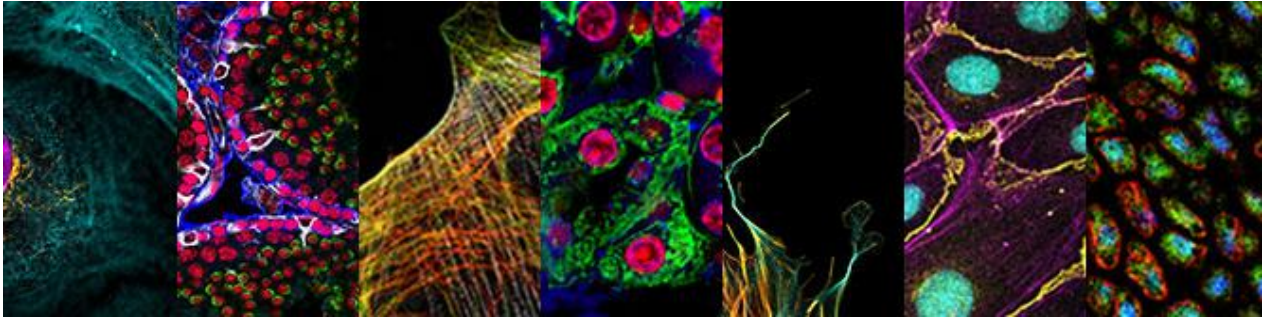


Manual de procedimientos

Eutanasia, necropsia, toma y procesamiento de muestras del intestino delgado de cerdos, para evaluar el sistema nervioso entérico y los fenómenos de neuroplasticidad.



**UNIVERSIDAD
DE ANTIOQUIA**

Facultad de Ciencias Agrarias



Grupo de Investigación en Patobiología

Versión 1.0

Noviembre/2023

Tabla de contenido

Tabla de figuras.....	3
Objetivos	4
General	4
Específicos.....	4
Justificación.....	5
Materiales e insumos:	6
Flujo de trabajo.....	7
Descripción del método y procedimiento de eutanasia	8
.....	9
Descripción del método y procedimiento para el abordaje inicial de la necropsia...	9
Disección del intestino delgado	11
.....	12
Preparación de PFA 4%.....	14
Fijación de las muestras de intestino delgado.....	15
Preparación de sacarosa	18
Congelación	19
Corte en criostato	20
Diseño del procedimiento	20
Aplicación de técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica	21
Equipos, materiales y reactivos	21
Soluciones de trabajo.....	21
Protocolo de Inmunofluorescencia (IF)	21
Preparado de membrana	23
Coloración con azul de Toluidina	26

Tabla de figuras

Figura 1 – Protocolo de Eutanasia.	9
Figura 2 – Metodología de necropsia por estaciones o mesas de muestreo.	11
Figura 3 – Obtención de fragmentos de íleon.	13
Figura 4 – Preparación de PFA 4%.	15
Figura 5 - Cambios de PFA 4%.	16
Figura 6 - Gradiente de sacarosa.	17
Figura 7 - Congelación de tejidos.	19
Figura 8- Diseño del experimento..	20
Figura 9 – Corte y medición de tejidos para preparado de membrana.	24
Figura 10 – Se retira la serosa..	24
Figura 11 – Disección de túnica muscular externa.	25

Objetivos

General

Proporcionar una guía de procedimiento detallada para la eutanasia, necropsia, toma y procesamiento de muestras del intestino delgado de cerdos para la evaluación del sistema nervioso entérico mediante métodos inmunohistoquímicos e histoquímicos.

Específicos

- Protocolizar el método de eutanasia en cerdos a partir de las pautas sugeridas en la guía internacional de AVMA 2020, asegurando un tratamiento ético y respetuoso de los animales involucrados en el proceso de investigación.
- Estandarizar el proceso de necropsia dirigida al sistema digestivo, asegurando la correcta recolección de tejidos intestinales necesarios para el análisis de neuroplasticidad entérica.
- Describir los procedimientos para la obtención, preservación y prevención de artefactos durante la manipulación del intestino delgado de cerdos.
- Detallar los pasos de procesamiento de muestras, desde la fijación hasta la preparación de cortes histológicos en criostato, que permitan un análisis preciso de la morfología y la organización neuronal en el intestino delgado.
- Proporcionar protocolos y orientar sobre los análisis específicos para evaluar la neuroplasticidad en las muestras obtenidas, como la expresión de marcadores relacionados con la plasticidad neuronal.

Justificación

Evaluar la neuroplasticidad ha demostrado ser de vital importancia en el campo de la investigación para comprender la adaptabilidad y la plasticidad del sistema nervioso en respuesta a diferentes estímulos y condiciones. En este contexto, el intestino delgado de cerdos se propone como una fuente valiosa de información sobre los fenómenos de la neuroplasticidad, debido a la presencia y la densidad representativa de neuronas en los plexos intestinales, así como el uso de la especie en los campos neurocientíficos dadas las similitudes anatómicas y fisiológicas con los seres humanos.

Esta guía incluye pautas éticas y métodos de eutanasia y manipulación de animales, propendiendo por el bienestar animal y el cumplimiento de principios éticos acordes con estándares de investigación responsables.

La neuroplasticidad en el sistema nervioso entérico tiene implicaciones directas en la salud gastrointestinal y puede estar relacionada con trastornos neurológicos y gastrointestinales. Comprender los mecanismos subyacentes a través de este enfoque puede conducir a avances en terapias y tratamientos para diversas afecciones tanto en humanos como en animales. Por otra parte, la falta de guías detalladas y estandarizadas para la eutanasia, necropsia y procesamiento de muestras, puede resultar en procedimientos inconsistentes y datos poco confiables. Este manual llenará ese vacío proporcionando un recurso completo y confiable.

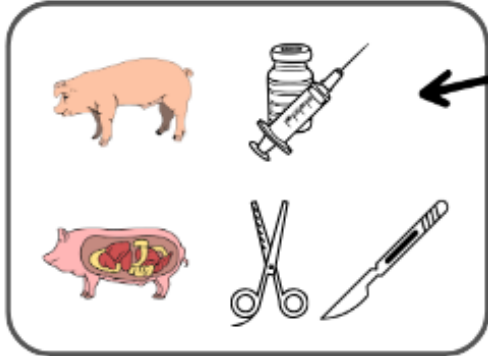
En resumen, este manual busca ser una herramienta esencial para investigadores, estudiantes y profesionales que deseen contribuir al conocimiento científico en el campo de la neuroplasticidad. La implementación rigurosa de los procedimientos aquí descritos permitirá avanzar en la comprensión de cómo los fenómenos de la neuroplasticidad se manifiestan en el sistema nervioso entérico, con implicaciones potenciales en la salud humana y animal.

Materiales e insumos:

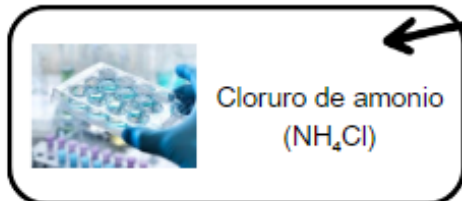
- Fonendoscopio
- Termómetro
- Catéter
- Jeringas de 2, 5 y 10 ml
- Fármacos (Azaperona, Ketamina y Fenobarbital)
- Batas manga larga y gorros anti fluidos
- Tapabocas
- Guantes de nitrilo o látex
- Toallas de papel
- Bolsas rojas
- Cinta adhesiva
- Balde
- Cuchillo de disección y/o bisturí.
- Tabla de corte.
- Regla.
- Kit de disección.
- Frascos de vidrio boca ancha y tapa rosca 500 ml.
- Nylon
- Costotomo
- Marcador Sharpie.

Flujo de trabajo

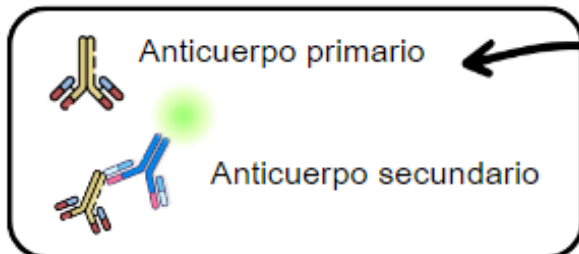
Paso 1 Eutanasia y necropsia dirigida



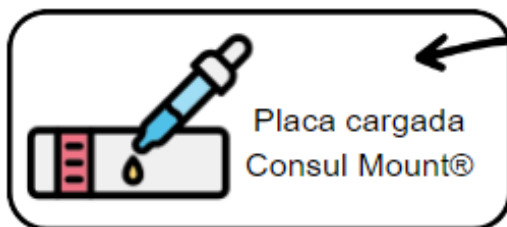
Paso 3 Reducción de la autofluorescencia (tejidos cortados en criostato)



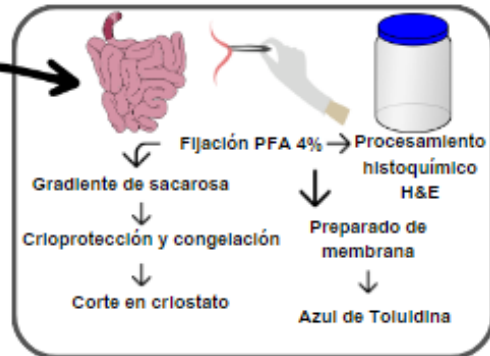
Paso 5 Incubación de anticuerpos



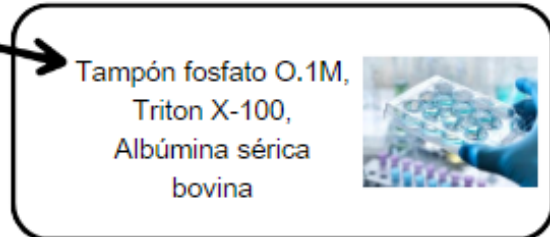
Paso 7 Montaje



Paso 2 Toma y preparación de muestras



Paso 4 Preincubación



Paso 6 Tinción nuclear



Descripción del método y procedimiento de eutanasia

El procedimiento de eutanasia se realiza teniendo en cuenta los lineamientos para la eutanasia en animales, edición 2020, expedida por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria. En ella se describe como método aceptado el uso de agentes anestésicos y barbitúricos inyectados para la especie porcina.

Para el procedimiento de eutanasia se realiza el pesaje de cada individuo y se calcula la dosis adecuada de los compuestos químicos a usar.

El protocolo se basa en la administración de Azaperona (2 mg/kg) y clorhidrato de ketamina (4,4 mg/kg) como agentes sedantes, analgésicos y anestésicos, vía intramuscular en la zona del cuello (como se indica en la figura 1.C), con monitorización constante de frecuencia cardíaca, pulso y frecuencia respiratoria hasta alcanzar un plano anestésico profundo, el cual se comprobará mediante la respuesta a estímulos físicos, sonoros y cambios en los signos vitales. Una vez se garantice el plano anestésico ideal, se procede con la administración intracardiaca de fenobarbital sódico, para esto se ubicará en la región torácica el hemitórax izquierdo entre el tercer y el quinto espacio intercostal, donde se introducirá una aguja de 21G x 32mm, acoplada a una jeringa con la dosis correspondiente de fenobarbital sódico (78 mg/kg), una vez se puncione se retrae el émbolo para verificar la posición de la jeringa y asegurar que se obtenga sangre en el interior de la misma, lo que indica que se ha accedido correctamente al corazón. Una vez se verifica esto, se procede a aplicar la dosis total estipulada. Se verificará frecuencia cardíaca, pulso, frecuencia respiratoria y temperatura para garantizar que todas las funciones vitales han cesado.



Figura 1 – Protocolo de Eutanasia.

A. Elección de fármacos para el protocolo de eutanasia B. Se cargan las dosis respectivas de acuerdo al peso de los individuos C. Aplicación intramuscular de agentes sedantes y anestésicos (Azaperona y Ketamina) D. Administración intracardiaca de fenobarbital (Euthanex)

Descripción del método y procedimiento para el abordaje inicial de la necropsia

El protocolo de necropsia se basa en el propuesto por la guía de diagnóstico en necropsia en patología porcina diseñada por De las Heras M. y García de Jalón J.A (2008).

Se implementó una metodología de necropsia por estaciones, esta consiste en distribuir funciones específicas en cada estación y así priorizar procesos críticos como es el caso del muestreo del tejido del sistema digestivo.

Para este procedimiento de necropsia se asignan cuatro estaciones, en la primera se extrae el sistema nervioso central; en la segunda se aborda el sistema digestivo en un tiempo promedio de 7 minutos; y las siguientes dos estaciones corresponden

a la evaluación completa de los órganos de la cavidad torácica y abdominal, así como su respectivo muestreo.

En la estación número dos, una vez se recibe el cadáver se realiza un abordaje inicial general, el cual, implica el posicionamiento en decúbito supino del animal, se abordan los pliegues axilares e inguinales de la piel mediante una incisión; para liberar las extremidades se disloca el fémur de la articulación coxofemoral de ambos miembros pélvicos y se separa el húmero de la musculatura de ambos miembros torácicos. Una vez estabilizado el cadáver se realiza una incisión en la piel y el tejido subcutáneo trazando una línea media desde el mentón hasta el ano; con ayuda de disección roma y se libera la piel ventral del sistema muscular. Para el abordaje de la cavidad torácica y abdominal se debe realizar el procedimiento previamente descrito con cuidado de no perforarlas. A través de la línea media abdominal, iniciando en el esternón y terminando en la sínfisis púbica, se accede a la cavidad abdominal para la observación de las vísceras (estómago, intestino delgado, intestino grueso, hígado, bazo, riñones, glándula adrenal, sistema reproductivo, vejiga, linfonodos, entre otros).

Una vez expuesta la cavidad abdominal se identifica el esófago en su porción más caudal y se anuda con nylon o material de sutura, así como la porción más caudal del recto y de igual manera se anuda para separarlas de la carcasa. De esta manera se obtiene el fragmento completo de estómago, intestino delgado e intestino grueso (duodeno, yeyuno, íleon, ciego, colon y recto).

Una vez expuestas se localiza el ciego y el esfínter ileocecal que corresponde a la unión con el intestino delgado y específicamente la porción de interés que es el íleon y se anuda en esa ubicación, luego se evalúa el fragmento hacia craneal hasta donde sea evidente la membrana ileocecal que determina la separación de este fragmento con el yeyuno y se realiza un corte con tijeras de tejido.

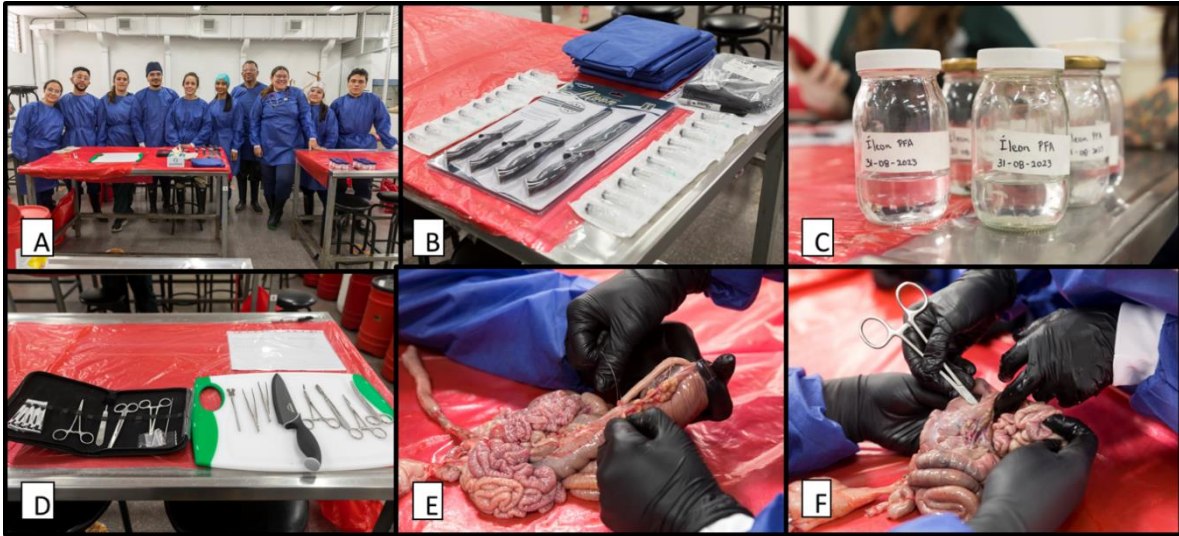


Figura 2 – Metodología de necropsia por estaciones o mesas de muestreo.

- A. Personal capacitado e idóneo que se distribuye en estaciones. B. Cada mesa de muestreo está dotada con elementos de protección personal e insumos necesarios para desarrollar la actividad. C. Cada mesa cuenta con frascos idóneos para la conservación de las muestras obtenidas. D. Mesa lista para iniciar muestreo. E. Mesa de necropsia dirigida al sistema digestivo, paquete visceral digestivo expuesto, se anudan los extremos de la pieza para evitar derrames del contenido luminal y facilitar la manipulación. F. Se selecciona el fragmento de interés del intestino y se procede al muestreo.*

Disección del intestino delgado

El fragmento mayor de intestino delgado será dividido en tres secciones que anatómicamente están descritas como duodeno, yeyuno e íleon. El duodeno será anatómicamente referenciado por la conexión directa al píloro y la presencia del páncreas, el íleon se referencia por la relación que tiene con el ciego mediante la válvula ileocecal, por último, el yeyuno se considerada macroscópicamente como la porción del medio. Una vez separado el o los fragmentos de interés, se retira el exceso de material orgánico en la luz intestinal, instilando agua estéril, este paso se debe hacer con mucha precaución para no dañar la mucosa del órgano, es

importante lavar muy bien, ya que la presencia de materia orgánica puede inactivar el formol. Posteriormente se anuda uno de los extremos del fragmento y se aplica la solución fijadora (PFA 4%) en la luz y se anuda el otro extremo para obtener finalmente un cilindro que luego se sumerge en la solución fijadora paraformaldehído al (PFA4%).

El PFA 4% se debe usar totalmente fresco o conservado en congelación a -20°C .



Figura 3 – Obtención de fragmentos de íleon.

A. Separación del íleon del paquete visceral. B. Lavado de la luz de los fragmentos con agua destilada. C. medición de los fragmentos. D. fijación del lumen con PFA 4%. E. anudado de los extremos del fragmento. F. Se sumergen los fragmentos en PFA 4%.

Preparación de PFA 4%

Equipos, materiales y reactivos

- Beaker
- Balanza
- Agitador
- Cabina extractora de gases
- Papel aluminio
- Termómetro
- Cuchara medidora
- Agua Milli-Q®
- Praformaldehído en polvo (Sigma-Aldrich CAS:30525-89-4)
- PB 0.4M con pH 7.4
- NaOH 0.4M

Para preparar un litro de PFA 4%

Paso 1 Preparar PB: En una balanza se pesan sobre el papel aluminio 55,2 g de sodio dihidrogenofosfato y 69.9 g de di-Potasio hidrógenofosfato y se depositan en un beaker con 500 ml de agua Milli-Q®, se mezcla vigorosamente y se mide el pH, el cual debe ser 7,4.

Si el pH se encuentra por debajo de 7,4 se debe adicionar NaOH 0.4M hasta alcanzar el pH sugerido.

Paso 2 Adicionar PFA en polvo: Pesar 40 gramos de PFA en polvo y en una cabina extractora de gases adicionarlos a la mezcla previa. Posicionar el beaker sobre una plancha de calentamiento a una temperatura de 58°C (no superar los 60°C) hasta que la solución se vea completamente transparente. Se deja enfriar a temperatura ambiente y queda lista para ser usada.

Si no se va a utilizar de inmediato, se debe conservar en congelación a una temperatura de -20°C. Cuando se vaya a usar se debe sacar desde el día anterior a una temperatura de 4°C. El producto que sobre no puede volver a congelarse.

Paso 3 Aforar: Depositar en el beaker la cantidad de Agua Milli-Q® faltante para alcanzar los 1000ml.

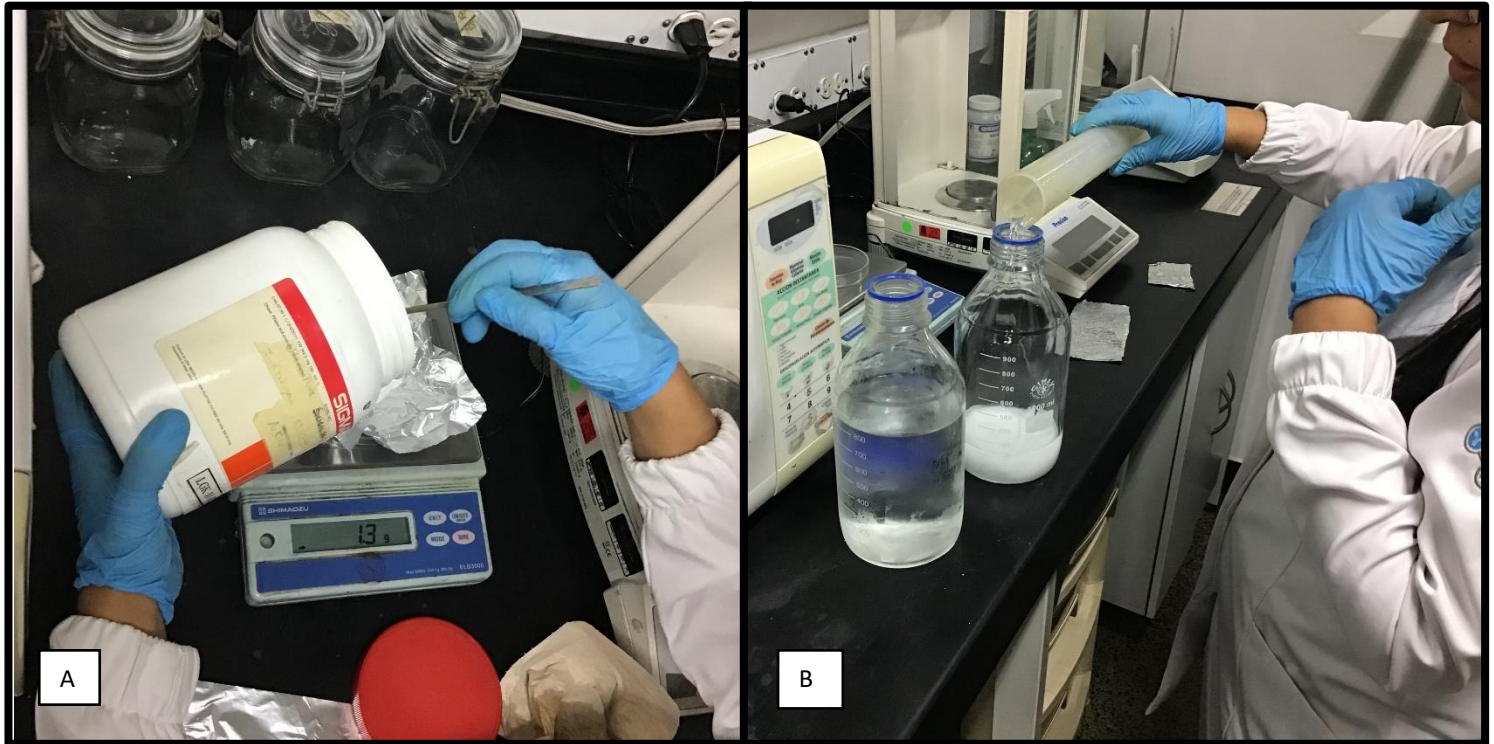


Figura 4 – Preparación de PFA 4%.

A. Pesaje de los reactivos. B. Adicionar solventes (Agua Milli-Q®)

Fijación de las muestras de intestino delgado.

Pasadas 48 horas de la obtención de las muestras de intestino delgado se procede a liberar las ligas de cada fragmento y realizar cortes transversales procurando conservar la integridad de la mucosa, idealmente los fragmentos no deben superar un centímetro de longitud o diámetro mayor, y se realiza el primer cambio de PFA 4%, para ello se descarta la total de solución utilizada en las primeras 48 y se agrega PFA totalmente limpio. Este proceso se repetirá cada 24 horas, hasta que los tejidos tengan un color pardo claro o beige (Aproximadamente a las 120 horas) (Figura 5).



PFA 4%

1- 48h

2- 24 h

3 - 24 h

4 - 24 h

Figura 5 - Cambios de PFA 4%. Se realizan en total cuatro cambios de solución fijadores, el primero a las 48 horas y los tres siguientes cada 24 horas.

Una vez los tejidos estén completamente fijados, se someten a un gradiente de sacarosa, el cual se describe a continuación:

1. Sacarosa al 7% durante 24 horas en agitación (80rpm).
2. Sacarosa al 25% durante 24 horas en agitación (80rpm).
3. Sacarosa al 30% durante 24 horas en agitación (80rpm).



Inicialmente, al introducir los tejidos en la solución, estos flotan, una vez se observan en el fondo del frasco, se realiza un recambio a una nueva solución más concentrada.

Figura 6 - Gradiente de sacarosa. Cada 24 horas se cambia la concentración del gradiente para saturar al tejido de solutos.

Preparación de sacarosa

Equipos, materiales e insumos

- Beaker
- Papel aluminio
- Cuchara medidora
- Agitador
- Sacarosa
- Azida 0,1%
- Agua Milli-Q®

Para preparar un litro de solución azucarada de cada una de las concentraciones

Paso 1 Pesar la sacarosa: En un gramero y sobre el papel aluminio pesar 70, 250 y 300 gramos de sacarosa por separado.

Paso 2 Adicionar al Agua Milli-Q®: En tres beaker diferentes y debidamente marcados con 7%, 25% y 30% se va a adicionar los 70g, 250g y 300 g previamente pesados respectivamente y 500 ml de Agua Milli-Q®.

Paso 3 Calentar y diluir: En una plancha de calentamiento se posiciona cada uno de los beaker con un agitador en el fondo y se espera hasta que la solución se transparente (máximo 60°C).

Paso 4 Aforar: Adicionar la cantidad de Agua Milli-Q® faltante hasta completar los 1000ml en cada beaker.

Por cada litro de solución de sacarosa se adiciona 800 µl de Azida 0,1% para evitar su contaminación

Congelación

El gradiente de sacarosa previamente mencionado prepara los tejidos para su posterior congelación evitando la formación de cristales intracelulares. Cuando los tejidos están en óptimas condiciones para su congelamiento se procede a sumergirlos en una solución crio protectora de isopentano, la cual debe permanecer a una temperatura de 4°C para lo que se utiliza un beaker que contiene la solución y una base de icopor con hielo seco que rodea el recipiente. Los tejidos se sumergen en esta solución y luego se recubren con papel aluminio, debidamente marcado por ambos lados con una cinta de “enmascarar” marcada (con lápiz) con el código del fragmento (Figura 5). Estos tejidos se conservan en congelación a -20°C .

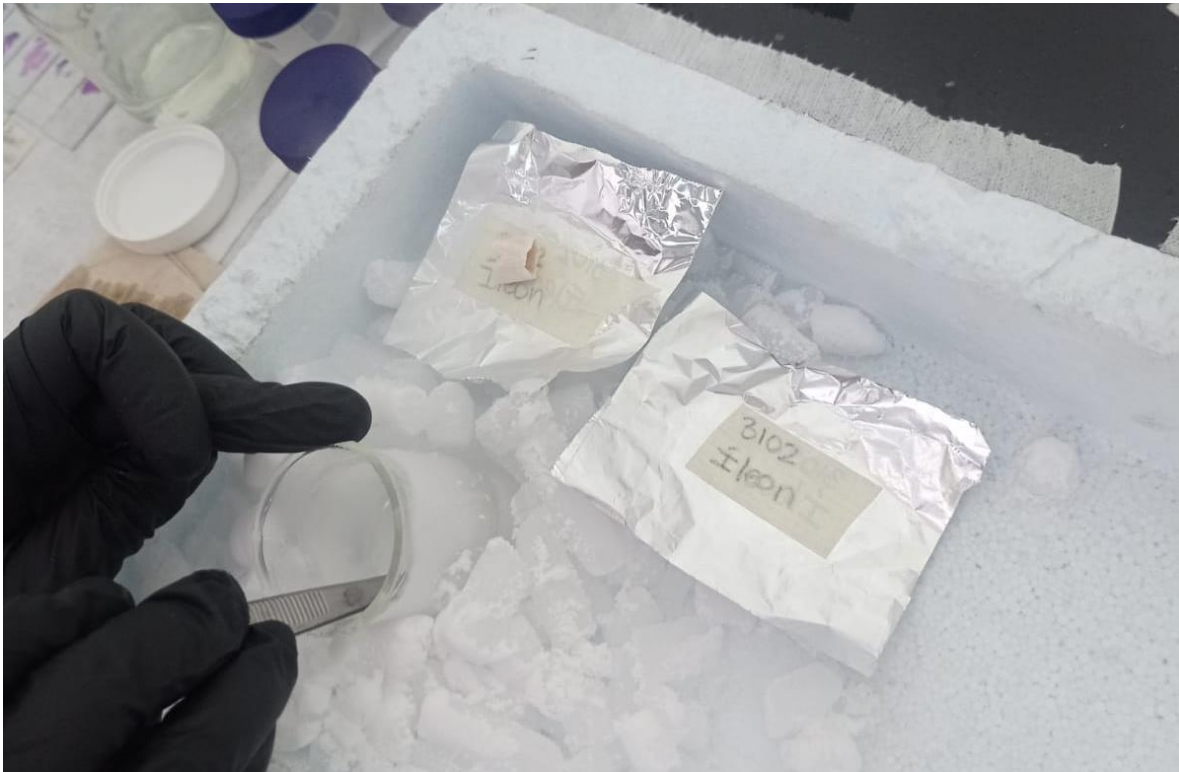


Figura 7 - Congelación de tejidos. Beaker con isopentano para la crio protección de los tejidos.

Corte en criostato

Los fragmentos previamente congelados deben ser seccionados en unidades de micras para poder acceder a su visualización microscópica. Para ello se utiliza un criostato, el cual es un micrótomo incluido en una cámara de congelación. Usualmente se realizan cortes entre 5 a 30 μm . Sin embargo en este protocolo se usaron cortes de 50 μm . De cada fragmento se seccionan aproximadamente 20 cortes que se posicionan en placas "Multiwell" o multipocillos.

Diseño del procedimiento

De acuerdo a la cantidad de individuos, tejidos y anticuerpos a procesar se realiza el diseño del experimento. Este consiste en planear cuantos pozos van a ser necesarios para procesar todo al mismo tiempo. Para este protocolo se seleccionó una placa multipocillos de 6 pozos. Los primeros pozos del extremo de la izquierda en posición vertical se asignan al fragmento de intestino del individuo #1 y #2 respectivamente, en los dos pozos contiguos se posicionan los tejidos resultantes del preparado de membrana y en los últimos pozos se asignan los controles negativos (Figura 5).

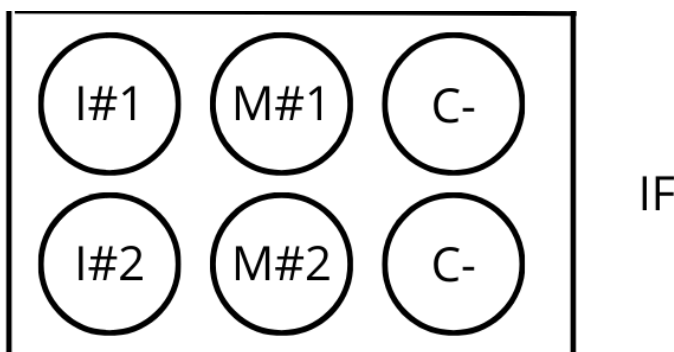


Figura 8- Diseño del procedimiento. Placa multipocillos de 6 pozos. I#1 e I#2 hacen referencia al tejido intestinal del individuo 1 y 2 respectivamente; M#1 y M#2 hacen referencia al preparado de membrana del individuo #1 y #2; C- hace referencia al control negativo.

Aplicación de técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica

Equipos, materiales y reactivos

- Placa multipocillos con tejidos
- Pinceles delgados
- Buffer fosfato 0.1M
- Triton X-100
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Suero fetal bovino (por sus siglas en inglés BSA)
- Anticuerpos: primarios y secundarios
- Complejo Avidina-Biotina
- Diaminobenzidina (DAB)
- Fluoróforos verdes: Alexa 488
- Fluoróforos rojos: Alexa 545, 594

Soluciones de trabajo

- Pre incubación: Tampón fosfato (por sus siglas en inglés PB) 0,1M, 0.3% triton X-100, 1% BSA
- Incubación: Tampón fosfato (por sus siglas en inglés PB) 0,1M, 0.3% triton X-100, 0.3% BSA
- Lavados: Tampón fosfato 0.1M.
- Revelado: Una pastilla de DAB (11mg) en 12 a 15 ml de PB 0,1M, agitar y filtrar, adicionar antes de de usar 0,02% de H₂O₂.

Todos los residuos líquidos y sólidos de este procedimiento deben ser inactivados en hipoclorito de 6 – 24 horas.

Protocolo de Inmunofluorescencia (IF)

Paso 1 Incubación: A cada pozo se adiciona cloruro de amonio (NH_4Cl) 50 mM durante 30 minutos.

Paso clave para cubrir la auto fluorescencia.

Se puede reemplazar por Sudan Black

Pasados los 30 minutos de incubación, se realizan tres lavados de PB en agitación (80rpm) durante cinco minutos (cada uno).

Paso 2 Pre incubación: Con ayuda de una micro pipeta se retira el PB de cada pozo y se adicionan 500 ul de la solución de pre incubación. Se deja durante una hora a temperatura ambiente en agitación (80rpm).

Paso 3 Incubación con anticuerpo primario: se selecciona el anticuerpo primario a la concentración recomendada por la casa comercial. Los tiempos de incubación pueden variar según la sensibilidad y limpieza de reacción de cada anticuerpo. Así puede permanecer 2 horas a temperatura ambiente, 1 hora a 37°C , o toda la noche o hasta tres días a 4°C .

La concentración de cada anticuerpo debe ser estandarizada. Para la especie porcina y los anticuerpos de elección NeuN y Ki67 se estandarizó una concentración de 1:500 y un periodo de incubación de 48 horas a 4°C . En los pozos de control negativo no se adicionan anticuerpos solo solución de incubación.

Pasadas las 48 horas se realizan tres lavados con PB en agitación (80rpm) durante cinco minutos (cada uno).

En todas las etapas de lavado es recomendable utilizar dos recipientes, uno que contenga la solución de lavado y otro donde se pueda realizar el descarte de la solución que ha sido usada.

Paso 4 Incubación con anticuerpo secundario: se selecciona el anticuerpo secundario de acuerdo a su clonalidad versus el anticuerpo primario, esté va

La concentración de los anticuerpos secundarios usados para este protocolo en la especie porcina fue de 1:700

acoplado a un fluoróforo que será verde o rojo según la proteína a la que se acople el anticuerpo. Se deja en incubación durante 48 horas.

Pasadas las 48 horas se realizan tres lavados con PB en agitación (80rpm) durante cinco minutos (cada uno).

Paso 5 Adicionar Hoechst: Este colorante de ADN se aplica sobre los anticuerpos secundarios, 15 minutos antes de terminar la incubación.

La concentración de este colorante en la especie porcina y para este protocolo fue de 1:10.000

Paso 6 Montaje: En una cubeta o caja de Petri con PB 0.1M se posicionan los tejidos recuperados de los pozos, se introduce la placa en la cubeta y con ayuda de un pincel de cerdas finas se posicionan los tejidos sobre la placa. Posteriormente se aplica Gel Consul Mount® y se sobrepone la laminilla cubreobjetos.

Las placas portaobjetos deben ser gelatinizadas. La aplicación del Gel Consul Mount® y las laminillas cubreobjetos se debe realizar con el tejido aún húmedo. Posterior a la aplicación de la laminilla cubreobjetos, se recomienda verificar la ausencia de burbujas.

Preparado de membrana

Equipos, materiales e insumos

- Estereomicroscopio
- Placa de Petri
- PBS + Azida 0,1%
- Instrumental quirúrgico oftálmico (pinzas curvas y rectas)

Paso 1 Corte de tejidos: Se preparan cuadrados de tejido que midan 1 cm² y que involucren todas las capas del intestino.

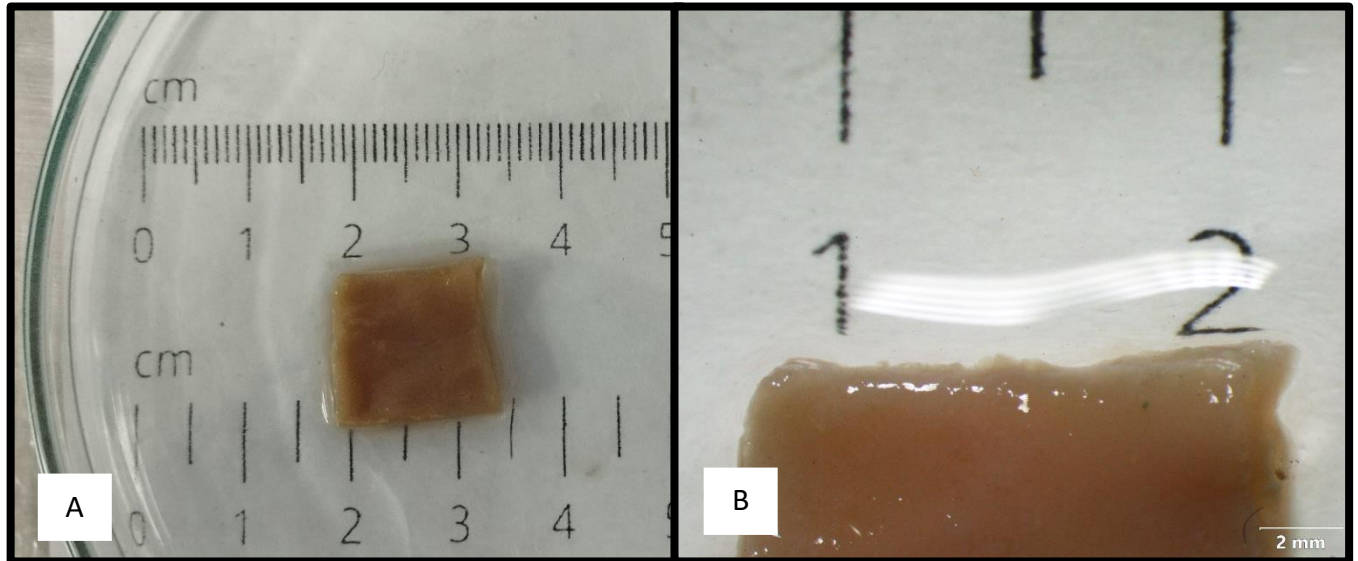


Figura 9 – Corte y medición de tejidos para preparado de membrana. A y B. En una placa de Petri humedecida con agua estéril, se posiciona el tejido y se mide un centímetro cuadrado (imagen B tomada en estereomicroscopio en aumento de 1X).

Paso 2 Retirar la serosa: En una placa de Petri y observando a través del estereomicroscopio se posiciona el tejido sobre la mucosa y se identifica la serosa, que es una membrana fina y traslúcida. Desde uno de los extremos del fragmento se pellizca la serosa con las pinzas rectas y se retrae hacia arriba ayudándose con la otra pinza para sostener el fragmento.

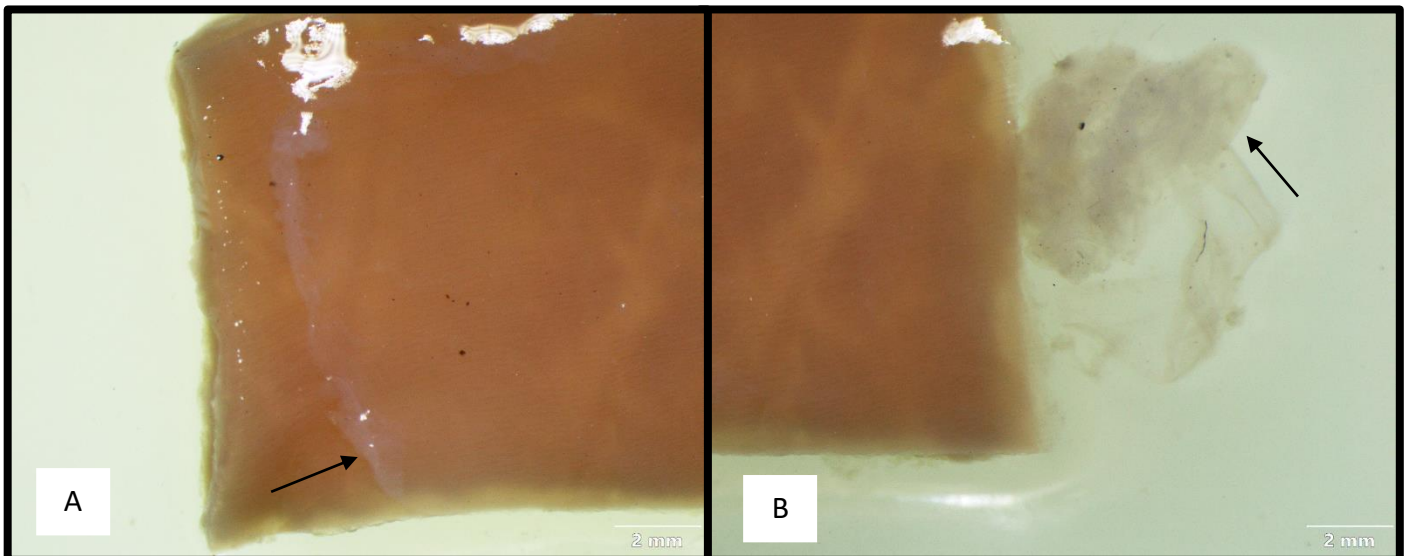


Figura 10 – Se retira la serosa. A. se posiciona el tejido sobre la mucosa y se identifica la capa serosa (flechas negras), con ayuda de las pinzas de micro disección se levanta la túnica y se retira por completo. B. Túnica serosa completamente separada de las demás túnicas.

Paso 3 Retirar la túnica muscular externa: Nuevamente se posiciona el tejido hacia la mucosa y se presiona, allí se observa la túnica muscular externa que se arruga un poco ante la presión ejercida. De igual manera, como el paso 2 se pelliza uno de los extremos del fragmento y se observa la separación de las túnicas musculares (interna y externa o circular y longitudinal) y se toma únicamente la túnica externa halando hacia arriba y sosteniendo el fragmento con la otra pinza. De esta manera se obtiene la túnica muscular externa donde reposa el plexo mientérico.

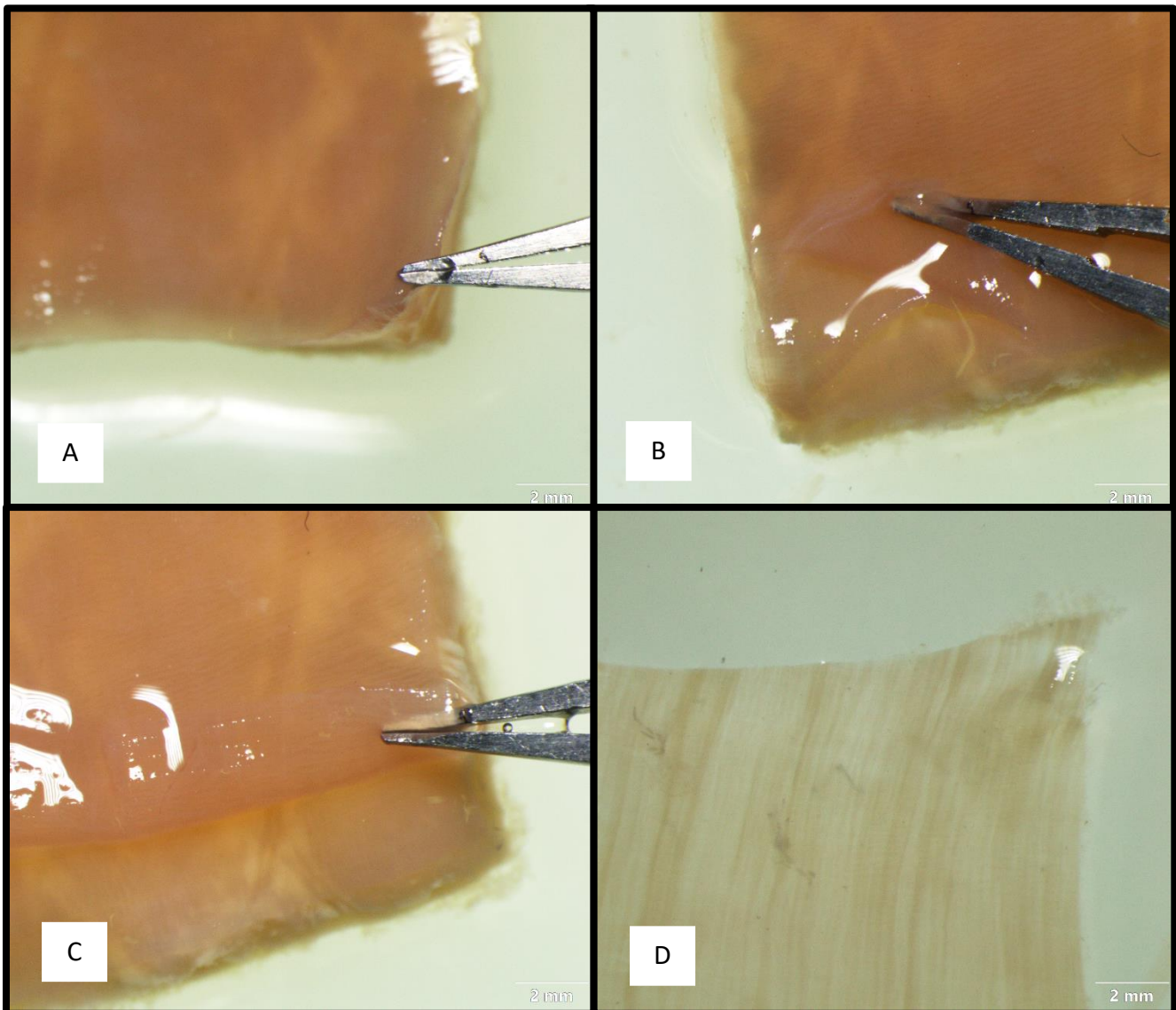


Figura 11 – Disección de túnica muscular externa. A. se pellizca el extremo del fragmento para identificar la separación de ambas túnicas musculares. B. Se separa la túnica muscular externa (flechas negras) con la ayuda de unas pinzas de micro disección, garantizando que la túnica muscular interna (cabeza de flecha) quede adherida al resto del tejido. C. Sujetando la túnica muscular externa de un extremo, se hala hacia arriba para separarla por completo del tejido. D. Túnica muscular externa completamente separada del tejido.

Coloración con azul de Toluidina

Equipos, materiales y reactivos

- Laminilla portaobjetos gelatinizadas
- Coloración de Azul de Toluidina
- Pipetas Pasteur desechables
- Laminillas cubreobjetos
- Puente de coloración

Paso 1 Dejar secar el tejido: Sobre la placa portaobjetos gelatinizada se posiciona el tejido con la cara interna (plexo mientérico) hacía arriba y se deja secar.

Es normal que se generen pliegues durante el secado, esto se da por la contracción de las fibras musculares.

Paso 2 Aplicar reactivo: Una vez seca, se posiciona la placa sobre un puente de coloración y se aplica con una pipeta Pasteur un (1) ml aproximadamente de Azul de Toluidina o la cantidad necesaria para cubrir el tejido. Se deja actuar durante dos minutos. Pasados los dos minutos se retira el colorante aplicando agua de manera cuidadosa con una pipeta Pasteur hasta retirar por completo el exceso de colorante.

Paso 3 Dejar secar: Se posiciona la placa de manera vertical sobre una servilleta y se espera a que esté completamente seca.

Paso 4 Montaje: Una vez seca, se procede al montaje, para ello se aplica una gota de gel de montaje a base de Xilol, una gota de Xilol y la laminilla cubreobjetos.

Evitar la formación de burbujas o artefactos en el montaje