

TÉCNICA HISTOLÓGICA

(1.^a NOTA)

por

ABELARDO GALLEGO

EL FORMOL AGENTE TRANSFORMADOR Y FIJADOR DE LAS COLO-
RACIONES OBTENIDAS CON LAS FUCHINAS BÁSICAS. — NUEVO
MÉTODO DE TINCIÓN UTILIZABLE EN HISTOLOGÍA Y ANATO-
MÍA PATOLÓGICA.

Un somero análisis de los métodos cromáticos utiliza-
dos en Histología y en Bacteriología, permite apreciar,
entre ellos, fundamentales diferencias, pues mientras en
Histología se prefieren los *colorantes naturales*, en Bacterio-
logía se usan casi de un modo exclusivo los *colorantes ar-
tificiales*. Y si se examinan más detenidamente los citados
métodos cromáticos, se advierte en seguida que, en téc-
nica histológica, son indispensables dos colorantes natu-
rales — hematoxilina y carmín, — en tanto que en téc-
nica bacteriológica, son asimismo imprescindibles tres
materias tintóreas artificiales — fuchina básica, violeta
de genciana y azul de metileno.

Claro está que tales diferencias, entre una y otra téc-
nica, no pueden obedecer a caprichos de histólogos y bacte-
riólogos, sino a que, los primeros han obtenido más seguros
y mejores resultados con la hematoxilina y el carmín,
mientras que los segundos han logrado tales fines con la fu-
china básica, el violeta de genciana y el azul de metileno.

Sin embargo, de día en día se acentúa más y más la

tendencia a utilizar las anilinas en las coloraciones de los tejidos. Pudiera afirmarse que, en plazo no lejano, la hematoxilina y el carmín sólo excepcionalmente serán empleados en técnica histológica.

Por de pronto, las anilinas ácidas — eosina, fuchina ácida, etc. — ya han tomado carta de naturaleza en técnica histo-patológica. Pero se nota cierta resistencia a usar las anilinas básicas. ¿Por qué? Primero, por la inseguridad de sus resultados y, segundo, por la dificultad de conservar sus coloraciones.

En efecto, es cierto que, en general, empleando las anilinas básicas, como colorantes histológicos, no se obtienen resultados constantes y seguros. La mayoría de las anilinas básicas son muy solubles en el alcohol absoluto, y no se puede prescindir del empleo de este agente deshidratante para poder montar y conservar las preparaciones en el bálsamo del Canadá. Se ha intentado, es verdad, montar y conservar las preparaciones histológicas en ciertas substancias que no exigen una deshidratación previa; pero su empleo no es tan fácil, ni su resultado tan satisfactorio como se podría imaginar.

Es también exacto, en general, que las preparaciones histológicas teñidas con las anilinas básicas no se conservan bien. El bálsamo del Canadá, úsese como se quiera — disuelto en xilol, o desprovisto de esencia por el cloroformo o por el calor — altera tales coloraciones. Y aunque se ha pretendido utilizar como agentes conservadores la levulosa, la gelatina glicerizada, la vaselina líquida, etc., la experiencia demuestra que no pueden substituir al bálsamo del Canadá.

Y es de lamentar que existan tales inconvenientes para el empleo de las anilinas básicas, pues en los casos en que se logran resultados favorables, las preparaciones son más bellas y más instructivas, gracias a las coloraciones me-

tacromáticas que se producen. Así, por ejemplo, cuando se obtienen buenas tinciones con la tionina, las preparaciones son verdaderos cromos. El núcleo de las células se tiñe en azul intenso, el nucleolo en azul violado, las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich, en rojo heliotropo, los protoplasmas y el tejido muscular en azul claro, la queratina en azul turquí, y la substancia fundamental del cartílago en rojo violáceo. Pero el gran inconveniente de la tionina estriba en que no hay manera de conservar sus coloraciones. Ni la *levulosa*, que propone Krausse, ni la *vaselina líquida*, que aconseja Langeron, son verdaderos agentes conservadores de las coloraciones de la tionina. Y lo que dejo dicho de la tionina es aplicable al azul de metileno, azul de Unna, violeta de metilo, de dalia, de genciana, etc., a pesar de cuanto se ha intentado (1) para introducir tales colorantes en la técnica histológica.

No es, pues, extraño que los histólogos de todos los países continúen usando preferentemente la hematoxilina y el carmín, en sus múltiples fórmulas, como colorantes histológicos.

Sin embargo, se conoce una anilina básica que resiste mucho a la decoloración por el alcohol y por los líquidos conservadores: la *fuchina básica*. Efectivamente; asombra la seguridad con que se obtienen excelentes preparaciones histológicas por el método tricrómico de Cajal, y la permanencia de sus coloraciones. Y ténganse en cuenta que en este método, no sólo se usa el alcohol absoluto como deshidratante, sino que se hace actuar el picro-índigo-carmín, sobre los cortes previamente teñidos por la fuchina, y es bien conocida la acción decolorante del ácido pícrico.

(1) Empleo del tanino, como mordiente, en las tinciones con el azul de metileno; decoloración y diferenciación por la orceína en las coloraciones con el azul de Unna, etc., etc.

Pero si bien es relativamente fácil obtener buenas y permanentes coloraciones con la fuchina básica, es también cierto que no se logran las policromasias más que con la tionina. Es poco agradable a la vista ese matiz rojo uniforme de las preparaciones teñidas con la *fuchina básica*. Es muy de lamentar que a las propiedades de resistencia a la decoloración por el alcohol absoluto y la permanencia de las coloraciones, no una la fuchina básica la otra propiedad no menos importante: la *metacromasia*.

¿No se podrá conseguir que la fuchina básica adquiriera esta última propiedad, esto es, la de teñir metacromáticamente las substancias cromotropas —substancia fundamental del cartílago, granulaciones basófilas, mucina — sin perder las otras propiedades ya señaladas?

Contestaré a esta pregunta, relatando mis investigaciones.

Por casualidad ¿por qué no decirlo? conseguí hacer de la fuchina básica — *colorante rojo* — otra anilina básica — *colorante violeta*, — (cuyo nombre y constitución química discutiré), que posee las tres propiedades necesarias: insolubilidad en el alcohol, permanencia de sus coloraciones, acción metacromática manifiesta.

En efecto; en mis estudios relativos a la investigación del bacilo de Koch, utilizando el método de C. Biot, observé con sorpresa el hecho de que dicho bacilo, que teñido por la fuchina básica se coloraba en rojo, cuando sufría la acción del formol adquiría coloración violeta. Y desoyendo los consejos de F. Arloing y R. Biot, en lo que se refiere a decolorar lo más intensamente posible con el ácido nítrico y el alcohol, pronto me di cuenta de que el cambio de coloración de rojo a violeta, originado por el formol, no lo experimentaba solamente el bacilo de la tuberculosis, sino todos los elementos celulares y asimismo los demás microbios; pero con esta diferencia,

el color violeta del bacilo de Koch era siempre más oscuro — violeta negro — que el de los núcleos de las células y demás microbios — violeta más o menos pálido o rojo.

Haciendo, después, aplicación del método de C. Biot a la investigación del bacilo de Koch en los tejidos, me sorprendió más aún esta rara propiedad del formol, pues observé que *los cortes que, teñidos con la fuchina básica y decolorados con el alcohol clorhídrico, aparecían con tinte rosa, a los pocos minutos de contacto con el formol adquirían la coloración violeta.*

Y este cambio de coloración no era sólo aparente, sino real, porque, observando tales preparaciones, después de la acción de los alcoholes de 95° y 100°, xilol fenicado, y montadas en bálsamo del Canadá, aprecié que todos los elementos anatómicos, sustancias intercelulares y bacilo de Koch, habían cambiado de coloración.

Pensé en que tal cambio de color podía obedecer a la acción del calor o a la influencia del alcohol clorhídrico sobre la fuchina básica, pero pronto deseché ambas hipótesis. El hecho se repetía utilizando la fuchina básica en frío y no decolorando con el alcohol clorhídrico.

Con tales datos senté esta 1.^a conclusión: *El formol es un agente transformador de las coloraciones obtenidas con la fuchina básica.*

Se me ocurrió en seguida preparar una solución de fuchina en agua formolada. Obtuve así una solución colorante violeta; pero, al tratar de utilizarla en la tinción de los tejidos, sufrí una gran desilusión, pues no daba una coloración electiva: los núcleos y los protoplasmas no destacaban claramente. Agregué a la fuchina de Ziehl un 5 0/0 de formol, y obtuve un nuevo fracaso, porque, si bien el líquido colorante se transformó de rojo en violeta, la tinción de los tejidos no ofrecía la diferenciación

deseada. Renuncié, pues, a utilizar soluciones formoladas, y me conformé con lograr el cambio de coloración del rojo al violeta en las preparaciones teñidas con la fuchina básica y lavadas al formol.

Necesitaba todavía conocer la influencia de ciertas substancias sobre las coloraciones obtenidas con la fuchina básica y el formol, y vi con asombro que la coloración violeta persistía aún, después de la acción de las eosinas al agua y al alcohol, de la fuchina ácida, del picro-índigo-carmín, etc., y hasta del ácido pícrico en solución acuosa saturada. Sometí las preparaciones teñidas solamente con la fuchina básica, sin la acción consecutiva del formol, a las mismas pruebas, y pude convencerme de que perdían algo la coloración, y hasta se decoloraban totalmente, sobre todo con la solución acuosa saturada de ácido pícrico. Había motivo para esta 2.^a conclusión: *El formol es un agente fijador de las coloraciones con la fuchina básica.*

En posesión de tales datos, cuya importancia no se ocultará a quienes se dediquen a trabajos de Histología, busqué una fórmula adecuada de las soluciones de fuchina básica y de formol, y, después de una serie de tanteos, conseguí mi propósito.

La solución de fuchina básica que me parece más conveniente es ésta:

Fuchina fenicada de Ziehl	1 c. c.
Agua destilada	10 c. c.

La solución de formol, que consideré más a propósito, es la que sigue:

Formol puro (solución acuosa al 40 %) .	5 c. c.
Agua ordinaria	100 c. c.

Téngase en cuenta, no obstante, que igual resultado se obtiene con soluciones más concentradas de formol.

y así, yo, en muchas ocasiones, utilizo la solución de formol, al 10 0/0, solución que, como es sabido, se tiene ya preparada en los laboratorios, por el frecuente uso que de ella se hace, como líquido fijador de los tejidos.

Conseguidos tales resultados, creí que ya podía dar por terminadas mis investigaciones. Pero no fué así. En todas mis experiencias había utilizado cortes obtenidos por el método de la congelación, y no pude sospechar que los resultados variasen empleando mi método de tinción en los cortes de tejidos incluidos en celoidina. Intenté teñir los cortes obtenidos por este método de inclusión, y obtuve resultados algo diferentes. Por de pronto, observé: primero, que la tinción era, en general, más tardía, y segundo, que cuando dichos cortes contenían gran cantidad de celoidina — tejidos blandos y con grandes cavidades — la coloración de la celoidina por la fuchina básica y el formol, restaba belleza a las preparaciones.

Conocidos estos dos inconvenientes, los remedí en seguida: el 1.º, prolongando la tinción por la fuchina básica, y el 2.º, cambiando de líquido aclarante, esto es, substituyendo el xilol fenicado por esencia de clavo, que disuelve la celoidina sin alterar en lo más mínimo la coloración, o, también, sumergiendo los cortes en una mezcla a partes iguales de alcohol y éter durante 20-30 minutos antes de ser teñidos con la fuchina básica.

Por consiguiente, el método cromático reseñado es más conveniente para teñir los cortes obtenidos por congelación; pero puede, así y todo, utilizarse con excelentes resultados en la tinción de los cortes de tejidos incluidos en celoidina (1).

Sintetizaré todos estos datos.

(1) También se obtienen excelentes resultados aplicando este método a los cortes de tejidos incluidos en parafina.

MÉTODO DE TINCIÓN POR LA FUCHINA BÁSICA Y EL FORMOL

- 1.º Fijación al formol al 10 0/0, 24 horas en frío, o seis horas en la estufa a 37° (1).
- 2.º Formol al 5 por 100, 24 horas, o lavado al agua, 15-30 minutos.
- 3.º Cortes por congelación.
- 4.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 10°, en agua destilada, $\frac{1}{2}$ -1-5 minutos (2).
- 5.º Lavado en agua, unos segundos.
- 6.º Formal al 5-10 0/0, hasta la aparición del color violeta, 1-5 minutos.
- 7.º Lavado, por cualquier tiempo, en agua.
- 8.º Alcoholes de 95° y absoluto; 1-3 minutos en cada uno.
- 9.º Xilol fenicado, 1-3 minutos.
- 10.º Montaje en bálsamo del Canadá.

Los núcleos, nucleolos y protoplasmas de todas las células se tiñen ortocromáticamente, esto es, en violeta obscuro los primeros y en violeta claro los últimos; las substancias cromotropas — materia fundamental del cartílago, granulaciones de las células cebadas de Ehrlich, mucina — en violeta más o menos rojizo; los hematíes en amarillo o en amarillo rojizo; el tejido muscular estriado, en los cortes que contienen celoidina, o en los obtenidos por congelación, cuando la tinción ha sido muy débil, en color rosa; pero si la tinción ha sido muy intensa en rojo

(1) Si se tuviese prisa, puede abreviarse el tiempo de fijación. Yo he obtenido excelentes preparaciones con una fijación de dos horas y en frío.

(2) Hay tejidos en que se consigue una buena tinción en $\frac{1}{2}$ minutos, pero otros se resisten, y es necesario prolongarla hasta cinco minutos. De todas suertes, yo prefiero las tinciones cortas, que son más delicadas. Si hubiese sobre-coloración, aunque esto es muy raro, puede hacerse la diferenciación con el alcohol clorhídrico.

violáceo, el tejido muscular liso en violeta pálido en los cortes por congelación, y, generalmente, en rosa en los impregnados de celoidina; el tejido conjuntivo en violeta muy pálido, y en fin, las células, o mejor, las láminas queratinizadas en rosa o rojo, según el grado de queratinización.

La tinción, pues, no tiene nada que envidiar a la que puede lograrse, aun en los casos más afortunados, con la tionina, ni en lo que se refiere a las coloraciones ortocromáticas ni a las metacromáticas, y tiene sobre ella la incomparable ventaja de la seguridad del resultado, y la permanencia de las coloraciones. No estará de más indicar que las coloraciones metacromáticas obtenidas por el método de la fuchina-formol sufren alguna alteración por la influencia del alcohol, pero esto ocurre con cualquier método de tinción que tiña metacromáticamente. Esta modificación de las coloraciones metacromáticas, puede evitarse con el montaje en levulosa o en glicerina gelatinada, pues que no exige la deshidratación de los cortes con el alcohol.

Con el método de tinción que preconizo quedan sin teñir, claro está, las fibras elásticas. Pero si se tiene interés en teñir con seguridad las fibras elásticas, puede conseguirse colorando los cortes previamente con la solución clorhidro-alcohólica de orceína, (ácido clorhídrico puro, 1 c. c.; alcohol de 95°, 100 c. c.; orceína, 1 gramo), dejándola actuar 1-3 horas, diferenciando después con alcohol clorhídrico, lavando al agua, y en fin, empleando en seguida el método fuchina-formol.

Las fibras elásticas se tiñen en rojo moreno; las coloraciones de los demás elementos son las mismas que sin el empleo de la orceína.

He ensayado las coloraciones combinadas siguientes: fuchina-formol-eosina; fuchina-formol-rubina ácida; fuchina-formol-orange G.; fuchina-formol-aurancia; fuchina-for-

mol-ácido pícrico. Sólo merecen intentarse estas dos: fuchina-formol-orange G., y fuchina-formol-ácido pícrico (1).

He intentado también aplicar mi método cromático a la tinción de las preparaciones de sangre. Con él se logra teñir los hematíes en rojo; los núcleos de los leucocitos en violeta, las granulaciones basófilas en rojo violáceo; pero no se tiñen las granulaciones neutrófilas ni las eosinófilas, aunque estas últimas se perciben perfectamente por su gran refringencia.

En fin, como era lógico, he utilizado el referido método de tinción para colorar los microbios, tanto en los *frottis* como en los cortes, y me ha sorprendido este singular detalle: *ciertos microbios se tiñen en violeta, pero otros se coloran en rojo* (2).

En resumen; el método cromático que dejo descrito, es, en mi opinión, preferible, en muchos casos, al método de la hematoxilina o hemateína-eosina, y al de las anilinas básicas:

1.º Por la belleza de las coloraciones. 2.º Por la permanencia de las tinciones. 3.º Por la facilidad de su ejecución. 4.º Por la seguridad de sus resultados. 5.º Por la aplicación de que es susceptible a la Histología, a la Anatomía patológica, a la Bacteriología y aun a la Hematología.

* * *

Podía y aun debía dar por terminada mi labor; pero, en realidad, resultaría incompleto este trabajo, si no in-

(1) En otro trabajo describiré el *método tricrómico obtenido con la fuchina, el formol y el ácido pícrico*, que da excelentes resultados.

(2) Hasta ahora he observado que los microbios que toman el Gram se tiñen en violeta, y los que no lo toman, aparecen en rojo. No afirmo, sin embargo, que esto se repita en todos los casos. Mis ensayos son aún poco numerosos.

tentase siquiera dar una explicación más o menos aproximada respecto al mecanismo de acción del formol sobre las coloraciones con la *fuchina básica*.

Ya sé yo que es ésta una empresa verdaderamente enorme para quien como yo no es químico profesional. No obstante se me perdonará que haga un esfuerzo, que pudiera ser productivo.

Ante todo he de indicar, y sírvame de disculpa, que los datos que he encontrado en las obras de Química no me han aclarado el problema, quizás porque no he sabido consultarlas. Voy, por tanto, a exponer una hipótesis, pero nada más que una hipótesis, con el preferente objeto de llamar la atención de quienes tengan la paciencia de leerla y juzgarla, por si con ella consigo, por lo menos, darles base para que formulen una teoría que aclare completamente el problema.

HIPÓTESIS RELATIVA AL MECANISMO DE ACCIÓN DEL FORMOL COMO AGENTE TRANSFORMADOR DE LAS COLORACIONES POR LAS FUCHINAS BÁSICAS.

Principiaré por sentar que el término *fuchina*, usado frecuentemente para designar un colorante determinado, debe substituirse por el de *fuchinas*.

No existe, en efecto, una especie química que reciba el nombre de *fuchina*, sino varias especies químicas que se denominan *fuchinas*. Pero, es más: con el nombre de *fuchinas* se conocen dos clases de colorantes completamente distintos: *fuchinas ácidas* y *fuchinas básicas*.

Entre las fuchinas ácidas se hallan la *fuchina S* (*sauve fuchin*), *rubina S* (*saurerubin*), *acid-magenta*, etc., cuyo estudio no interesa a mi propósito.

Con el nombre de *fuchinas básicas* se encuentra en el comercio un gran número de sustancias colorantes.

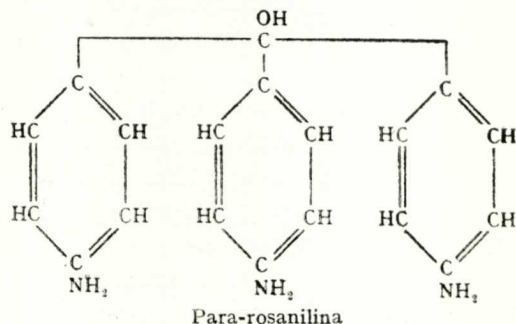
tales como la *rubina básica*, *fuchina rubina*, *magenta*, *solferino*, *fuchina diamante*, *fuchina F*, *anilinrot*, *roséina*, etc.

Teóricamente consideradas, las fuchinas básicas son clorhidratos de rosanilina, mientras que las rubinas básicas son clorhidratos de para-rosanilina; pero desde el punto de vista práctico, esto es, refiriéndonos a los productos comerciales del grupo de las *fuchinas básicas*, es necesario saber que son mezclas de clorhidratos y acetatos de rosanilina y de para-rosanilina. Sin embargo, se acostumbra a llamar fuchina básica a cualquier fuchina básica. Por tal motivo, y para no complicar más el análisis de este trabajo, he empleado siempre el término fuchina básica, como sinónimo del de fuchinas básicas.

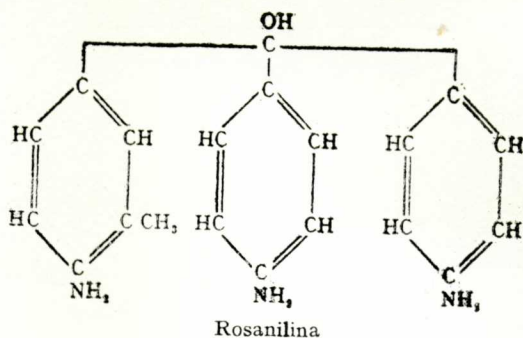
Interesa, por tanto, conocer primeramente, qué es la para-rosanilina y qué la rosanilina.

Los familiarizados con la nomenclatura química, pero que no hayan hecho un estudio especial de estos dos cuerpos, creerán que la rosanilina no difiere de la para-rosanilina sino en que los grupos funcionales se hallan en la segunda en la posición 1-4. Y no es así. Los términos para-rosanilina y rosanilina debieran desaparecer, substituyéndolos por los de *triaminotriifenilmetanol* y *triaminotoluidilidifenilmetanol* respectivamente.

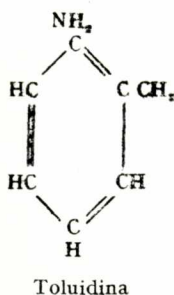
Porque la *para-rosanilina* tiene por fórmula



y la *rosanilina*

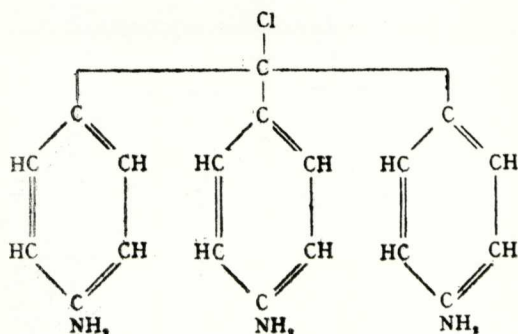


Por consiguiente, la *para-rosanilina* difiere de la *rosanilina* en que la segunda contiene el grupo *toluidina*



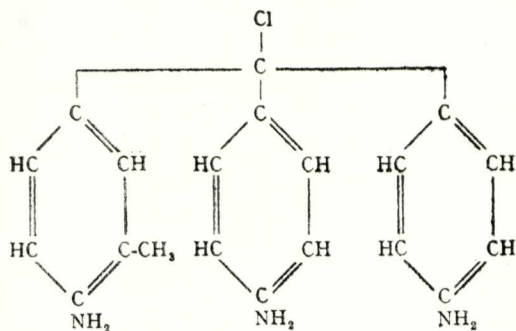
pudiendo ocupar los grupos NH_2 y CH_3 las posiciones orto, meta o para, esto es I-2, I-3, I-4.

Ahora bien; el *clorhidrato de para-rosanilina* o mejor de *triaminotriphenilmetano* — *rubina básica* — tendrá por fórmula



Clorhidrato de triaminotriphenilmetano
Rubina básica

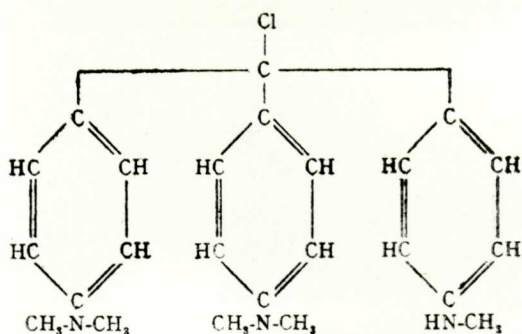
mientras que *el clorhidrato de rosalina o de triaminotolildifenilmetano — fuchina básica —* corresponderá a la fórmula



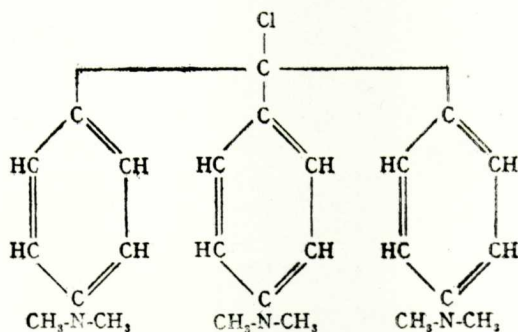
Clorhidrato de triaminotolildifenilmetano
Fuchina básica

En estos cuerpos puede haber substitución de los hidrógenos de los grupos NH_2 por radicales carburados alcohólicos (CH_3 , $\text{CH}_3\text{-CH}_2$, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$, etc.), que dan lugar a colorantes violados, o bien por radicales fenólicos (C_6H_5 , $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$, etc.), produciendo colorantes azules; existiendo, en fin, colorantes intermedios, que son verdes.

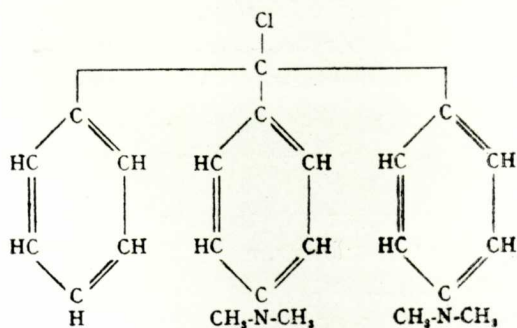
Sirvan para ejemplo los siguientes colorantes, bien conocidos de todos:



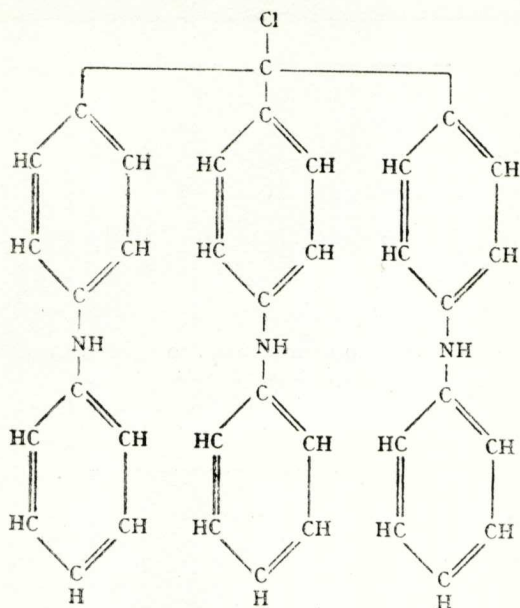
Clorhidrato de pentametiltriaminotriphenilmetano
Violeta de genciana



Clorhidrato de exametiltriaminotriphenilmetano
Violeta de París



Clorhidrato de tetrametildiaminotriphenilmetano
Verde Malaquita



Clorhidrato de trifenilaminotriphenilmetano
Azulina

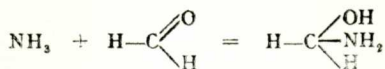
Había, por tanto, razón para suponer que si la fuchina básica, que es roja, se hace violeta por la acción de formol, sería debido a que algún hidrógeno de los grupos NH₂, quedaba substituído por un radical carburado alcohólico; pero como el formol no es otra cosa que el *aldehído metílico*

o *metanal* $\text{H}-\text{C} \begin{array}{l} \diagup \text{O} \\ \diagdown \text{H} \end{array}$, y todos los aldehídos son reducto-

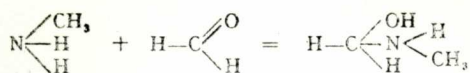
res, es preciso averiguar en qué forma se opera la reducción, sin que deje de substituirse un H, de los grupos NH₂, por un radical alcohólico.

Bueno será recordar, para más fácil comprensión, que *los aldehídos en presencia del amoníaco o de aminas*

primarias o secundarias acíclicas, producen aldehydos.
Ejemplos:



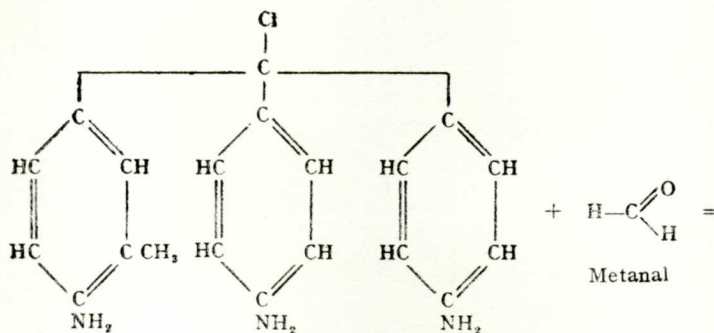
Amoniaco Metanal Aldehidato de amoniaco



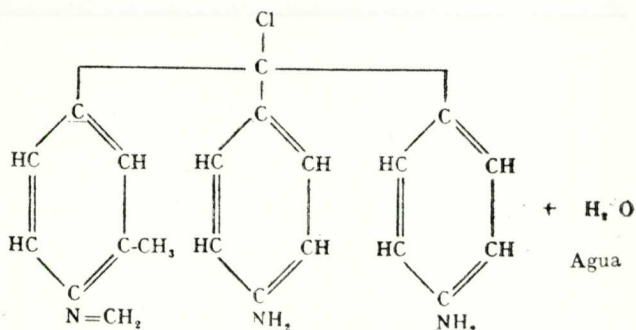
Monometilamina Metanal Aldehidato de metilamina

Pero los aldehidos al reaccionar con las aminas fenólicas las transforman en iminas. Es éste, al parecer, el caso en que se encuentran la fuchina básica y el formol.

Por consiguiente, según toda probabilidad, he aquí el mecanismo del cambio de coloración de rojo a violeta que experimenta la fuchina básica por la acción del formol.



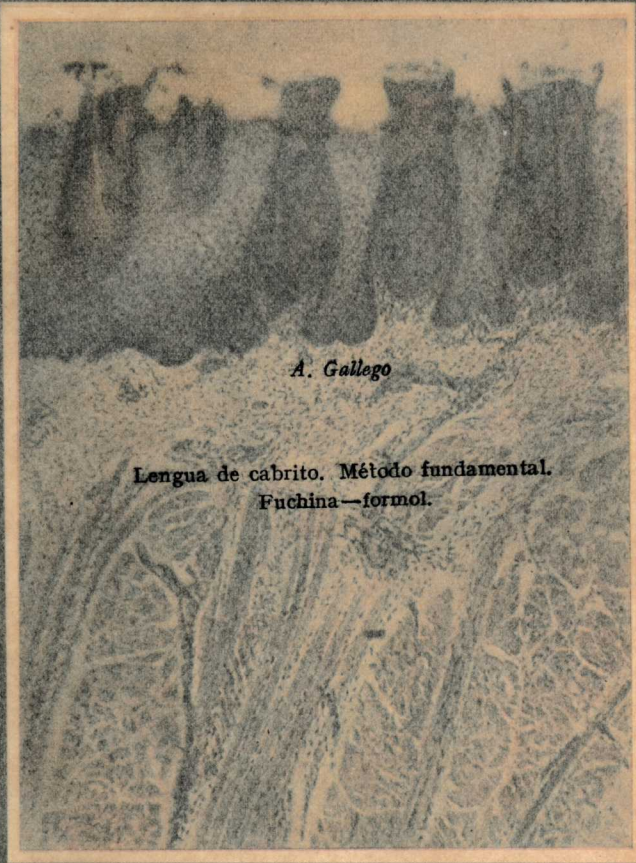
Clorhidrato de triaminotoluidifenilmetano
Fuchina básica



Clorhidrato de diaminoinimometilenotolildifenilmetano

Esto es: *el clorhidrato de triaminotolildifenilmetano — colorante rojo — reaccionando con el metanal, se convierte en clorhidrato de diaminoinimometilenotolildifenilmetano — colorante violeta — con pérdida de una molécula de agua.*

Laboratorio de Histología. Escuela de Veterinaria de Santiago.



A. Gallego

**Lengua de cabrito. Método fundamental.
Fuchina—formol.**