

P. DEL RÍO-HORTERA

COLORACIÓN RÁPIDA DE TEJIDOS NORMALES Y PATOLÓGICOS CON CARBONATO DE PLATA AMONIACAL.  
*(Boletín de la Sociedad española de Biología, Año IX, Marzo de 1919).*

TRABAJOS DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA DE LA JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS — Núm. 7. —



Notas técnicas.

## Coloración rápida de tejidos normales y patológicos con carbonato de plata amoniacaal

P. DEL RÍO-NORTEGA

(Del Laboratorio de Histopatología de la Junta para Ampliación  
de Estudios).

Los procedimientos de coloración actualmente empleados en los laboratorios clínicos no siempre permiten resolver con rapidez y seguridad los problemas referentes al diagnóstico histopatológico. La fijación defectuosa de los tejidos y la escasa efectividad de los colorantes a base de hematoxilina o de anilinas básicas son causa frecuente de que las imágenes microscópicas carezcan de la necesaria claridad para que pueda practicarse en poco tiempo el reconocimiento de las lesiones.

En los estudios de histología normal y patológica, si se tiene la debida calma para efectuar los métodos de coloración siguiendo estrictamente las normas señaladas por los autores, no es difícil obtener los efectos buscados; pero en las investigaciones histopatológicas, cuando el clínico necesita conocer con urgencia la naturaleza de un proceso, la ejecución apresurada de las operaciones de fijación y teñido suministra casi siempre coloraciones poco selectivas e imágenes irreconocibles.

No es infrecuente que el cirujano precise conocer durante el acto operatorio la naturaleza inflamatoria o neoplásica, la benignidad o malignidad de una formación patológica a fin de proceder ulteriormente deteniendo o ampliando la intervención quirúrgica. En estos casos recurrirse, de ordinario, a la fijación por el calor y a las dobles y triples coloraciones clásicas (hematoxilina-eosina, Van Giesson, Cajal) que, aunque no proporcionan tan bellos aspectos

## S BOLETIN DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE HISTOLOGÍA

microscópicos como cuando son hechas con calma, bastan para discernir los procesos histopatológicos más típicos y expresivos; sin embargo, en los casos dudosos donde se requiere que los caracteres específicos de las células aparezcan vigorosamente acusados, los métodos referidos carecen de finura y electividad y se muestran marcadamente insuficientes para establecer a favor de ellos un diagnóstico rápido y exacto.

Precisase, por consiguiente, un método seguro que permita obtener coloraciones perfectas en pocos minutos y que sea aplicable a productos patológicos recién extirpados.

No tenemos el propósito de criticar los procedimientos de coloración rápida más a menudo utilizados en los laboratorios, pero sí de dar a conocer uno que por su sencillez y constancia supera a todos ellos. Es una simplificación de nuestro método al carbonato de plata en solución amoniacal (para la tinción del tejido conjuntivo y la neuroglia) (1), que tiende a conseguir la impregnación nuclear, principalmente, y a facilitar la aplicación de coloraciones complementarias con los reactivos usuales, dando aspectos histológicos equivalentes a los del método de Van Giessen, pero de mayor belleza y contraste.

Sabido es que un método de coloración aplicable al estudio de productos patológicos precisa no alejarse mucho en sus efectos de los procedimientos generalmente usados por los investigadores, porque apoyándose gran parte de la histología normal y patológica en imágenes obtenidas con los métodos clásicos, hay que buscar en dichas imágenes la equivalencia estructural que, según el criterio de Nissl, permitirá diferenciar lo normal de lo patológico.

Un método histológico, pues, para que ofrezca utilidad en la práctica diaria exige como condiciones esenciales: 1.º, que muestre las diferentes estructuras con aspectos semejantes a los que estamos habituados a observar con los métodos comunes; 2.º, que posea mayor constancia y electividad y exija menor tiempo que ellos.

El carbonato de plata amoniacal, cuyas aptitudes cromáticas por la neuroglia, células y fibras nerviosas, conectivo, tejido muscular estriado, etc., han sido evidenciadas en publicaciones inte-

(1) P. DEL RÍO-HORTEGA: Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglia y del tejido conjuntivo. *Trab. del Lab. de Inv. Biol.*, 1919.

## COLORACIÓN RÁPIDA DE TEJIDOS NORMALES

9

resantes por Fañans (1), Fernández Galiano (2), Madrid Moreno (3), Guijera (4), Calandre y Mier (5), Prados (6), etc., suministra también los mejores resultados cuando se aplica a la coloración nuclear en sustitución de los colorantes ordinarios.

Redúcese la técnica a tratar sucesivamente los cortes por el licor de carbonato argénitico y el formol.

Para obtener una coloración simple se requiere preparar los siguientes reactivos:

- 1.<sup>o</sup> *Fijador*: Formol en solución al 10 por 100.
- 2.<sup>o</sup> *Impregnador*: Solución amoniacal de carbonato argénitico (7):

Solución de nitrato de plata al 10 por 100...	50 cent. cdb.
Solución de carbonato de sosa al 5 por 100...	150 —
Amoníaco, cantidad suficiente para disolver el precipitado (8).	
Agua destilada.....	550 —

- 3.<sup>o</sup> *Reducutor*: Solución de formol al 1 por 100.

Para la coloración de la neuroglia y de las fibras nerviosas existe notoria ventaja en el empleo de carbonato argénitico preparado con carbonato de litina; pero todas las demás estructuras tiñibles con dicho reactivo consienten perfectamente el uso del licor argénitico obtenido a base de carbonato de sosa. La coloración rápida exige el uso de este reactivo, pues el carbonato de litina proporciona imágenes groseras. Explíquense estas diferencias por el exceso de carbonato sódico o litico que debe llevar la solución argénitica.

- 
- (1) J. B. Fañans: Alteraciones de la neuroglia en la rabia. *Bol. de la Soc. Esp. de Biol.*, 1918.
  - (2) E. Fernández Galiano: Estudio histológico de los corazones branquiales de Sepia officinalis, etc. *Bol. de la Soc. de Hist. Nat.*, 1919.
  - (3) Madrid Moreno: Topografía del tejido conjuntivo en los tentáculos de los cefalópodos. *Bol. de la Soc. de Hist. Nat.*, 1919.
  - (4) L. Guijera: Contribución al estudio de la génesis y evolución del folículo de Granit. *Bol. de la Soc. Esp. de Biol.*, 1918.
  - (5) L. Calandre y L. Mier: Sobre la fina estructura del miocardio estudiada con el método de Rin-Hortega. *Bol. de la Soc. Esp. de Biol.*, 1918.
  - (6) E. Prados Such: Los corpúsculos polimorfos de la foice dentada en el mono. *Com. a la Soc. Esp. de Biol.*, 1919.
  - (7) Este líquido se conserva indefinidamente en frasco antifotográfico.
  - (8) En sustitución del amoníaco puede utilizarse la purpurina como disolvente del carbonato argénitico; pero el licor así obtenido, que es utilizable en igual número de casos que la solución amoniacal, no ofrece suficientes ventajas para que sea aconsejable su empleo. Actúa muy rápidamente, pero es mucho más caro que el licor amoniacal.

Mediante la coloración rápida con la solución amoniacal de carbonato de plata podemos obtener preparaciones provisionales y definitivas. La técnica difiere un poco en ambos casos, pues si bien en el primero se necesita acelerar todo lo posible la fijación, recurriendo a procedimientos bruscos, en el segundo puede efectuarse aquella siguiendo las reglas ordinarias.

En las coloraciones eventuales, con fines diagnósticos, basta con efectuar las dos operaciones fundamentales: impregnación argéntica y reducción en formol (hasta la fijación puede suprimirse si la consistencia de los tejidos lo consiente); pero en las preparaciones destinadas a estudiar al detalle los tejidos, conviene — aunque no sea indispensable — facilitar el resalte de las distintas estructuras mediante coloraciones complementarias.

#### TÉCNICA (1)

##### 1.º Fijación de los tejidos en formol al 10 por 100.

Trozos de variable extensión, cuyo espesor no excede de 4 a 5 milímetros, sumérgense en formol hirviente, donde se mantienen durante un minuto. El mismo efecto se logra en cinco a diez minutos a la temperatura de 60-70°.

Por lo general, no se precisa tanta rapidez y puede prolongarse la fijación a voluntad relacionándola con la temperatura; así, en la estufa a 35° permanecerán las piezas de 10 a 15 horas, y a la temperatura ordinaria uno o dos días.

(1) Recuérdense las reglas definitivas (\*) que hemos propuesto para la coloración del tejido conjuntivo, neuroglia protoplásrica y fibrosa, tejido muscular estriado, etc.:

1.º Fijación en formol al 10 por 100 o formol bromurado (para la neuroglia). Cortes por congelación.

2.º Lavado de los cortes tres veces, cuando menos, en agua abundante, para privarlos de formol.

3.º Coloración en carbonato argéntico amoniacal (a base de carbonato de litio) que se calienta a 50-60° hasta que los cortes toman un tinte amarillo tostado.

4.º Breve lavado en agua.

5.º Reducción en formol al 10-20 por 100.

6.º Virado en cloruro de oro al 1 por 500, calentado a 50-60° hasta que las secciones adquieran color púrpura oscuro.

7.º Fijación en hiposulfito de sodio al 5 por 100.

8.º Lavado, deshidratación, etc.

(\*) Nuevo método de coloración histológica e histopatológica. Bol. de la Soc. Esp. de Patol., 1955.



## COLORACIÓN RÁPIDA DE TEJIDOS NORMALES

11

La conservación indefinida en formaldehído al 10 por 100 no mermra ni dificulta la colorabilidad de los tejidos con el carbonato argéntico.

Es creencia muy extendida entre los histólogos que el formaldehído, por sí solo, constituye un mediano fijador de las finas estructuras protoplasmáticas y nucleares. Apóyase tal criterio en el hecho cierto de que las diferentes fórmulas de hematoxilina y de anilinas básicas apenas muestran aptitud por los tejidos fijados exclusivamente en formalina.

Mas, es preciso distinguir entre el poder de fijación del formaldehído y la cualidad de reducir o dificultar la coloración de ciertos orgánulos celulares mediante los reactivos que mejor los tinen cuando se emplean otros fijadores.

El formaldehído es un buen fijador, pero no debe ser empleado cuando haya de colorearse con hematoxilina y anilinas; resérvese para las impregnaciones metálicas y se obtendrán, con diferentes métodos, las más perfectas tinciones de la cromatina, las mitocondrias y granos de cimógeno, el centrosoma, el retículo diferenciado en fibrillas, etc.

*2.º Obtención de cortes por congelación.*

Las secciones deben recogerse en agua; mas, si se desea ahorrar tiempo, no hay inconveniente en recogerlas directamente en el licor argéntico calentado a 45-50°.

*3.º Impregnación en la solución amoniacaal de carbonato ar-  
gentíco.*

Caliéntense los cortes a 45-50° durante uno o dos minutos. El mismo resultado se consigue en cinco a diez minutos a la temperatura del ambiente (1).

Los cortes deben quedar incoloros o ligeramente amarillentos.

*4.º Reducción en formaldehído al 1 por 100.*

Sin previo lavado, sumérganse las secciones en la solución formaldehídica, agitándolas suavemente hasta que se tinen de color amarillo. El tinte grisáceo-amarillo se debe a la escasa permanencia en el baño de plata y puede corregirse, sin inconveniente, volviendo a pasar los cortes al licor argéntico y después al formaldehído otra vez.

El reductor se enturbia al mismo tiempo que los cortes se tinen, pero no hay peligro de que se formen precipitados.

(1) La solución piridínica de carbonato de plata actúa en mucho menos tiempo, bastando unas cuantas segundas en caliente y un minuto en frío para que se efectúe la impregnación.

*La coloración puede darse aquí por terminada, pues la variedad de matices (en la gama del pardo) adquiridos por los núcleos de las distintas especies celulares, protoplasmas y substancias intersticiales, basta para efectuar los exámenes de conjunto. Sin embargo, resulta ventajoso continuar la técnica en la forma siguiente:*

5.<sup>o</sup> *Virado en solución de cloruro de oro al 1 por 500, hasta que los cortes adquieran color gris uniforme (medio minuto, aproximadamente).*

6.<sup>o</sup> *Fijación en hiposulfito de soda al 5 por 100 (un instante).*

7.<sup>o</sup> *Lavado en agua.*

8.<sup>o</sup> *Coloración complementaria con picro-fuchina, vertiendo dos o tres gotas de ella sobre el corte recogido en el porta-objetos. Unos cuantos segundos son tiempo suficiente para que la fuchina y el ácido pírico se fijen con avidez sobre las estructuras apetecidas; mas conviene advertir — pues es una de las mayores ventajas de este método — que no existe riesgo ninguno en prolongar la actuación del líquido de Van Gieson, puesto que no ejerce acción perjudicial alguna sobre las estructuras impregnadas por la plata.*

Gracias a esta circunstancia pueden obtenerse con la píro-fuchina las más completas y bellas tricromías, cosa harto difícil cuando se emplea la hematoxilina como colorante nuclear, pues sabido es cuánto palidece con el Van Gieson.

La solución pírica de indigo-carmín (fórmula de Cajal), puede ser también empleada para la tinción complementaria. Después de usarla es indispensable practicar un ligero lavado de los cortes en agua común.

9.<sup>o</sup> *Deshidratación, aclaramiento y montaje.*

Para la deshidratación aconsejamos emplear solamente alcohol de 95°, que tiene sobre el absoluto la ventaja de atenuar la retracción de los cortes.

Consideramos como aclarador ideal para las coloraciones argénicas la mezcla de

Ácido fénico cristalizado .....	10 partes.
Cresota de haya .....	10 —
Xilel o telnol .....	80 —

que goza de las siguientes ventajas: no exigir el uso de alcohol absoluto, distender y suavizar los cortes, devolviéndoles sus dimensiones naturales y evitar que se adhieran al papel chupón empleado para enjugarlos antes de poner el bálsamo.



También se obtienen buenos resultados con el alcohol carbólico al 15 por 100 o la mezcla de ácido fénico (10 p.), creosota (10 p.), y alcohol de 95° (80 p.) que sirven a la vez como deshidratantes y aclaradores.

### RESULTADOS

Mediante la técnica descrita se obtienen en siete u ocho minutos coloraciones absolutamente equivalentes a las del método de Heidenhain-picro-fuchina: núcleos violáceos o negruzcos; figuras mitóticas de color negro; protoplasmas amarillos; tejido conjuntivo (colágeno) rojo puro, más o menos intenso.

No es infrecuente que las células conjuntivas jóvenes ofrezcan sus expansiones perfectamente teñidas.

Dos tipos celulares aparecen predilectamente impregnados por el carbonato argéntico: 1.º, las células emigrantes del tejido conjuntivo que, exhibiendo formas alargadas, angulosas y ramificadas, estructuras esponjosas y vacuolares e inclusiones granulosas, ocupan las lagunas linfáticas y se insinúan por los resquicios de la trama conjuntiva, atraídas por estímulos irritantes (procesos inflamatorios y neoplásicos) para ejercer en ellos funciones fagocitarias, de cuyos corpúsculos, que forman legión en los tubérculos y gomas y abundan en muchos tumores, trataremos extensamente en un trabajo aparte.

2.º, las células melanoforas de la piel de los mamíferos, tan incompletamente estudiadas hasta hoy por los autores, que han sido ya motivo de una comunicación a la Sociedad Española de Biología, en la que demostramos no sólo la naturaleza mesenquimal de las células intra-epidérmicas tenidas como nerviosas por algunos, sino también su génesis dérmica, su emigración a los estratos basales del epídermis y al bulbo piloso para proveer de pigmento a las células epiteliales y su participación en la estructura de ciertos tumores melánicos. La variedad de formas que adquieren y la multitud de expansiones ramificadas que emiten a través de los resquicios epidérmicos, vénse perfectamente teñidas mediante el carbonato argéntico amoniacal o pirídínico.

Algunas variaciones de la técnica sirven para evidenciar otros tipos celulares. Así, el calentamiento de los cortes en la solución de cloruro de oro no sólo refuerza la coloración nuclear y de algunas redes conectivas especiales (de los órganos hematopoiéticos

principalmente), sino que tinge en rojo salmonado el protoplasma de las células epiteliales y plasmáticas, junto con el de algunos corpúsculos de tipo amiboides (parientes de las Plasmazellen y semejantes por su forma (no por su estructura) a los clastmatocitos de Ranvier) existentes en el estroma de algunas neoplasias.

Por lo demás, es fácil la obtención de coloraciones complementarias de la grasa, mucina, hemosiderina, hemáties, etc., que revelen variedad de procesos patológicos.

#### RESUMEN

- 1.<sup>o</sup> Fijación en formol al 10 por 100 (un minuto en ebullición).
- 2.<sup>o</sup> Obtención de cortes por congelación.
- 3.<sup>o</sup> Impregnación en la solución de carbonato argénitico (un minuto a 45-50°).
- 4.<sup>o</sup> Reducción en formol al 1 por 100 (un minuto).
- 5.<sup>o</sup> Virado en cloruro de oro al 1 por 500 (un minuto).
- 6.<sup>o</sup> Fijación en hiposalito de sosa al 5 por 100 (medio minuto).
- 7.<sup>o</sup> Lavado rápido en agua.
- 8.<sup>o</sup> Coloración complementaria con picro-fuchina.
- 9.<sup>o</sup> Deshidratación, aclaramiento y montaje.

Esta variante (que pudiera llamarse *nuclear*) de nuestro método al carbonato de plata, puede aplicarse al estudio de tejidos normales y patológicos (singularmente flegmásias y neoplasias) en sustitución del proceder de Van Giesson, al cual aventaja en belleza, rapidez y constancia.