

TÉCNICA HISTOLOGICA

por

ABELARDO GALLEGO

ALGUNOS PROCEDIMIENTOS DE COLORACIONES COMBINADAS SU-
CESIVAS, A PARTIR DEL MÉTODO DE TINCIÓN CON LA FUCHINA
BÁSICA Y EL FORMOL ACÉTICO.

FUCHINA-FORMOL ACÉTICO-EOSINA. FUCHINA-FORMOL ACÉTICO-
AURANCIA. FUCHINA-FORMOL ACÉTICO-NARANJA G. FUCHINA-
FORMOL ACÉTICO-ÁCIDO PÍCRICO, ETC.

En técnica histológica se designan con los nombres de
dobles, triples y múltiples coloraciones, y, más general-
mente, con el de *coloraciones combinadas*, las que se ob-
tienen con dos, tres o más colorantes.

Tales tinciones pueden conseguirse haciendo actuar en
un solo tiempo o en tiempos distintos las diversas substan-
cias tintóreas; de aquí su división en *coloraciones combi-
nadas simultáneas* y *combinadas sucesivas*.

Para lograr las *coloraciones simultáneas* se usan líquidos
colorantes (mezclas complejas de materias tintóreas) di-
fíciles de preparar y más difíciles de conservar, que, ade-
más de no utilizarse sino en contado número de casos,
no siempre dan preparaciones aceptables.

Las *coloraciones sucesivas* se practican con líquidos
colorantes fáciles de preparar, que se conservan bien,
permiten gran número de combinaciones y, en fin, dan
en general resultados más seguros.

No es, pues, extraño que la mayoría de los histólogos prefieran las *coloraciones combinadas sucesivas* a las *simultáneas*, y desconfíen de esos productos colorantes, anunciados como panaceas histológicas, que, según sus autores, poseen propiedades casi sobrenaturales.

Convencidos, por propia experiencia, de la razón que asiste a la mayoría de los histólogos para preferir, en todos los casos, las *coloraciones combinadas sucesivas*, hemos puesto todo nuestro empeño en buscar, entre éstas, las más fáciles de obtener, las más económicas y, sobre todo, las de resultados más seguros.

Vamos, pues, a reseñar los trabajos que hemos realizado en este sentido, exponiendo antes, aunque parezca ilógico, los fundamentos científicos que han sido nuestra guía para lograr el fin que nos proponíamos y que, a nuestro juicio, deben ser siempre tenidos en cuenta para cualquier labor de investigación que haya de emprenderse en busca de nuevas *coloraciones combinadas sucesivas*.

FUNDAMENTOS CIENTÍFICOS DE LAS COLORACIONES COMBINADAS SUCESIVAS

Ya en 1914, al describir nuestro método de tinción con la fuchina básica y el formol, apuntábamos algunos de nuestros intentos para lograr dobles y triples coloraciones. Pero en aquella época eran mucho más numerosos nuestros fracasos que nuestros éxitos. Por esta razón, al señalar las dobles coloraciones que habíamos ensayado (fuchina-formol-eosina; fuchina-formol-rubina ácida; fuchina-formol-naranja G; fuchina-formol aurancia; fuchina-formol-ácido pícrico), sólo nos atrevimos a recomendar estas dos: fuchina-formol-naranja G, y fuchina-formol-ácido pícrico.

¿Por qué fracasábamos? Por lo que se fracasa siempre en trabajos de laboratorio: por pretender cosas imposibles.

En efecto: es imposible infringir la ley de la impenetrabilidad, y éste era precisamente nuestro propósito, aunque lo ignorábamos entonces. *Pretendíamos que dos colorantes, uno básico y otro ácido, ocuparan a la vez, y sin combinarse, un mismo lugar, un mismo tejido.* Claro que luchábamos contra tal ley física creyendo que no había necesidad de tenerla en cuenta, por considerar que el problema a resolver era absolutamente químico: *combinar un colorante ácido con elementos acidófilos y un colorante básico con elementos basófilos.*

Partíamos de la hipótesis de que *los colorantes básicos eran exclusivamente nucleares*, cuando, en realidad, *sólo son principalmente nucleares.* Y éste es el caso, no ya sólo de las anilinas básicas, sino hasta de la hematoxilina.

Así, cuando se hacen tinciones de tejidos con cualquier colorante de los *impropiamente llamados nucleares*, jamás se logra fijarle exclusivamente en los núcleos, pues que también tinte los protoplasmas, los elementos acidófilos. Este hecho, que se observa ya cuando se trata de tejidos que han sido incluidos en celoidina, es mucho más ostensible en los incluidos en parafina y, sobre todo, en los que no han sufrido ninguna de estas inclusiones, esto es, en los que se cortan por el método de la congelación. Y es que, en realidad, *la celoidina actúa como agente diferenciador de la coloración nuclear, oponiendo cierto obstáculo al colorante básico para su fijación en los elementos acidófilos.*

Pues bien; *una vez que los elementos acidófilos han sido teñidos por el colorante nuclear, difícilmente se logra impregnarlos con el colorante plasmático.* Pudiera decirse que sólo puede conseguirse en dos circunstancias: 1.^a, *cuando el colorante ácido disuelve, subtrae, en parte o totalmente, el colorante nuclear, fijado en los elementos acidófilos,* y 2.^a,

cuando el colorante ácido se sobrepone, esto es, queda encima del colorante básico.

Así, y no de otro modo, se explica que tuviéramos éxitos al ensayar las coloraciones sucesivas: fuchina-formol-naranja G, y fuchina-formol-ácido pícrico, porque el naranja G y el ácido pícrico actuaban como diferenciadores de la fuchina básica, y así también se comprenden nuestros fracasos al intentar las coloraciones con la fuchina, el formol y la eosina, o con la fuchina, el formol y la aurancia, etc., aunque alguna vez lográsemos nuestro propósito, pero a expensas de un engrosamiento exagerado de los cortes.

Estos razonamientos que, como se ve, van contra prejuicios muy arraigados en los técnicos de la Histología, no fueron formulados por nosotros espontáneamente, sino después de detenido estudio.

He aquí cómo llegamos a descubrirlos.

En la época en que hacíamos nuestros trabajos corrientes de Histopatología, usando el método clásico de tinción con la hemateína y la eosina, al operar con cortes obtenidos por el método de la congelación, no obteníamos, ni mucho menos, el resultado que deseábamos.

Creyendo que, probablemente, la débil o pálida tinción de los núcleos obedecería al poco poder tintóreo de la hemateína, optamos por ensayar la hematoxilina de Ehrlich, bien madura; y si bien logramos una tinción más intensa de los elementos basófilos, pudimos observar que ocurría lo contrario con los elementos acidófilos. Pero como la tinción nuclear nos pareció ya excesiva, decidimos diferenciar la hematoxilina utilizando el agua o el alcohol clorhídricos, en la forma que habíamos visto aconsejada en varias obras de técnica histológica.

Así conseguimos una acción menos eficaz, pero suficiente, de la hematoxilina, y, al mismo tiempo, una tin-

ción mucho más acentuada con la eosina. Repetimos esta observación infinito número de veces ajustándonos a esta regla de conducta que siempre seguimos en nuestros trabajos de laboratorio. *Cuando un hecho se repite cien veces hay que principiar a dudar.*

Y para poder interpretar el resultado obtenido con la diferenciación de la hematoxilina, hicimos una serie de coloraciones regresivas y progresivas utilizando solamente la tinción con la hematoxilina de Ehrlich.

En las preparaciones así obtenidas apreciamos una diferencia fundamental: las primeras, es decir, las en que se había practicado la diferenciación, ostentaban una coloración más electiva, pues la hematoxilina se había fijado casi exclusivamente en los núcleos, mientras que las segundas, las no diferenciadas, aparecían teñidas de modo más uniforme, porque la hematoxilina estaba repartida en los elementos basófilos y acidófilos.

Una sola interpretación se imponía en este caso: *en las coloraciones combinadas sucesivas con la hematoxilina y la eosina, la diferenciación de la primera dejaba libres los elementos acidófilos de todo colorante básico (hematoxilina), lo que permitía una fijación adecuada del colorante ácido (eosina).*

Pero inmediatamente pensamos en que esta explicación no era solamente aplicable a las coloraciones con la hematoxilina y la eosina, sino a todas las coloraciones combinadas sucesivas.

Y bajo esta impresión volvimos a nuestra tarea, ya abandonada, de lograr dobles coloraciones a partir de la tinción con la fuchina y el formol.

Ante todo, para lograr nuestro propósito, necesitábamos encontrar un agente diferenciador de la coloración obtenida con la fuchina básica y el formol, y en este sentido comenzamos nuestras investigaciones.

Y bien; no vamos a repetir aquí lo que dejamos consignado en otro trabajo (*El formol acético, agente viro-fijador y diferenciador de las coloraciones obtenidas con la fuchina básica*); nos limitaremos a indicar que, tras de no pocos ensayos, logramos nuestro objeto, es decir, encontramos el agente diferenciador que buscábamos, y esto sin complicar la técnica del método fundamental, sino más bien simplificándola.

El agente diferenciador a que nos referimos es el ácido acético, que se le hace actuar a la vez que el formol, consiguiendo así, en un solo tiempo, transformar en violeta la coloración roja de la fuchina, fijar aquella coloración y, en fin, dirigirla hacia los elementos netamente basófilos, esto es, casi exclusivamente a los núcleos y a las sustancias cromotropas.

La fórmula del líquido *viro-fijador* y diferenciador que hemos adoptado es la siguiente:

Solución de formol al 1 por 100, en	
agua destilada	5 cc.
Acido acético cristalizable	1 gota

Una mayor concentración de la solución de formol o de ácido acético, sobre todo del primero, no altera sensiblemente el resultado.

Conseguido esto, habíamos dado ya el primer paso seguro para lograr completamente lo que buscábamos, si nuestro razonamiento tenía fundamento serio, es decir, si la diferenciación del colorante básico era condición esencial para obtener buenas coloraciones combinadas sucesivas. Y, llenos de confianza, recomenzamos nuestros ensayos, a partir de la tinción con la fuchina básica y el formol acético, para teñir los elementos basófilos, confiando a la eosina, aurancia, rubina ácida o a la aurancia la coloración de los acidófilos.

No nos habíamos equivocado. Nuestro éxito fué completo, absoluto. Todas las coloraciones que antes habíamos considerado como impracticables, pudimos lograrlas al primer ensayo. Es más: aun aquellas que habíamos ya obtenido empleando la tinción con la fuchina básica y el formol, esto es, las coloraciones sucesivas fuchina-formol-naranja G y fuchina-formol-ácido pícrico, resultaron más fáciles, más bellas y más seguras. Habíamos logrado *hacer entrar un hecho en una ley*, como diría el sabio Cajal.

Tales resultados nos autorizan para afirmar que *en las coloraciones combinadas sucesivas, la diferenciación del colorante nuclear es indispensable, aun en aquellos casos en que los colorantes ácidos actúan como diferenciadores, o, dicho de otro modo, en tales coloraciones, debe evitarse siempre la lucha entre colorantes básicos y ácidos, operando de tal suerte, que los primeros se fijen exclusivamente en los elementos basófilos y los segundos en los acidófilos.*

Y ahora, conocidas estas consideraciones preliminares, que hemos creído necesarias, imprescindibles, y que pudieran titularse *teoría de las coloraciones combinadas sucesivas*, sólo nos resta exponer la técnica de cada una de ellas y los resultados que se logran.

PROCEDIMIENTOS DE COLORACIONES COMBINADAS SUCESIVAS CON LA FUCHINA BÁSICA Y EL FORMOL ACÉTICO, LA EOSINA, EL NARANJA G O LA AURANCIA. — FUCHINA FORMOL ACÉTICO-EOSINA. FUCHINA-FORMOL ACÉTICO-NARANJA G. FUCHINA-FORMOL ACÉTICO-AURANCIA.

Para evitar confusiones y fracasos lamentables es de necesidad fijar bien el concepto que debe tenerse del colorante denominado *eosina*.

Langeron distingue cuatro grupos de *eosinas*:

1.º *Eosinas propiamente dichas*. Son sales de sodio o de potasio de la fluoresceína bromada, amarillas (derivados dibromados) o azules (derivados tetrabromados). Todas ellas se disuelven en el agua y en el alcohol. La más electiva para las granulaciones eosinófilas de los leucocitos es la eosina azulada al agua, de Grüber; no lo son tanto la eosina extra BA, de Höchst, ni la eosina amarilla al agua, de Grüber.

2.º *Eosinas solubles en alcohol*. Son eosinas-éteres metilados o etilados, solubles en alcohol de 50º.

3.º *Eritrosinas o eosinas iodadas*. Sales de sodio o de potasio de la fluoresceína tetraiodada.

4.º *Safrosina*. Derivado bromonitrado de la fluoresceína, y falclosina, sal de sodio de la fluoresceína clorada.

Sólo son utilizables como colorantes histológicos las eosinas propiamente dichas y las eosinas solubles en alcohol.

Hechas estas observaciones, de gran interés, como es fácil comprender, pasamos ya a describir la técnica que debe seguirse en cada caso.

1.º Fijación en formol al 10 por 100, 6-8 horas, en la estufa a 40º-45º. No importa prolongar la fijación por 10-12 horas, aunque es preferible que, transcurridas las 6-8 horas en la estufa, se continúe la fijación en frío. La doble fijación-alcohol de 80º, dos horas y formol al 10 por 100, una hora, y a 40º-45º, adolece del defecto de alterar los hematíes.

2.º Lavado en agua: 10-30 minutos.

3.º Congelación.

4.º Fuchina de Ziehl diluída al 1 por 20, 1 minuto. (Prepárese esta solución en el momento de utilizarla, vertiendo una gota de fuchina fenicada o «carbolfuchina» por cada cc. de agua destilada, y agitando la mezcla hasta que adquiera un color uniforme.)

5.º Lavado en agua.

6.º Formol acético; 5 minutos. (Viértanse en un pocillo de cristal 5 cc. de agua destilada y agréguese una gota de formol y otra de ácido acético. Agítese la mezcla y tápese bien para evitar la evaporación del ácido acético. Si la diferenciación en el formol acético no fuese tan completa como se desee — caso extraordinario — puede hacerse la diferenciación previa en solución alcohólica de guayacol al 10 por 100, durante 30 segundos, y, después del lavado en agua, termínese con la solución de formol acético.

7.º Lavado en agua.

8.º Solución acuosa de eosina amarilla (eosina extra B. A de Höchst), de naranja G o de aurancia, al 1 por 100, 5 minutos. (Preferimos la eosina de Höchst a las demás eosinas propiamente dichas y a las solubles en alcohol. Estas últimas tiñen muy lentamente.)

9.º Alcohol de 70º y alcohol de 90º hasta la desaparición del color rojo difuso, 3-5 minutos. (El empleo del alcohol de 70º es imprescindible en la coloración con la eosina. Si se utiliza el naranja G o la aurancia, pueden emplearse solamente los alcoholes de 95º y absoluto.)

10. Alcohol absoluto.

11. Xilol fenicado.

12. Montaje en bálsamo del Canadá.

Los núcleos se tiñen en violeta; las sustancias cromotropas en violeta más o menos rojizo; los hematíes en rojo ladrillo con la eosina, en amarillo naranja con el naranja G, y en amarillo con la aurancia; el tejido muscular en rosa vivo (eosina), en rojo naranja o amarillo naranja (naranja G) o en amarillo (aurancia); los epitelios queratinizados, en rosa intenso (eosina), rojo o amarillo naranja (naranja G), amarillo (aurancia); los microbios en violeta o rojo violáceo.

Puede hacerse una triple coloración empleando como colorante ácido una mezcla a partes iguales de eosina y naranja G, o una parte de eosina al 1 por 100 y dos de naranja G al 2 por 100. En este caso hay una doble coloración de los elementos acidófilos gracias a la distinta afinidad de éstos por la eosina o el naranja G; el tejido conjuntivo aparece en naranja y el muscular en rojo.

También puede hacerse la doble coloración con la fuchina ácida en solución acuosa al 0'5-1 por 100.

COLORACIÓN COMBINADA SUCESIVA CON LA FUCHINA BÁSICA, EL FORMOL ACÉTICO Y EL ACIDO PÍCRICO. — FUCHINA FORMOL ACÉTICO-ÁCIDO PÍCRICO.

La técnica de esta coloración no difiere de la que dejamos descrita para las coloraciones con la eosina, etc., sino en el 8.º tiempo. Así, pues, los cortes que han salido del formol acético, y lavados en agua pasan a la solución acuosa picricada (solución acuosa de ácido pícrico, preparada en caliente, 1 cc.; agua destilada 20 c.), que actúa durante $\frac{1}{2}$ -1 minuto.

Los núcleos y sustancias cromotropas se tiñen en violeta y violeta rojizo respectivamente; los elementos acidófilos en amarillo; los microbios en violeta o rojo violáceo.

Este procedimiento, que da siempre buenos resultados, tiene el inconveniente de que, al poco tiempo, el agradable color amarillo se hace verdoso muy feo.

Es lo mismo que nos ocurría con nuestro método tricrómico (fuchina de Ziehl diluída al 20 por 100; formol al 5 por 100; ácido pícrico — solución acuosa saturada 2 cc., agua destilada 10 cc. — que hemos abandonado — porque la coloración roja del tejido muscular y la ama-

rilla de las fibras conjuntivas era poco duradera y, además, los cortes aparecían muy engrosados.

* * *

Y ahora, después de describir estos procedimientos de coloraciones combinadas sucesivas, a fuer de sinceros, y aun a trueque de que quienes hayan seguido paso a paso nuestra labor se consideren defraudados, debemos hacer esta declaración:

Nuestro método de tinción con la fuchina básica y el formol acético, bien manejado, y es bien sabido cuán fácil es esto de conseguir, no tiene nada que envidiar a cualquiera de los procedimientos de coloraciones combinadas sucesivas ya señalados. Su doble carácter de método metacromático y panóptico (panóptico solamente por el gran número de elementos que revela y por la diversidad de matices que los comunica), hace innecesarias esas dobles coloraciones que dejamos descritas y tiene sobre ellas la ventaja de la mayor delicadeza en todos los detalles.

Pero necesitábamos publicar dichos procedimientos de coloraciones combinadas sucesivas: 1.º, para contestar con hechos a quienes han juzgado que la coloración con la hematoxilina y la eosina tendría siempre, sobre nuestro método de tinción con la fuchina y el formol acético, la gran ventaja de producir dobles coloraciones; 2.º, para demostrar a quienes todavía lo necesiten que los trabajos de laboratorio son algo más que trabajos manuales. ¡Trabajos manuales...! En los trabajos de laboratorio el cerebro es casi todo y las manos casi nada; 3.º, para probar, asimismo, que no todos los métodos histológicos son debidos a la casualidad, y que la lógica es todavía útil al investigador histólogo; 4.º, para poner de manifiesto la

conexión entre las coloraciones regresivas y los métodos tricrómicos.

CONCLUSIONES

1.^a La diferenciación de la tinción nuclear es absolutamente precisa para lograr buenas coloraciones combinadas sucesivas. Proceder de otra suerte es dificultar la tinción de los elementos acidófilos con los colorantes ácidos.

2.^a Aun en el caso de que la doble coloración se realice con colorantes ácidos que actúen como diferenciadores del colorante nuclear, la diferenciación no es menos necesaria. El resultado es siempre más seguro y las preparaciones ganan en belleza.

3.^a El ideal del técnico consistirá en fijar el colorante básico exclusivamente sobre los basófilos y el colorante ácido sobre los acidófilos.

4.^a El método de tinción con la fuchina básica y el formol acético, y los procedimientos de coloraciones combinadas sucesivas con la eosina, el naranja G, la aurancia el ácido pícrico, etc., que derivan de él, ofrecen grandes ventajas sobre el método clásico de tinción con la hematoxilina y la eosina, al menos aplicados a los cortes obtenidos por el método de la congelación.

*Laboratorio de Histología y Anatomía Patológica.
Escuela de Veterinaria de Santiago.*