Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico

Procesi citológic tisular

Coordinadores

David de Pablo Velasco Pedro Espinosa González Julián Sanz Ortega



Autores

Director

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área del Hospital Universitario Clínico San Carlos y de la Universidad Complutense de Madrid, desde 1996. Desde el año 2000 es Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012. Autor de 66 artículos científicos: publicaciones internacionales en revistas indexadas y nacionales.

Premio Extraordinario de la Universidad Complutense de Madrid y Premio de la Fundación San Nicolás de la Real Academia Nacional de Medicina en 1994.

Coordinadores

David de Pablo Velasco

Experiencia laboral, investigadora y docente en distintos centros de alta cualificación. Especialista en técnicas de Dermatopatología y cirugía de Mohs. Miembro del equipo de trasplantes del Hospital Universitario Clínico San Carlos. Técnico de Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Pedro Espinosa González

Especialista en Sanidad Mortuoria, gestión de cadáveres y tanatopraxia, con experiencia laboral e investigadora en distintos centros. Técnico de Anatomía Patológica. Pracsamor s.l. Madrid

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid. Director Científico del Biobanco del Hospital Universitario Clínico San Carlos y del Biobanco de la RTICC de ISCIII. Responsable de Patología Molecular y Dianas Terapéuticas. Nombrado Presidente Territorial de Madrid de la Sociedad Española de Anatomía Patológica (SEAP) en el año 2012.

Autores

David de Pablo Velasco

Técnico Superior de Anatomía Patológica y Citología. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Pedro Espinosa González

Técnico Superior de Anatomía Patológica y Citología. CNIC, Madrid

Lourdes Estrada Muñoz

Médico Residente Especialista en Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

José Manuel González Quintana

Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citología. Hologic Iberia S.L.

Julián Sanz Ortega

Profesor Titular de Anatomía Patológica y Facultativo Especialista de Área. Hospital Universitario Clínico San Carlos y Universidad Complutense de Madrid. Madrid

María Suárez Solís

Médico Residente Especialista en Anatomía Patológica. Hospital Universitario Clínico San Carlos. Madrid

Índice

Capítulo 1

Realización del procesamiento de la muestra	15
1. Materiales, reactivos y equipos en histotecnología y citotecnología	16
2. Uso eficiente de recursos	22
3. Seguridad y prevención de riesgos en el laboratorio. Gestión de residuos	23
4. Características macroscópicas de la muestra	29
5. Proceso de fijación tisular	30
6. Decalcificación y reblandecimiento tisular	34
7. Artefactos	35
8. Registro y conservación de muestras	37
Capítulo 2	
Capítulo 2 Realización de bloques de tejidos	45
	45
Realización de bloques de tejidos	45 46
Realización de bloques de tejidos	
Realización de bloques de tejidos. 1. Fundamentos y proceso de inclusión de muestras para microscopia óptica y electrónica: deshidratación, aclaramiento e infiltración	46
Realización de bloques de tejidos 1. Fundamentos y proceso de inclusión de muestras para microscopia óptica y electrónica: deshidratación, aclaramiento e infiltración	46
Realización de bloques de tejidos. 1. Fundamentos y proceso de inclusión de muestras para microscopia óptica y electrónica: deshidratación, aclaramiento e infiltración	46 50 53

Capítulo 3

A	plicación de técnicas de corte	63
1.	Tipos de microtomos y componentes: oscilación, rotación, deslizamiento,	
	criostato y ultramicrotomo, entre otros	64
2.	Preparación de equipo. Orientación del bloque y la cuchilla	67
3.	Técnicas de corte según el microtomo y la composición del bloque	69
4.	Problemas en la sección de especímenes y resolución de los mismos	71
	Extensión y montaje de la muestra	73
6.	Cumplimiento de las normas de seguridad	75
Ca	pítulo 4	
A	plicación de técnicas de tinción	83
1.	Fundamentos y mecanismos generales de coloración	84
2.	Coloraciones histológicas de conjunto	85
3.	Técnicas de coloración no histoquímicas para la identificación de sustancias:	
	lípidos, glucógeno, mucina, fibrina y tejido conjuntivo, entre otros métodos	
	para estudios neurohistológicos	88
	Tinciones para la visualización de microorganismos	94
5.	Contrastado en microscopia electrónica	96
Ca	pítulo 5	
A	plicación de técnicas histoquímicas y enzimohistoquímicas	101
1.	Técnicas de tinción histoquímicas	102
2.	Tipos de tinciones histoquímicas	104
3.	Fundamentos, controles y aplicaciones de las técnicas de histoquímica	
	enzimáticas	114
	Técnicas de tinción para la determinación de enzimas	116
5.	Histoquímica de las lectinas y aplicaciones	117
Ca	pítulo 6	
A	plicación de técnicas inmunohistoquímicas	123
1.	Anticuerpos monoclonales y policionales. Marcaje de anticuerpos	124
2.	Fundamentos de los métodos inmunohistoquímicos: directos e indirectos	126
3.	Clasificación de las técnicas en función del marcador utilizado	127
4.	Procesamiento histológico y restablecimiento	
	de la inmunorreactividad tisular	129
5.	Procedimientos de las técnicas inmunohistoquímicas y controles	132
6.	Marcadores tumorales	134

Capítulo 7

Procesamiento de muestras celulares		
1. Materiales y equipos básicos para el procesamiento citológico	142	
2. Procesado general del material citológico	146	
3. Fundamento, reactivos y protocolos de las diferentes técnicas de tinción	150	
4. Control de calidad de la preparación. Conservación y archivado	154	
5. Bloques celulares. Concepto, fundamento y preparación	156	
Soluciones "Evalúate tú mismo"	163	



PROCESAMIENTO DE MUESTRAS CELULARES

David de Pablo Velasco, Pedro Espinosa González, José Manuel González Quintana

Sumario

- 1. Materiales y equipos básicos para el procesamiento citológico
- 2. Procesado general del material citológico
- 3. Fundamento, reactivos y protocolos de las diferentes técnicas de tinción
- 4. Control de calidad de la preparación. Conservación y archivado
- 5. Bloques celulares. Concepto, fundamento y preparación

La inmunohistoquímica es un método que permite la **localización de antígenos específicos** en tejidos o células (inmunocitoquímica) gracias a un **reconocimiento antígeno-anticuerpo**.

Hoy en día es una **técnica imprescindible** en anatomía patológica para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento, identificando moléculas, principalmente proteicas, que ofrecen claves diagnósticas, lo que permite además localizarlas morfológicamente en las distintas células o componentes del tejido.

I. ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES. MARCAJE DE ANTICUERPOS

Los anticuerpos pertenecen a un grupo de proteínas llamadas "inmunoglobulinas", sintetizadas por las células plasmáticas. Estructuralmente se caracterizan por tener dos unidades básicas: un par de cadenas ligeras (κ o λ) y un par de cadenas pesadas idénticas (α , γ , δ , ϵ o μ). Serán las cadenas pesadas las que determinen la clase de inmunoglobulina (IgA, IgG, IgD, IgE, IgM) (Figura 1).

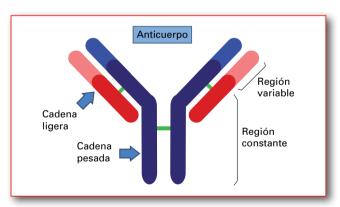


Figura 1. Estructura básica de los anticuerpos.

RECUERDA QUE

La inmunohistoquímica es uno de los mayores avances de la anatomía patológica moderna.

I.I. Anticuerpos monoclonales y policionales

Los anticuerpos pueden ser:

- ▶ Policionales: proceden de la activación de distintos clones de linfocitos B. Al proceder de células diferentes reaccionan con distintos epítopos en el mismo antígeno, con diferente afinidad y especificidad.
 - Ventajas: alta sensibilidad; menor susceptibilidad a las alteraciones del tejido durante el procesamiento.

2. □. Características de tinción de la hematoxilina-eosina (Figuras 1 y 2)

Núcleos: azul-negro.

Eritrocitos: naranja a rosa.

Estructuras restantes: rosado a rojo.

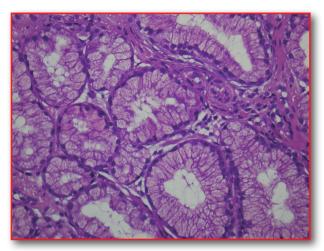


Figura 1. Tinción de hematoxilina-eosina de glándulas aástricas.



Figura 2. Contenedores de las distintas reacciones de hematoxilina-eosina en el teñidor automático.

2.5. Valoración de resultados

La causa más común de una tinción inadecuada en la técnica de hematoxilina-eosina es la mala fijación tisular. Otras causas que se deben considerar son el exceso o defecto de oxidación de la hemateína o de la diferenciación de la coloración y el empleo de una hematoxilina vieja o utilizada en exceso.

∃. TÉCNICAS DE COLORACIÓN NO HISTOQUÍMICAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SUSTANCIAS: LÍPIDOS, GLUCÓGENO, MUCINA, FIBRINA Y TEJIDO CONJUNTIVO, ENTRE OTROS MÉTODOS PARA ESTUDIOS NEUROHISTOLÓGICOS

∃.l. Coloraciones para lípidos (técnicas de grasa)

Los lípidos son sustancias orgánicas insolubles en agua total o parcialmente pero solubles en acetona, alcohol, cloroformo, éter, etc.



RECUERDA QUE

La causa más común de una mala tinción de hematoxilina es la mala fijación del tejido.



AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

Desde el punto de vista histoquímico, los lípidos se dividen en:

- **Lípidos homofásicos:** se encuentran en los tejidos en estado puro concentrados en un territorio particular de la célula (una gota de grasa en el citoplasma de la célula). Para este tipo de lípidos las técnicas son Sudán y Oil red O.
- Lípidos heterofásicos: los que se encuentran mezclados con otras sustancias. Se usa la técnica histoquímica de coloración como PAS (glucolípidos y ciertos métodos para ésteres de colesterol).

Las **técnicas** son:

- **Sudán IV:** tiñe el lípido de rojo intenso a naranja-rojizo (Figura 3).
- Sudán negro para lípidos: tiñe núcleos y citoplasma de rojo, lípidos y mielina de negro.
- **Azul de Nilo (método de Lillie):** tiñe grasas neutras de rosa a rojo y ácidos grasos de azul oscuro.

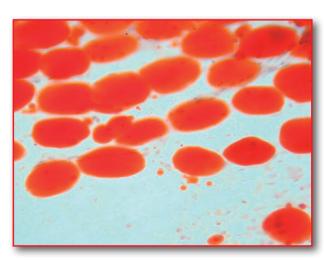


Figura 3. Tinción de Sudán IV para ver en rojo los lípidos.



RECUERDA QUE

Los lípidos o grasas se disuelven y desaparecen con técnicas habituales de tinción y requieren técnicas específicas para verlas.

Técnica	Tiñe	Uso
Tricrómico de Masson Colágeno tipo I: azul oscuro; tipos III y IV: azul claro. Mucina: verde o azul; núcleo negro; queratina y músculo liso: rojo		Hígado, riñón
Von Kossa	Calcio: negro; tejido: rojo.	Calcio, malacoplaquia
Warthin-Starry Espiroquetas: negro; bacilos: negro; tejidos: amarillento a marrón claro Infecciosos		Infecciosos
Wrights	Gránulos eosinofílicos: rosa; neutrofílicos: púrpura; citoplasma linfocitos: azul	Sangre
Ziehl-Neelsen	Bacilos ácido-alcohol resistentes (tuberculosis): rojo; tejido: azul	Micobacterias

2. TIPOS DE TINCIONES HISTOQUÍMICAS

⊇.l. Reacciones histoquímicas para hidratos de carbono

Se basan en la **demostración de grupos carbonilo** formados sobre los hidratos de carbono por oxidación previa. Aquí se describen las más importantes.

2.1.2. Técnica de PAS (ácido periódico Schiff)

Es la más utilizada en muchos laboratorios. Consiste en oxidar los tejidos mediante el **ácido periódico** (HIO $_4$) para incrementar el número de grupos carbonilo (aldehído o cetona) presentes en ellos, de forma que puedan ser mostrados posteriormente mediante reactivo de Schiff. El material PAS positivo se ve rojo oscuro o magenta. Detecta polisacáridos simples (glucosa, celulosa) y complejos (neutros, mucoproteínas). Son negativos los mucopolisacáridos ácidos que no pueden ser oxida-

dos por el ácido periódico.

A B

Figura 1. Tinción de PAS para ver material mucoide en una adenocarcinoma con células en anillo de sello (A) o "hifas" de hongos en color rojizo (B).

Se usa para ver moco o sustancias mucinosas, membranas basales (Figura 1A) y muchos hongos y parásitos (Figura 1B). La variante PAS-digestión con diastasa sirve para distinguir si el material PAS positivo es glucógeno, en cuyo caso desaparece con la diastasa.

2.2. Histoquímica de grasas, proteínas y ácidos nucleicos

Desde la introducción de los métodos inmunohistoquímicos, que permiten caracterizar antigénicamente la mayor parte de las proteínas, los métodos histoquímicos para proteínas han perdido vigencia, pero siguen empleándose algunos:

Rojo Congo: para detectar la presencia de proteína amiloide (Figura 4).

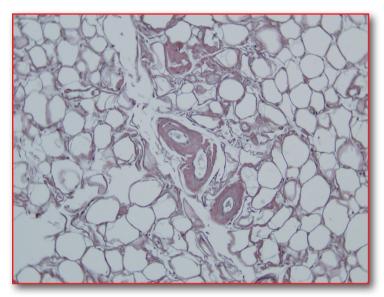


Figura 4. Material amiloide (proteico) teñido con rojo Congo alrededor de vasos sanguíneos.

- **Fontana-Masson:** para detectar la presencia de melanina, gránulos argentafines y cromafines o pigmentos como lipofuchina. Se usa especialmente para diagnosticar melanomas y tumores neuroendocrinos.
- **) Grimelius:** antiguamente se empleaba también para diagnosticar tumores neuroendocrinos, porque detectaba las proteínas de los gránulos argentafines y argirófilos.
- lina (Figura 5): las técnicas de reticulina (Gomori, Gordon-Sweet) sirven para distinguir diferentes tipos de colágeno, el maduro o tipo I y los inmaduros o tipos III y IV, en marrón los primeros y en negro estos últimos, y para distinguir por ejemplo en negro las membranas basales que tienen colágeno tipo IV (ver Figura 5).

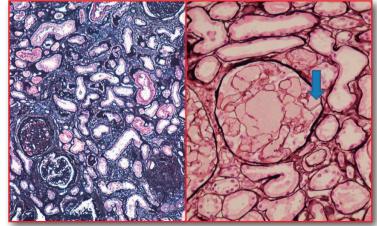
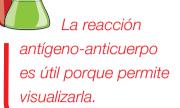


Figura 5. Técnicas de reticulina en riñón en las que se ven en negro las membranas basales. Marcada con flecha imagen de doble contorno en un glomérulo.



I. ≥. Marcaje de anticuerpos

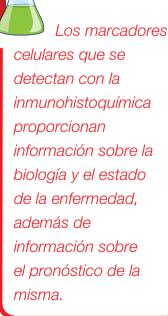
La **reacción antígeno-anticuerpo** es útil porque permite visualizarla, y esta visualización puede llevarse a cabo gracias al marcaje de los anticuerpos mediante diferentes técnicas. En función del marcador utilizado podrán clasificarse las técnicas de inmunohistoquímica, como se verá en el apartado "Clasificación de las técnicas en función del marcador utilizado".

2. FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS: DIRECTOS E INDIRECTOS

La inmunohistoquímica surgió como herramienta de los investigadores que proporcionaba información adicional al estudio morfológico que realizaba el patólogo. Los marcadores celulares que se detectan con la inmunohistoquímica proporcionan información sobre la biología y el estado de la enfermedad, además de información sobre el pronóstico de la misma.

El marcaje de los anticuerpos puede realizarse de forma directa o indirecta.

Directa: se marca el anticuerpo primario que va a reaccionar con el antígeno. La técnica es muy rápida pero poco sensible (Figura 3). El principal inconveniente es que exige que se marquen tantos anticuerpos como antígenos se quieran detectar.



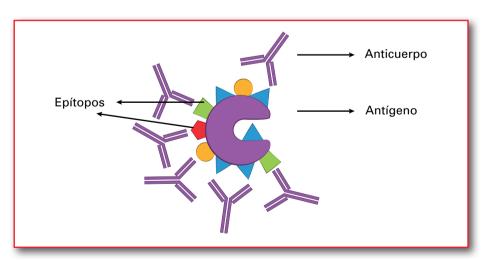


Figura 3. Reacción antígeno-anticuerpo con marcaje directo.

Indirecta: se marca un anticuerpo secundario que se unirá al anticuerpo primario (Figura 4). Las ventajas del método indirecto es que permiUna mala
orientación del bloque
puede hacer perder
una parte clave de la
muestra o romper el
bloque.

la cara interna de la cuchilla. En ese momento hay que comprobar el paralelismo entre el bloque y la cuchilla. En caso de no ser correcto hay que corregir la irregularidad con las dos ruedas que existen en la rótula del portabloques, una para la orientación horizontal y la otra para la orientación vertical del portabloques.

⊇.l. Portacuchillas

Al igual que el portabloques, para poder hacer una correcta orientación del portacuchillas hay que ayudarse de un bloque de parafina. La orientación de la cuchilla viene dada por la angulación de esta con respecto al bloque. Una incorrecta orientación puede provocar desde no conseguir cortar hasta romper el bloque y la muestra. Cada microtomo precisa de una angulación que debe proporcionar el fabricante; también puede variar dependiendo del tipo de cuchilla que se use. La angulación media suele ser entre 10° y 15°, y se puede variar con una palanca que tiene el portacuchillas.

*รู*ยรยรยรยรยรยรยรยรยร*ู*ยรู้

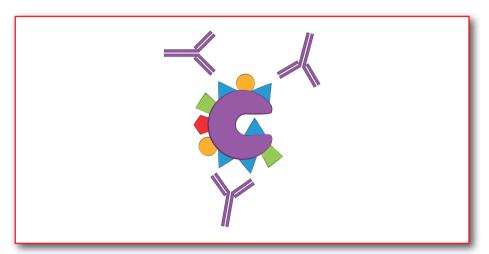
AMPLÍA TUS CONOCIMIENTOS

Tipos de cuchillas para el microtomo:

Hasta hace poco tiempo los técnicos tenían sus propias cuchillas, que ellos mismos mantenían. En la actualidad se emplean cuchillas desechables. Existen básicamente cuatro tipos de cuchillas:

- **Bicóncava en ambas caras:** para cortar bloques de parafina blanda en microtomo de rotación. Tiene la desventaja de su excesiva vibración, aunque hace cortes excelentes en tejidos suficientemente blandos.
- Planocóncavas: su utilización viene determinada por su grado de concavidad en su lado no plano. Las más cóncavas se usan para bloques de parafina en microtomo de deslizamiento, las menos cóncavas para cortar bloques de tejido incluido en celoidina.
- **)** Biplana o en cuña: es la más habitual y se usa indistintamente para bloques de parafina o en congelación; aguanta tejidos más duros.
- **Biplana con faceta**: se emplea cuando el tejido es muy duro.

ten solo se tenga que marcar un anticuerpo, la versatilidad (un mismo anticuerpo secundario puede unirse a varios anticuerpos primarios), es un método más sensible que el anterior. Su principal inconveniente es que pequeñas cantidades de antígeno pueden no ser detectadas.







1 a

inmunofluorescencia consiste en una reacción antígenoanticuerpo que se hace visible mediante el marcaje del anticuerpo con un colorante fluorescente.

∃. CLASIFICACIÓN DE LAS TÉCNICAS EN FUNCIÓN DEL MARCADOR UTILIZADO

∃.l. Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un proceso que consiste en una reacción antígeno-anticuerpo que se hace visible mediante el marcaje del anticuerpo con un colorante fluorescente, que se manifiesta tras su exposición a la luz ultravioleta emitida por el microscopio (Figura 5).

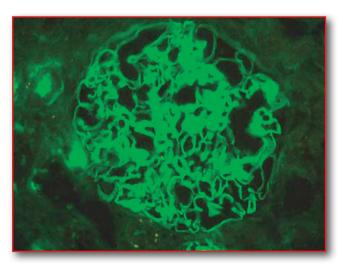
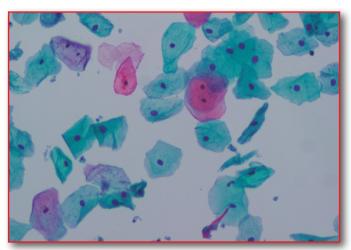


Figura 5. Imagen de inmunofluorescencia utilizando como fluorocromo la fluoresceína.



RECUERDA QUE

Los fluorocromos más utilizados son la fluoresceína (emite fluorescencia color verde manzana) y la rodamina (emite fluorescencia color roja-anaranjada).



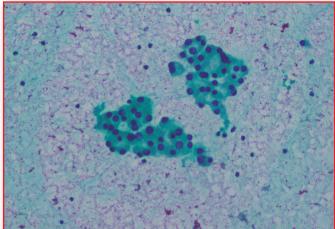


Figura 17. Papanicolau.

Figura 18. Papanicolau.

Las preparaciones previamente fijadas pasan a:

	0 :
Agua corriente	3 min
Hematoxilina de Harris	3 min
Agua corriente	Lavar durante 2 min
Alcohol 96°	1 min
Orange G	1 min
Alcohol 70°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol 70°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
EA-50	5 min
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol absoluto	15 inmersiones sucesivas
Alcohol absoluto	15 inmersiones sucesivas
Xilol	15 inmersiones sucesivas
Xilol	15 inmersiones sucesivas
Montaje	

Para que los reactivos se mantengan limpios más tiempo se puede escurrir sobre papel de filtro las extensiones antes de pasarlas al siguiente reactivo.

No hay que olvidar renovar una vez por semana todas las soluciones de la batería de tinción para que la coloración celular sea óptima.

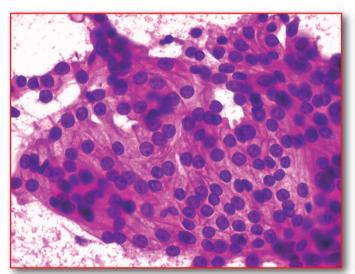
Diff-Quick: esta técnica se realiza sobre extensiones secadas al aire. La técnica consiste en la combinación de dos coloraciones



RECUERDA QUE

Los tiempos de los colorantes pueden variar dependiendo de la casa comercial. Después de realizar esta técnica sobre una citología sería posible realizar la técnica de Papanicolaou sobre esta sin necesidad de decolorarla previamente.

- Hematoxilina-eosina: esta técnica es muy utilizada no solo en citología, sino también en histología (llegando a ser la tinción más utilizada para esta última). Consta de dos partes: la tinción celular y la tinción citoplasmática. Existen múltiples variantes, según el tipo de hematoxilina que se utilice.
 - Hematoxilina: existen varios tipos; las más utilizadas son la de Harris (se utiliza si la muestra se seca al aire) y la de Carazzi (si la muestra se fija en alcohol de 96°). Colorea el núcleo celular confiriéndole un color azul-azul oscuro (Figura 21).
 - ▶ Eosina: es el colorante de contraste. Colorea el citoplasma celular en tonos rosáceos o anaranjados (Figura 22).



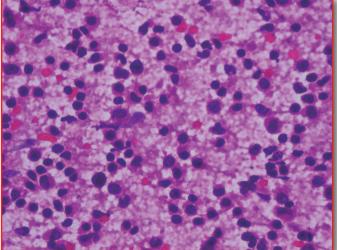


Figura 21. Hematoxilina-eosina.

Figura 22. Hematoxilina-eosina.

Si la muestra se recibe secada al aire:

Hematoxilina de Harris	1 min
Agua corriente	Lavar en abundante agua
Eosina	10 inmersiones sucesivas
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol 96°	15 inmersiones sucesivas
Alcohol absoluto	15 inmersiones sucesivas
Alcohol absoluto	15 inmersiones sucesivas
Xilol	15 inmersiones sucesivas
Xilol	15 inmersiones sucesivas
Montaje	

La hematoxilinaeosina es una técnica
muy utilizada no solo
en citología, sino
también en histología.
Consta de dos partes:
la tinción celular y la
tinción citoplasmática.

RESUMEN

- ✓ La inmunohistoquímica se basa en la detección de una reacción antígeno-anticuerpo que puede visualizarse gracias al marcaje de los anticuerpos, ya sea de forma directa o indirecta, mediante fluorocromos o enzimas.
- ✓ El procesamiento histológico puede alterar esta reacción o su visualización y para reducir o controlar estos cambios serán útiles las técnicas de recuperación antigénica, el bloqueo endógeno de la actividad enzimática, el bloqueo de la tinción de fondo, el uso de controles y de amplificadores de señal. La inmunohistoquímica ha supuesto, junto a la biología molecular, la revolución de la anatomía patológica moderna.

GLOSARIO

Anticuerpo: inmunoglobulinas sintetizadas por las células plasmáticas.

Anticuerpo monoclonal: anticuerpos idénticos, pues proceden de la misma célula plasmática y se unen a un solo epítopo de un antígeno.

Anticuerpo policional: anticuerpos creados por inoculación del antígeno en un organismo hospedador. El resultado es que se generan diversas estirpes de anticuerpos que reconocen diferentes partes del antígeno.

Anticuerpo primario: es el anticuerpo que se une al antígeno, el primero en el protocolo de tinción.

Anticuerpo secundario: anticuerpo que se une al anticuerpo primario. Forma un puente entre el anticuerpo primario y el reactivo que lleva acoplada la enzima reveladora.

Antígeno: cualquier molécula capaz de unirse a un anticuerpo.



EJERCICIOS

- **)** E1. Describe técnicas para tejido conjuntivo.
- **)** E2. Describe los pasos de la técnica hematoxilina-eosina.
- **)** E3. Describe técnicas para tejido nervioso.
-) E4. Describe técnicas para lípidos.
- **)** E5. ¿Qué técnica tiñe las mucinas?

EVALÚATE TÚ MISMO



- 1. Para descubrir las neuronas, Ramón y Cajal empleó:
 - ☐ a) Hematoxilina-eosina.
 - ☐ b) Sudán IV.
 - ☐ c) Impregnaciones metálicas.
 - ☐ d) Microscopia electrónica.
- 2. Los colorantes de tipo físico están ligados a las propiedades de:
 - ☐ a) Disolución (solubilidad) e impregnación (adsorción).
 - ☐ b) Reacción química entre el colorante y la estructura objeto de tinción.
 - ☐ c) Formación de uniones intermoleculares por atracción electrostática
 - ☐ d) Fuerzas de tensión superficial responsables de la interacción molecular en los líquidos.
- 3. Para identificar astrocitos y células de la glía se utiliza:
 - ☐ a) Hematoxilina ácida fosfotúngstica.
 - b) Orceína.
 - c) Tetróxido de osmio.
 - ☐ d) Luxol® fast blue.









http://www.aranformacion.es/_soluciones/index.asp?ID=20