDAD DE TINCIÓN

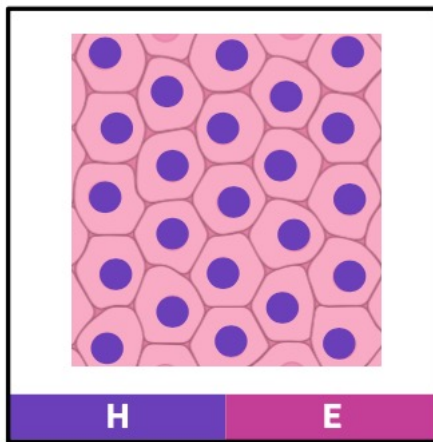




24 horas



Buena calidad en la tinción H/E



Fijador ácido favorece tinción de componentes celulares ácidos

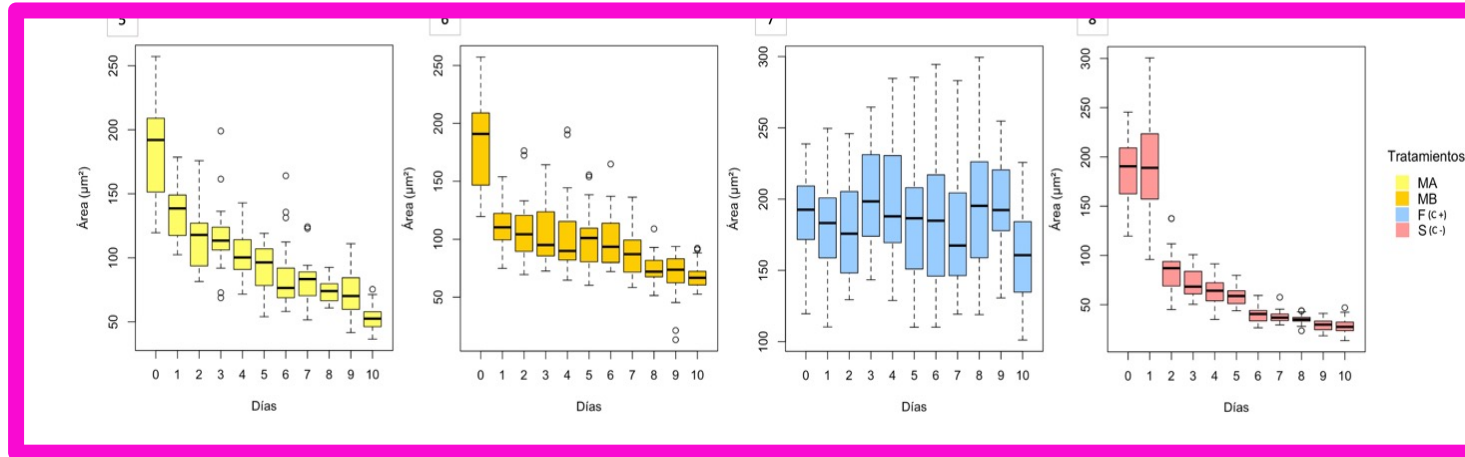
HQ:
Van Gieson para colágeno
Miller para elastina

IHQ:
Vimentina para citoplasmas
K-67 para núcleos



CONTRACCIÓN CELULAR

Morfometría de las áreas celulares



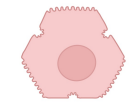
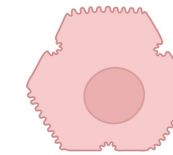
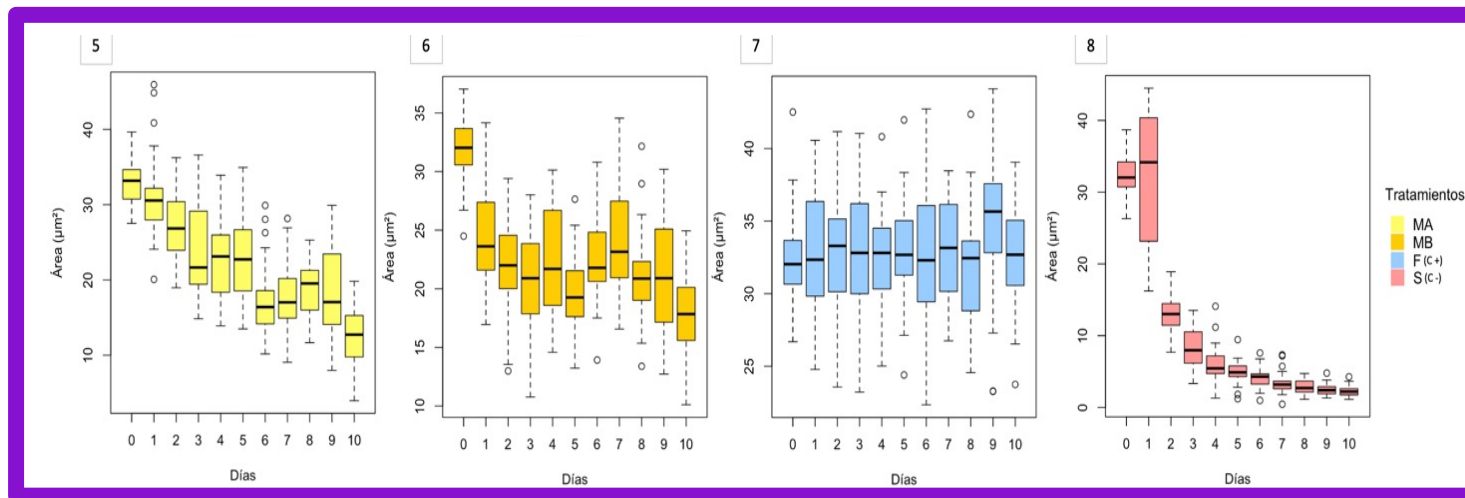
Morfometría celular computarizada
Observar cambios consistentes

Contracción celular – artefactos

Día 1:
MA de 27.17%
MB de 39.12%

Día 5-6:
MA de 50.33%
MB de 46.43%

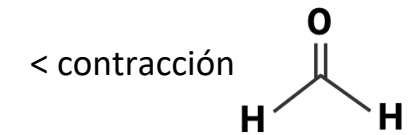
Morfometría de las áreas nucleares



1
—
2

Día 1:
MA de 5.5%
MB de 22.24%

Día 9:
MA de 42.72%
MB de 44.21%



MECANISMOS DE FIJACIÓN DE LA MIEL

ACIDEZ

Diversos ácidos, pH de 4-5



ACTIVIDAD GLUCOSA OXIDASA

Diluir miel > actividad
Oxidación de glucosa
Ácido glucónico y H₂O₂

**Ac. Glucónico
(Conservante)**
Alimenticia
Higiene
Farmacéutica



EFECTO OSMÓTICO

Azúcares
Miel pura – alta hipertonicidad
Miel diluida – baja hipertonicidad
Contracción ligera



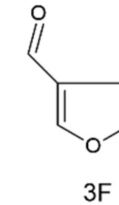
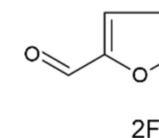
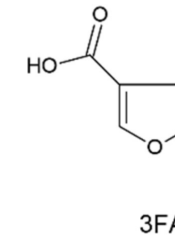
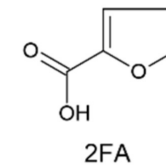
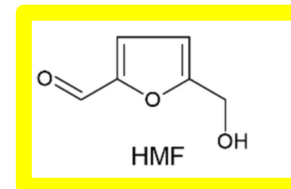
Guayaquil 0.283 – 1.48 mg HMF/kg de miel

Babahoyo 0.76 a 1.75 mg HMF/kg de miel

Quito 3.01 a 18.64 mg HMF/kg de miel

ALDEHÍDOS

pH ácido, temperatura alta y
Almacenamiento prolongado
Índice furánico
Hidroximetilfurfural (HMF)



¿Enlaces cruzados?

Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión



Conclusiones



Recomendaciones



Histomorfología

- Detalles celulares y nucleares identificables.
- Autólisis lenta.
- Estructuras hepáticas moderadamente distinguibles.
- Calidad excelente tinción H/E.

Día 6



Morfometría celular

- Área celular, contracción moderada y progresiva sin diferencias entre los tratamientos.
- Área nuclear, contracción lenta y progresiva, con diferencias entre tratamientos. MA < MB.

< Día 6



Introducción



Objetivos de investigación



Materiales y métodos



Resultados y discusión

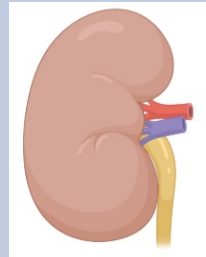
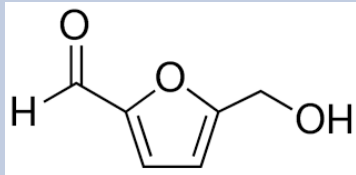


Conclusiones



Recomendaciones





Ensayos de HMF

- Producción
- Cuantificación
- Aplicación

Otros tejidos

- Sanos
- Patológicos
- Tamaños

Pruebas moleculares

- Integridad ADN, ARN

Otras tinciones

- Características específicas

Gestión residuos

- DBO

Muchas gracias

**Histo-dx
Vet**



Familia

Freddy Proaño,
Ph.D.

Ing. Pedro
Romero



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

