

TÉCNICA HISTOLÓGICA

por

A. GALLEGO

NUEVOS MÉTODOS DE COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

A pesar de las severas recomendaciones de Mann, respecto al abuso de los métodos de coloración en Histología, y no obstante los pueriles argumentos de García Solá contra las *fregolerías histológicas*, entendemos que algunas sustancias colorantes son comparables a verdaderos reactivos específicos capaces de poner de manifiesto elementos o partes de elementos anatómicos cuya existencia ni aun se podría sospechar por el simple examen sin coloración.

Hágase el examen microscópico de dos preparaciones de esputo tuberculoso, una, teñida con cualquiera de los métodos generales, con la tionina, por ejemplo, y, otra, con el método de Ziehl-Neelsen o sus derivados, y mientras en la primera no se encontrará un solo bacilo de Koch, a pesar del análisis más minucioso, en la segunda bastará una rápida ojeada para percibirlos inmediatamente. Examínense otras dos preparaciones microscópicas de centros nerviosos teñidas con el método de la hematoxilina y eosina y con el de Cajal respectivamente, y sorprenderá encontrar en ésta numerosas dendritas y axones que no lograremos advertir en aquélla. En fin, y para no cansar con más ejem-

plos, tíñanse dos cortes microtómicos de pulmón, el primero con hematoxilina y eosina o con el método de van Giesson, etc., y el segundo con la *orceína* o la *fuchselinea*, y sólo en este último podrán verse con toda claridad las fibras elásticas.

No hay, pues, derecho a indignarse contra quienes persiguen nuevos métodos de coloración que, por su sencillez, economía, seguridad en sus resultados y especificidad de las coloraciones, permiten un estudio más acabado de una preparación microscópica. Pero sí hay derecho a protestar contra quienes padecen la manía de buscar nuevos métodos de tinción difíciles de manejar, que exigen el empleo de sustancias raras, caras, de resultados inconstantes, de especificidad muy dudosa, y que, en una palabra, no son superiores a los clásicos y constituyen, por decirlo así, una complicación inútil en la técnica histológica.

Ni en una sola de nuestras publicaciones referentes a asuntos de técnica, hemos dejado de censurar el abuso que se viene haciendo de los métodos de coloración que nada resuelven y que, lo repetimos, son una complicación inútil.

Hasta podríamos decir que para nosotros es ya una idea fija la de buscar nuevos métodos de coloración que permitan ser ejecutados por cualquier aficionado y en cualquier laboratorio. Nuestra divisa es la siguiente: *Democratizar la Técnica histológica.*

Así, pues, en este trabajo no vamos a añadir una complicación más en los métodos clásicos de coloración de las fibras elásticas (métodos de Unna-Taenzer y de Weigert); al contrario, nos proponemos substituirlos por otros métodos que estimamos más ventajosos desde cualquier punto de vista que se consideren.

Nada de métodos excepcionales, que constituyan un acontecimiento en los laboratorios de Histología. Preocu-

pémonos de encontrar métodos generales que, en todos los casos, y todos los días, podamos utilizar y que igualem o superen por todos conceptos a los métodos de excepción.

Y así, utilizando tales métodos, las preparaciones histológicas serán más reales y más bellas y permitirán una interpretación más fácil y más rápida.

La coloración de las fibras elásticas debe y puede hacerse a diario en todos los laboratorios de Histología. Vamos a demostrarlo.

Los primeros ensayos

No vamos a analizar en este trabajo los métodos de coloración de las fibras elásticas de Unna-Taenzer y de Weigert, por ser sobradamente conocidos de los especialistas en este género de estudios, únicos lectores posibles de estas cuartillas. Nos limitaremos a decir que el primero, el de Unna-Taenzer, tiene el gravísimo inconveniente para nuestro tiempo de poner a prueba la paciencia de los histólogos: es de una lentitud desesperante — 24 horas — a pesar de la modificación de Pranter — 1 a 2 horas; — el segundo, el de Weigert, exige una preparación del colorante, tan complicada, tan enojosa, que pocos, muy pocos son los histólogos que la conocen bien, y, por tal motivo, recurren casi siempre a la solución de Weigert que prepara Grübler, aunque, como es sabido, no merece absoluta confianza por su difícil conservación y por su diverso poder tintóreo y electivo.

Tampoco hemos de mencionar en este trabajo las modificaciones que habíamos conseguido de los dos métodos clásicos señalados, porque, si bien significaban un progreso real en la época en que fueron concebidas, actualmente, después de haber encontrado los nuevos métodos

que nos proponemos describir, no merecen tenerse en consideración.

Vamos, pues, a referirnos a los nuevos métodos, cuya superioridad sobre los clásicos dejaremos bien demostrada, pero antes permítasenos hacer algo de historia de nuestros hallazgos, ya que aclarará muchas dudas a los nuevos investigadores que continúen nuestra labor, y enseñará hasta qué punto los trabajos de laboratorios son obra de la casualidad y del razonamiento.

* * *

En nuestro primer trabajo de Técnica histológica: «El formol, agente transformador y fijador de las coloraciones obtenidas con la fuchina básica» (Comunicación a la Societat de Biología de Barcelona, 1.^a nota), decíamos: «Con el método de tinción que preconizamos, quedan sin teñir, claro está, las fibras elásticas; *sin embargo, en una ocasión, y sin que podamos explicarnos el por qué, haciendo preparaciones de un epiteloma de labio, en el hombre, hemos obtenido una excelente tinción de fibras elásticas, en color violeta oscuro, y con la particularidad de que dicha coloración resistía a la acción decolorante de la solución acuosa saturada de ácido pícrico.*»

Después de escrito este trabajo, y parando la atención en los estudios de Unna y Cajal, a propósito de la existencia de fibras de *elacina* en el estroma de algunos tumores epiteliales, llegamos a lamentarnos de nuestra ligereza al consignar que con nuestro método de coloración habíamos conseguido teñir las fibras elásticas. Estábamos casi seguros de que las que habíamos tomado por fibras elásticas eran en realidad fibras de *elacina*. Pero haciendo nuevas preparaciones histológicas de otros epitelomas de labio, y utilizando nuestro método de coloración — fuchina-

formol — volvimos a nuestra primera concepción. En efecto; no ya sólo en la parte de labio invadida por el tumor, sino en parajes relativamente apartados de la lesión tumoral, donde el más minucioso examen microscópico no permitía reconocer la menor alteración, o, cuando más, se descubría una infiltración microcelular, que acusaba un proceso inflamatorio, aparecían las fibras que habían llamado nuestra atención, esto es, las verdaderas fibras elásticas, formando conglomerados informes, sobre todo hacia el dermis papilar, o dispuestas en haces transversales de fibras en zig-zag, entre los bulbos pilosos. Sin embargo, aunque abrigábamos la creencia, la casi seguridad de que tales fibras eran en realidad fibras elásticas, necesitábamos adquirir la certeza absoluta, y, a este fin, teñimos algunos cortes con la *orceína* y con la *fuchselina*, y, efectivamente, tales elementos adquirieron la coloración específica.

Así y todo, no podía menos de llamar nuestra atención el detalle de que, únicamente en las preparaciones de labio humano, consiguiésemos la coloración de las fibras elásticas utilizando nuestro método de coloración: fuchina-formol. Esto nos hizo creer que las fibras que habíamos logrado teñir, correspondían a la categoría de las fibras elásticas de reacción basófila, que ya habían sido descritas por Unna en otros órganos.

No obstante se nos ocurrió pensar que la fuchina, después de sufrir la acción del formol, podría quizá fijarse en todas las fibras elásticas, pero que, en las operaciones de deshidratación en los alcoholes, desaparecería la coloración de algunas de estas fibras, quedando tan sólo teñidas las que podrían denominarse *fibras elásticas alcohol-resistentes*. En comprobación de esta posible hipótesis hicimos varias preparaciones de diversos órganos utilizando nuestro ya referido método de coloración — fuchina-formol, —

pero en vez de montarlas en bálsamo del Canadá, las montamos en levulosa o en glicerina gelatinada, evitando así la acción del alcohol. Y, efectivamente, en las preparaciones así logradas, observamos con satisfacción inaudita, que las fibras elásticas aparecían teñidas en violeta oscuro. Se imponía, pues, esta conclusión: *«la fuchina, mediante la acción del formol, tiñe las fibras elásticas, pero mientras algunas de éstas se decoloran por la acción del alcohol, otras, las menos, resisten a esta acción decolorante; son, por decirlo así, alcohol-resistentes».*

Decididamente, poseíamos, en principio, un nuevo método de coloración de las fibras elásticas.

Hasta este momento no se nos ocurrió pensar que habíamos logrado teñir las fibras elásticas con la misma substancia que formaba la base tintórea del colorante de Weigert: la fuchina básica. Y esto nos sorprendió. ¿Cómo había logrado Weigert fijar la fuchina básica sobre las fibras elásticas? Con el percloruro de hierro o con la resorcina, sobre todo con la resorcina, pues no de otro modo nos explicábamos que la mayoría de los histólogos empleasen el término *resorcina-fuchina* como sinónimo de colorante de Weigert.

Discurriendo así encontramos abierta una nueva vía para seguir nuestras investigaciones. Emprendimos la tarea de teñir las fibras elásticas haciendo pasar los cortes microtómicos, primero, por soluciones diversas de resorcina, y, después, por la fuchina y el formol, sin lograr ningún resultado. Luego, y aun contando de antemano con el fracaso, hicimos nuevas preparaciones, pasando también los cortes previamente por soluciones más o menos concentradas de percloruro de hierro y tiñendo después con la fuchina y el formol. Y, en efecto, no logramos teñir las fibras elásticas, pero obtuvimos un resultado que nos sorprendió: *todas las células y substancias intercelulares*

aparecían teñidas en violeta muy pálido, mientras que la substancia fundamental del cartílago, la mucina y las granulaciones de las células cebadas de Erlich, adquirían una coloración violeta tan intensa, que daban la impresión de cuerpos extraños, de algo sobreañadido a las preparaciones.

El hecho era raro en extremo. Ciertamente que habíamos encontrado un método de tinción que permitía descubrir los menores vestigios de substancias cromotropas, pero ¿cómo explicar la intensa coloración de tales substancias, por la fuchina y el formol, previa acción del percloruro de hierro, coincidiendo con la débil tinción de los demás elementos? Por el momento no se nos ocurrió sino esta explicación: «el percloruro de hierro ejerce una acción mordiente que permite a la fuchina, modificada por la acción del formol, fijarse intensamente sobre las substancias cromotropas».

Este inesperado hallazgo nos desorientó en tal forma que, por algún tiempo, nos olvidamos del problema que nos habíamos propuesto; la coloración de las fibras elásticas con la fuchina y el formol, auxiliados por una substancia que en vano buscábamos. De la coloración de las fibras elásticas nos fuimos a la tinción de las substancias cromotropas, aunque ensayando de cuando en cuando algunos reactivos que sospechábamos ejerciesen alguna acción favorable sobre la fuchina o sobre el formol, que pudiera traducirse en una tinción electiva de las fibras elásticas.

Y por esta nueva vía, buscando una coloración específica de la mucina, pues el mucí-carmín no nos había dejado satisfechos, intentamos emplear como mordiente el cloruro de aluminio haciéndole actuar previamente sobre los cortes, que después teñíamos con la fuchina y el formol, logrando, en efecto, una coloración violeta negro de la mucina, bien diferente de la que adquirirían las demás subs-

tancias cromotropas y los diferentes elementos anatómicos. Y así, de la época en que usábamos el percloruro de hierro como mordiente en la coloración de las sustancias cromotropas, pasamos a esta otra en que substituimos el percloruro de hierro por el cloruro de aluminio, con gran ventaja en todos los casos, ya que nos permitía hacer coloraciones simples y combinadas infinitamente más bellas y más demostrativas.

Habíamos llegado a dominar este método de tinción de las sustancias cromotropas: Fijación en formol. Cortes por congelación. Cloruro de aluminio en solución acuosa al 1 por 100, un minuto. Lavado en agua. Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 5 por 100, y acetificada, uno a cinco minutos. *Viro-fijación* de la fuchina en formol al 1 por 100 y acetificado, cinco minutos. Deshidratación en la serie de alcoholes. Montaje en bálsamo del Canadá. Operando así, la mucina se teñía en violeta negro; el cartílago y las granulaciones de las células cebadas en violeta azulado; los núcleos de todas las células en violeta pálido; el tejido muscular en rosa y los haces colágenos en violeta muy pálido o quedaban incoloros.

Pero como en otras ocasiones, no nos contentamos con dominar un método que habíamos logrado a fuerza de infinitos tanteos. Quisimos averiguar hasta qué punto había razones teóricoprácticas para operar en la forma que lo hacíamos, y, a este fin, revolucionando en unas horas la labor pacientemente realizada en unos años; decidimos hacer una serie de ensayos, algunos de ellos realmente inverosímiles, que no hay para qué citar, y utilizando como objeto de estudio un pulmón de carnero, ya que en este órgano existían todos los elementos anatómicos y sustancias químicas que con nuestro método de coloración (cloruro de aluminio — fuchina acética — formol acético), podíamos teñir. Y al terminar estos ensayos nos

encontramos con una preparación que había sido abandonada, ignorábamos por cuánto tiempo, en una solución de cloruro de aluminio y formol acético, y que, desde luego, nos causó gran sorpresa, no ya por la coloración especial más intensa, sino por un cierto aspecto reticulado que se marcaba perfectamente aun examinada a débiles aumentos, y que no teníamos costumbre de ver utilizando los reactivos que a diario manejábamos. Un atento examen de tal preparación a 500 diámetros nos dejó verdaderamente atónitos. *El aspecto reticular que tanto nos había sorprendido, provenía de que estaban admirablemente teñidas las fibras elásticas, pero que por su extremada finura no eran apenas perceptibles a débiles aumentos.*

La *casualidad*, que, según frase del sabio Cajal, *no visita a quien la busca sino a quien la merece*, había tenido a bien ayudarnos en la resolución de un problema que tanto, y por tanto tiempo, nos había preocupado. La nueva semilla tenía ya el campo suficientemente preparado, y su germinación y ulterior desarrollo no se hizo esperar. La prueba es que, si tardamos tres años en encontrar un nuevo método de tinción de las fibras elásticas, ocho días después logramos descubrir dos más tan buenos o mejores que el primero.

PRIMER MÉTODO. FUCHINA ACÉTICA. — FORMOL ALUMÍNICO ACÉTICO. (Fa-Fal.)

Como las visitas de la *casualidad* a los laboratorios son, además de poco frecuentes, de muy corta duración, hay que saber aprovecharlas. Todo está permitido en estos casos, todo menos perder el tiempo. Así, pues, nosotros, una vez que nos convencimos de que habíamos logrado encontrar un nuevo método de coloración de las fibras elásticas, echamos una rápida ojeada a nuestra mesa de

trabajo, y nos sorprendió no ver en ella otros reactivos que los que usábamos a diario. Nuestro éxito no podía ser atribuido al uso de ninguna substancia nueva, luego, había que pensar en que, tan sólo la cantidad, el orden en que hubiesen actuado o el tiempo de acción de los reactivos usados, podrían explicarnos el efecto conseguido.

Tres solas substancias habían entrado en juego: la fuchina acética, el formol acético y el cloruro de aluminio. Pero así como para teñir específicamente la mucina, hicimos actuar tales substancias en este orden: cloruro de aluminio, fuchina acética, formol acético; en el caso en que obtuvimos la coloración de las fibras elásticas, el orden había sido este otro: fuchina acética, formol aluminico acético. De esto estábamos absolutamente seguros, pues hacía tiempo nos tenía preocupados el ensayo de hacer actuar el mordiente de la fuchina después de la acción de este colorante, aunque no nos habíamos decidido a hacerlo ante el temor de contravenir al principio reglamentario de Técnica histológica, según el cual, el uso del mordiente debe preceder al del colorante.

Conocíamos el orden en que habían intervenido los reactivos, pero ignorábamos el grado de concentración de la solución de fuchina acética empleada, el de la solución del formol aluminico y el tiempo en que en una y otra solución habían permanecido los cortes.

Sobre la mesa teníamos un frasco con solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100. Era indudable que la solución de cloruro de aluminio al 1 por 100 había sido la utilizada. Sabíamos que, según costumbre, habíamos añadido una gota de ácido acético por cada 5 c. c. de solución de fuchina y recordábamos también haber agregado otra gota de ácido acético por cada 5 c. c. de la solución de cloruro de aluminio.

Restaba averiguar la concentración de la solución

de fuchina, la cantidad de formol añadida a la solución de cloruro de aluminio y el tiempo de acción de una y otra.

Empezamos por preparar una solución acuosa de fuchina de Ziehl al 5 por 100 y acetificada (agua, 5 c. c.; fuchina de Ziehl, 5 gotas; ácido acético, 1 gota), fórmula que empleábamos a diario para nuestros métodos de coloración ya conocidos, y otra solución de cloruro de aluminio al 1 por 100, a la que añadimos una gota de ácido acético y otra de formol por cada 5 c. c., ya que, por larga experiencia, conocíamos que el formol al 1 por 100 en las coloraciones con la fuchina, ejercía igual influjo que las soluciones de mayor y de menor concentración.

Preparadas estas dos soluciones, teñimos los cortes con fuchina acética, 5 minutos; los lavamos en agua y los pasamos a la solución de formol alumínico acético. A los cinco minutos (tiempo corriente de acción del formol acético en nuestros métodos de coloración), volvimos a lavar estos cortes en agua, los deshidratamos, aclaramos y montamos en la forma habitual. El examen microscópico de las preparaciones así obtenidas nos demostró que habían quedado sin teñir las fibras elásticas.

Aumentamos la concentración de la fuchina, al 10 y al 15 por 100, y tampoco conseguimos la coloración de las fibras elásticas. Empezamos a desesperarnos.

Cambiamos la concentración del formol en la solución formol-alumínico-acética y, como presumíamos, no logramos mejor resultado.

Y así, ensayo tras ensayo, desde la mañana a la noche buscando el método de coloración de las fibras elásticas que habíamos logrado una vez y que, al parecer, no lograríamos jamás.

Casi agotada nuestra paciencia, y en el estado de ánimo que se puede suponer, repetimos el primer ensayo (fuchina diluída al 5 por 100 y acetificada, 5 minutos;

lavado en agua; formol alumínico acético — formol y cloruro de aluminio, ambos al 1 por 100, más 1 gota de ácido acético por cada 5 c. c. de esta solución), pero dejando los cortes en el formol alumínico acético hasta el día siguiente.

Y al día siguiente, nueva sorpresa: las fibras elásticas aparecían perfectamente teñidas.

El problema estaba resuelto: solo faltaba averiguar el tiempo mínimo en que debían permanecer los cortes en el formol alumínico acético.

Teñimos nuevos cortes con la fuchina de Ziehl, diluída al 5 por 100 y acetificada: los lavamos en agua y los abandonamos en el formol alumínico acético durante dos horas. Transcurridas éstas, nuevo lavado en agua, deshidratación en los serie de alcoholes, aclaramiento en xilol fenicado y montaje en bálsamo del Canadá. Las fibras elásticas quedaron perfectamente teñidas.

Nuevos ensayos, dejando actuar el formol alumínico acético una hora; después, 45 minutos; luego, 30, 20, 10 y 5 minutos. Sólo cuando actuó el formol alumínico acético durante 5 minutos dejaron de teñirse las fibras elásticas. Este resultado era para dejarnos satisfechos, pues nos explicaba el por qué de nuestro primer éxito y de nuestros posteriores fracasos. Sin embargo, la coloración de las fibras elásticas podía depender solamente de la acción del formol o de la del cloruro de aluminio (el ácido acético desempeñaba nada más que un papel relativamente accesorio, el de diferenciador) y para salir de dudas, coloramos varios cortes con fuchina acética, los lavamos en agua, y los trasladamos, unos, a una solución de formol al 1 por 100, y otros, a la solución de cloruro alumínico al 1 por 100, en las que permanecieron 6 u 8 horas sin que en ningún de los cortes lográsemos la coloración de las fibras elásticas. Se imponía esta conclusión: *«La coloración de las fibras elásticas resulta de la acción combinada del*

formol y del cloruro alumínico sobre la fuchina; el formol transforma y fija la coloración de la fuchina; el cloruro alumínico dirige la coloración de la fuchina hacia las fibras elásticas; el ácido acético actúa solamente como diferenciador.

Conocidos ya todos los factores del problema que nos habíamos propuesto, dueños ya de un nuevo método de coloración de las fibras elásticas, había necesidad de perfeccionarle: *la casualidad* no podía haberse tomado este trabajo.

Hicimos ensayos con soluciones más concentradas de formol y de cloruro alumínico, con resultado, no sólo negativo, sino hasta perjudicial, sobre todo operando con soluciones fuertes de formol.

Utilizamos en otra serie de ensayos soluciones menos concentradas de formol y de cloruro de aluminio, notando que la solución al $\frac{1}{2}$ por 100 de cloruro de aluminio ya no daba tan buen resultado y la coloración de las fibras elásticas era más tardía. En cambio nos convencimos de que podían utilizarse soluciones de formol desde el 1 x 500, pues se comportaban igual que la solución al 1 por 100.

Como resultado de estos ensayos adoptamos como solución definitiva de formol alumínico acético, la siguiente:

Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1%	5 c. c.
Formol	1 gota.
Acido acético.	1 gota.

La emprendimos entonces con la solución de fuchina acética, ensayando soluciones de fuchina de Ziehl al 5 por 100, 7'5 por 100, 10 por 100, 15 por 100 y 20 por 100, y dejándolas actuar durante 5 minutos, logrando el efecto máximo con la solución de Ziehl al 7'5 por 100 (3 gotas de fuchina de Ziehl por cada 2 c. c. de agua destilada.)

Intentamos, por último, preparar una solución que, en un solo tiempo, hiciese el mismo efecto que las dos soluciones citadas (fuchina acética y formol aluminico acético) empleadas sucesivamente. A este fin, en 4 c. c. de solución de cloruro de aluminio al 1 por 100, vertimos 6 gotas de fuchina de Ziehl, 1 gota de formol y otra de ácido acético. Obtuvimos un líquido turbio, que, poco a poco, fué aclarándose, dejando un precipitado pulverulento de color rojo violáceo. Excusado decir que tal solución no teñía las fibras elásticas.

Estábamos ya satisfechos de nuestra labor, pero no contábamos con un último obstáculo. Las preparaciones con tanto trabajo logradas se decoloraron a los pocos días. El disgusto que esa observación nos produjo fué de esas que hacen época en nuestra vida de laboratorio.

¿Por qué se decoloraban las preparaciones, o, mejor, las fibras elásticas? ¿Por el cloroformo que, por escasez de xilol, habíamos utilizado para disolver el bálsamo del Canadá? ¿Por la acción del xilol fenicado que acostumbrábamos a usar como aclarante?

Tres ensayos: 1.º Dejar durante 24 horas dos series de cortes en que habíamos teñido las fibras elásticas, una en cloroformo y otra en xilol, después, claro está, de haberlos deshidratado en alcohol. Resultado: pérdida de la coloración de las fibras elásticas en los cortes que permanecieron en cloroformo y conservación de la tinción en los que estuvieron en xilol. El remedio era fácil: disolver el bálsamo del Canadá en xilol. 2.º Intentar el empleo del xilol solo, como aclarante, sin añadirle ácido fénico. Así lo hicimos un solo día, pues al siguiente, dada la enorme humedad atmosférica del laboratorio, el xilol adquiriría un aspecto lechoso, al menos en capa delgada, lo que nos obligaba a un verdadero derroche de xilol, y esto en circunstancias en que sólo disponíamos de una pequeñísima

cantidad. 3.º Empleo de otros aclarantes: esencias de bergamota, orégano, Cayeput, etc. Pero en nuestro laboratorio no podíamos utilizar las esencias, pues la gran humedad del aire nos las alteraba en pocos días, por lo que tuvimos que volver al empleo del xilol fenicado.

Y empleando el bálsamo del Canadá disuelto en xilol, y utilizando el xilol fenicado como aclarante, el resultado nos desconcertó por algún tiempo. Algunas series de preparaciones hechas el mismo día se alteraban en 24 ó 48 horas, decolorándose completamente las fibras elásticas, mientras que otras series conseguidas en días distintos se conservaban admirablemente. Estos éxitos y estos fracasos no eran debidos a días de suerte y de desgracia. ¡Algún motivo había!

Prestamos mayor atención a los menores detalles de técnica; nos echamos a discurrir sobre lo posible y lo imposible, y, por fin, llegamos a averiguar que todo obedecía a la alteración del xilol fenicado. En efecto; el xilol fenicado, a pesar de contener un 25 por 100 de ácido fénico, se hidrataba, y al sacar los cortes de este xilol que comenzaba a hidratarse y, sobre todo, si por casualidad echábamos el vaho, sin darnos cuenta, en la dirección del corte, el xilol que le impregnaba adquiría un aspecto lechoso. Toda preparación mal deshidratada con este xilol, montada en bálsamo disuelto también en xilol, perdía irremisiblemente la coloración de las fibras elásticas. ¡En ciertos países y en determinados laboratorios en que se niega toda subvención para calefacción, es imposible trabajar!

Desde que tuvimos cuidado de desechar el xilol fenicado al menor indicio de alteración, no se nos decoloró ninguna preparación. Sin embargo, recomendamos que las preparaciones que merezcan ser conservadas se guarden de la luz. No hay que olvidar que el nuevo colorante que

resulta de la acción del formol sobre la fuchina es, probablemente, un producto de reducción, y la acción oxidante del bálsamo del Canadá, acrecentada por la influencia de la luz, podrá destruir este colorante.

En resumen: la coloración de las fibras elásticas con el método: Fuchina acética — Formol alumínico acético, comprende las operaciones siguientes:

1.^a Fijación en formol al 10 por 100. 2.^a Cortes por congelación. 3.^a Tinción con la fuchina de Ziehl diluida al 7'5 por 100 y acetificada, 5 minutos. 4.^a Lavado en agua. 5.^a Formol alumínico acético, 10-15 minutos. 6.^a Lavado en agua. 7.^a Serie de alcoholes. 8.^a Xilol fenicado, o esencia de bergamota, orégano, Cayeput, etc. 9.^a Bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

Los núcleos se tiñen en violeta intenso; los protoplasmas en violeta pálido; las fibras musculares, sobre todo las estriadas, en rosa violáceo; los haces colágenos en violeta pálido; las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich, en rojo violáceo; la substancia fundamental del cartilago en violeta oscuro muy azulado; la mucina en violeta negro; los hematies en amarillo rojizo; los epitelios queratinizados en rojo violáceo; las fibras elásticas en violeta oscuro.

SEGUNDO MÉTODO. FUCHINA ACÉTICA - FORMOL FÉRRICO ACÉTICO (Fa - Ffa)

Conseguida la coloración de las fibras elásticas con la fuchina acética y el formol alumínico acético, y admitida la hipótesis de que el cloruro de aluminio actúa como mordiente, como sensibilizador de las fibras elásticas, lo que permite que la fuchina, modificada por el formol, se fije intensamente en ellas, de modo parecido a como lo hace en las substancias cromotropas, era lógico en-

sayar la solución de percloruro de hierro, formol y ácido acético, pues ya sabíamos que el percloruro de hierro se comportaba también como mordiente de la substancia fundamental del cartílago, de las granulaciones de las células cebadas de Ehrlich y de la mucina en las coloraciones con la fuchina acética y el formol acético.

Pocos ensayos tuvimos que hacer para encontrar otro método de coloración de las fibras elásticas. Nos bastó substituir el cloruro de aluminio por el percloruro de hierro en la solución de formol acético, y haciendo actuar esta nueva solución sobre los cortes, previamente teñidos con la fuchina acética, obtuvimos la coloración de las fibras elásticas.

Sólo necesitamos hacer algunos tanteos para encontrar la solución de formol férrico acético más a propósito para el fin que perseguíamos. La solución que mejores resultados nos dió fué la siguiente:

Agua destilada	5 c. c.
Formol	1 gota.
Percloruro de hierro líquido.....	3 gotas.
Acido acético.....	1 gota.

Probamos también si se podría lograr una coloración más rápida de las fibras elásticas que la que habíamos conseguido con el formol alumínico acético, y, efectivamente, pronto nos convencimos de que el tiempo de acción del formol férrico acético podía abreviarse hasta 5 minutos.

Quisimos también averiguar si añadiendo a la fuchina formol, percloruro de hierro y ácido acético podíamos conseguir un colorante que, en un solo tiempo, tiñese las fibras elásticas, pero fracasamos en nuestro intento.

Lograda la coloración de las fibras elásticas con la

fuchina acética y el formol férrico acético, creímos encontrarnos en condiciones de comprender la teoría de la coloración de tales elementos con el colorante de Weigert. Nos pareció indudable que el nuevo colorante ideado por Weigert, y que Fischer había denominado fuchselina, no era esencialmente, como suponían la mayoría de los histólogos, un compuesto de resorcina y fuchina, y que el nombre de *resorcina-fuchina*, empleado como sinónimo de colorante de Weigert, resultaba absolutamente impropio.

En demostración de nuestra hipótesis, intentamos teñir las fibras elásticas con la fuchina acética y soluciones acuosas de resorcina, y el resultado, como esperábamos, fué absolutamente negativo. Agregamos a las soluciones de resorcina, de diversa concentración, formol y ácido acético, y tampoco conseguimos teñir las fibras elásticas. En fin; hicimos una solución de resorcina, formol, percloruro de hierro y ácido acético. Dicha solución adquirió un color violeta en cuanto agregamos la primera gota de percloruro de hierro, pero, lejos de reforzar la acción de esta sal férrica, impidió la coloración de las fibras elásticas.

Sin embargo, a pesar de estos resultados, no nos atrevemos a afirmar que la resorcina sea completamente inútil en el colorante de Weigert, pero en la forma que nosotros hemos procedido, queda demostrado que la resorcina, no sólo no refuerza la coloración de las fibras elásticas con la fuchina y el percloruro de hierro, sino que, al contrario, la perjudica.

Claro que no echamos en olvido que en nuestro segundo método de coloración de las fibras elásticas, añadimos a la solución férrica el formol, que juega importantísimo papel coadyuvante, pero nos está permitido decir que el percloruro de hierro debe desempeñar una acción de primera importancia en el colorante de Weigert, mucho más manifiesta que la de la resorcina, y que si ha de

emplearse un sinónimo del colorante de Weigert, no debe ser el de *resorcina-fuchina*, sino el de *percloruro de hierro-fuchina*.

Por lo demás; entendemos que si se hiciese un estudio detenido de las múltiples operaciones que se conceptúan necesarias para la preparación del colorante de Weigert, no sería difícil simplificarlas. En una palabra — y perdónenos esta osadía, — en nuestra opinión, en la preparación del colorante de Weigert hay muchas operaciones absolutamente superfluas, que urge tratar de suprimir.

En síntesis, la coloración de las fibras elásticas con la fuchina acética y el formol férrico acético puede conseguirse con la técnica siguiente:

1.º Fijación en formol al 10 por 100. 2.º Cortes por congelación. 3.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada, 5 minutos. 4.º Lavado en agua. 5.º Formol férrico acético, 5-10 minutos. 6.º Lavado en agua. 7.º Serie de alcoholes. 8.º Xilol fenicado. 9.º Bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

En general se logran coloraciones análogas a las que se obtienen con el primer método (fuchina acética—formol alumínico acético). Sin embargo, la coloración de las fibras elásticas es más intensa y más rápida, ventajas que ya hemos utilizado para la coloración de las fibras elásticas en los esputos, y que serán objeto de otro trabajo, pero las preparaciones no son tan delicadas, sobre todo, cuando existen epitelios estratificados (epidermis principalmente), porque resultan peor diferenciados, ya que la tinción del núcleo y del protoplasma es casi igualmente intensa.

TERCER MÉTODO. FUCHINA ACÉTICA — FORMOL NÍTRICO (Fa. Fn)

Habiendo logrado varias coloraciones combinadas, a partir de los dos métodos de coloración de las fibras elás-

ticas, ya descritos, intentamos conseguir una buena tinción de fondo con la picro-fuchina de van Giesson, en la esperanza de que, si obteníamos una coloración roja de los haces colágenos y una amarilla del tejido muscular, las fibras elásticas, teñidas en violeta, resaltarían admirablemente. Pero no conseguimos nuestro propósito, porque, como ya hemos dicho en otro trabajo («Modificaciones razonadas de los métodos tricrómicos de Cajal y de van Giesson, a partir del método de coloración con la fuchina y el formol acético»), las fibras musculares, demasiado teñidas con la fuchina y el formol, en rosa violáceo, no se hallaban en condiciones de fijar el ácido pícrico, y, por tal causa, no se teñían en amarillo puro. Se nos ocurrió entonces diferenciar la coloración de la picrofuchina con el ácido clorhídrico o el nítrico en solución acuosa o alcohólica. La solución clorhídrica acuosa no nos dió buen resultado; la alcohólica hacía desaparecer la coloración de las fibras elásticas. Quisimos ensayar la solución de ácido nítrico, pero temiendo que el ácido nítrico produjese profundas alteraciones en los tejidos, procedimos a estudiar primero la acción de dicho ácido asociado al formol, convencidos de que el formol actuaba como una especie de correctivo de las substancias que poseían una acción perniciosa para las coloraciones con la fuchina acética. Por el momento no nos atrevimos a utilizar soluciones concentradas de ácido nítrico, y preparamos una solución de formol nítrico análoga a la de formol acético, esto es, disolviendo en 5 c. c. de agua destilada 1 gota de formol y otra de ácido nítrico. Teñimos los cortes, obtenidos por congelación, con fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100; los lavamos en agua y los pasamos a la solución de formol nítrico. En seguida nos llamó la atención el hecho de que en esta solución de formol nítrico, en vez de decolorarse los cortes, adquirirían una coloración violeta intensa, sin

que dicha solución se enturbiase. Este detalle nos hizo sospechar que habíamos logrado otro método de coloración de las fibras elásticas, pues era indiscutible que el ácido nítrico se comportaba también como mordiente, a pesar de cuanto podía preverse. Terminamos la preparación según la técnica habitual, y, con toda urgencia, hicimos el examen microscópico. No nos habíamos engañado: las fibras elásticas aparecían admirablemente teñidas.

Tratamos de aumentar la concentración de ácido nítrico en la solución de formol, llegando a agregar 5 gotas por cada 5 c. c. de agua destilada, y los resultados no cambiaron de modo ostensible. Supusimos que en la solución de formol nítrico primitivamente empleada no habría necesidad de agregar ácido acético, porque tal ácido, más débil que el nítrico, no ejercería acción diferenciadora, y, en efecto, nada conseguimos añadiendo ácido acético, por lo que acordamos suprimirle.

Logrados tan buenos efectos con el formol nítrico, había necesidad de ensayar el formol clorhídrico y el sulfúrico. El primero se comportó como diferenciador de la coloración con la fuchina, y aun así, nos permitió teñir las fibras elásticas, pero en un color violeta mucho más débil que el formol nítrico. El segundo, el formol sulfúrico, fijó intensamente la coloración con la fuchina, pero, contra lo que presentíamos, las fibras elásticas quedaron sin teñir.

En fin; lograda la coloración de las fibras elásticas con la fuchina acética y el formol nítrico, empleados sucesivamente, intentamos obtener una coloración simultánea con el colorante fuchina — formol — ácido nítrico, pero fracasamos: la fuchina, que al agregarla una gota de formol adquirió un color violeta, se decoloró completamente al añadir una gota de ácido nítrico.

De donde resulta que la técnica más conveniente para

teñir las fibras elásticas con la fuchina acética y el formol nítrico es la que sigue:

1.º Fijación en formol al 10 por 100. 2.º Cortes por congelación. 3.º Tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100, 5 minutos. 4.º Lavado en agua. 5.º Formol nítrico (agua destilada, 5 c c.; formol, 1 gota; ácido nítrico, 1 gota), 10 minutos. 6.º Lavado en agua. 7.º Serie de alcoholes. 8.º Xilol fenicado. 9.º Montaje en bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

Operando así, se obtienen casi iguales resultados que con el primer método (Fuchina — Formol alumínico acética), pero las coloraciones de todos los elementos, incluso de las fibras elásticas, son más intensas, sin que haya sobrecoloración, esto es, quedando bien diferenciadas, y su empleo es más fácil, más económico y no exige el uso de reactivos que no haya en cualquier laboratorio (fuchina de Ziehl, formol, ácido nítrico), por lo que nosotros, salvo indicaciones especiales, le preferimos para el trabajo diario.

PROCEDIMIENTOS DE COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS QUE COMPLETAN LOS TRES MÉTODOS FUNDAMENTALES.

Firmes en nuestro propósito de conseguir que los más intrincados problemas de Técnica histológica dejen de ser privilegio exclusivo de unos cuantos señores raros, que se creen verdaderos superhombres, y decididos a acabar con tales monopolios científicos, logrando hacerlos accesibles a cualquier aficionado que quiera conocerlos, nos hemos esforzado en completar los tres métodos de tinción de las fibras elásticas, ya descritos, consiguiendo, por fin, varios procedimientos de coloraciones combinadas, fáciles de

obtener y que permiten, por consiguiente, ser utilizados en la práctica diaria, Así, pues, desde ahora la coloración de las fibras elásticas no debe ser un acontecimiento de laboratorio, sino un hecho corriente, habitual. En una palabra: nuestro éxito estriba en haber conseguido que los métodos de coloración de las fibras elásticas dejen de ser métodos de excepción, pasando a la categoría de métodos generales, utilizables en toda ocasión y en todo laboratorio, por escasos que sean sus recursos, y permitiendo a la vez estudiar en una sola preparación la mayoría de los detalles histológicos absolutamente indispensables para un diagnóstico rápido.

Los procedimientos de coloraciones combinadas sucesivas que vamos a describir son casi igualmente aplicables a los tres métodos fundamentales ya citados, y por tal motivo, en obsequio a la brevedad, y para evitar repeticiones enojosas, los referiremos al tercer método (Fuchina acética—Formol nítrico), ya que, por las ventajas que dejamos consignadas, es el que utilizamos de preferencia. Únicamente en el caso en que haya una particularidad técnica importante, indicaremos la conveniencia de emplear los métodos primero y segundo.

*Primer procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico —
Eosina (Fa. Fn. E)*

Como es sabido, la eosina tiene apetencias tintóreas, perfectamente marcadas, para los elementos acidófilos, pero además es, por decirlo así, el colorante casi específico para los hematies y las granulaciones eosinófilas de los leucocitos. No es, pues, extraño que se nos ocurriese ensayar la coloración combinada: Fuchina acética — Formol nítrico — Eosina, ensayo que desde el primer momento fué coronado por el éxito más lisonjero y que hoy es

para nosotros de uso tan corriente, que rara vez dejamos de ponerlo en pràctica.

Su técnica es bien sencilla: tinción con la fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 y acetificada; lavado en agua; *viro-fijación* y diferenciación en formol nítrico, durante 10 minutos; lavado en agua, solución acuosa de eosina al 1 por 100, por medio a un minuto; lavado en agua; alcoholes, etc.

Sólo en el caso de utilizar el formol alumínico acético o el formol férrico acético, en vez del formol nítrico, es necesario un lavado previo, y muy detenido, en agua, pues si tal lavado es ligero, al pasar los cortes a la solución de eosina se enturbia ésta y termina por inutilizarse.

El procedimiento Fuchina acética — Formol nítrico — Eosina da el siguiente resultado: todos los elementos basófilos quedan teñidos en violeta; las substancias cromotropas, en violeta más o menos rojizo; los protoplasmas, en rosa débil o en rosa ligeramente violáceo; las fibras colágenas, en rosa débil; las musculares, en rosa violáceo; los hematies y las granulaciones esoinófilas, en rojo intenso; las fibras elásticas en violeta intenso, que destaca de un modo admirable sobre el fondo rosa de la preparación.

Segundo procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Acido pícrico (Fa. Fn. Ac. p.)

Este procedimiento no difiere del anterior sino en que, en vez de la eosina, se utiliza el ácido pícrico:

Solución acuosa saturada en ca-	
liente de ácido pícrico	1 c. c.
Agua destilada.....	5 c. c.

donde permanecen los cortes durante un minuto. Después se lavan en agua, se deshidratan en los alcoholes, etc.

Los elementos basófilos se tiñen del mismo color que en el procedimiento anterior; los protoplasmas en amarillo; los haces colágenos, también en amarillo; las fibras musculares, en rojo amarillento; las fibras elásticas, en violeta intenso.

Las preparaciones así obtenidas son, por el momento, de una gran belleza y muy demostrativas, pues sobre el fondo amarillo destacan muy bien las fibras elásticas en violeta, pero al poco tiempo el hermoso color amarillo puro adquiere un matiz verdoso desagradable, y las fibras elásticas llegan a decolorarse.

Tercer procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Aurancia. (Fa. Fn. A.)

La misma técnica que en el procedimiento anterior, con la sola diferencia de utilizar la solución de aurancia, y durante 5 minutos, en lugar de la solución de ácido pícrico:

Aurancia	0'50 gr.
Agua destilada	100 c. c.

Si se usa el formol férrico acético o el aluminico acético en lugar del formol nítrico, es preciso un lavado cuidadoso en agua antes de sumergir los cortes en la solución de aurancia, pues si no se enturbia este colorante.

Por lo demás, las coloraciones con la aurancia se asemejan a las del ácido pícrico y se alteran también en plazo breve.

Cuarto procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Verde luz. (Fa. Fn. V. 1.)

Para lograrle, basta substituir la eosina, el ácido pícrico

o la aurancia por la solución hidro-alcohólica de verde luz.

Verde luz	0'5 gr.
Agua destilada	100 c. c.
Alcohol de 90°	100 c. c.

Lo cortes permanecerán en esta solución solamente algunos segundos.

Los elementos basófilos toman un tinte violeta; los acidófilos un verde más o menos claro; las fibras elásticas se tiñen en violeta.

Quinto procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Picroíndigocarmin (Fa. Fn. Pic.)

Así como en nuestra modificación del método tricrómico de Cajal, hemos preferido usar la mezcla a partes iguales de la picrofuchina de van Giesson y del picroíndigocarmin de Cajal, para lograr un color azul purísimo de los haces colágenos, contrastando con el verde claro del tejido muscular, al tratar de poner en práctica el procedimiento: Fuchina acética — Formol nítrico — Picrofuchina — Picroíndigocarmin, nos encontramos con el inconveniente de que la coloración azul de las fibras conjuntivas, impedía apreciar claramente las fibras elásticas teñidas en violeta. Por tal motivo nos vimos en la necesidad de usar simplemente el picroíndigocarmin, de Cajal, en lugar de la mezcla referida. Así conseguimos todas las ventajas del método original de Cajal, las de nuestra modificación relativa al empleo de la fuchina y el formol como colorante nuclear, y además logramos hacer resaltar la coloración violeta de las fibras elásticas sobre el fondo verde más o menos azulado de los haces colágenos, teñidos por el picroíndigocarmin.

Así, pues, este procedimiento queda reducido a teñir los cortes con el picroíndigocarmín de Cajal, durante un minuto:

Carmín de índigo. 0'25 gramos
Sol. ac. sat. de ácido pícrico. 100 c. c.

una vez que han sido tratados por el formol nítrico durante 10 minutos y lavados convenientemente en agua. Las operaciones subsiguientes son las mismas que quedan citadas para los demás procedimientos.

Operando así, los núcleos se tiñen en violeta negro; los protoplasmas en verde; las granulaciones de las células cebadas y la substancia fundamental del cartílago en violeta azulado; la mucina en violeta negro; los hematies en verde claro; las granulaciones eosinófilas en amarillo o amarillo verdoso; las fibras colágenas en verde más o menos azulado; las musculares en verde claro; las elásticas en violeta intenso. Las preparaciones son, a la vez que muy demostrativas, de una belleza espléndida, y se conservan muy bien. En nuestro sentir, es el procedimiento de elección.

Sexto procedimiento. Cloruro de aluminio — Fuchina acética — Formol aluminico acético — Picrofuchina.
(Cla. Fa. Fal. Pf.)

Ha sido nuestra preocupación constante, desde que encontramos el primer método de coloración de las fibras elásticas, teñir las fibras elásticas en violeta, los haces colágenos en rojo y el tejido muscular en amarillo. Pero no contábamos con las numerosas dificultades que se nos habían de presentar.

Comenzamos por ensayar el procedimiento siguiente:

Fuchina al 7'5 por 100 y acetificada, 5 minutos; lavado en agua; formol alumínico acético, 10 minutos; lavado en agua; picrofuchina de van Giesson, 1 minuto; lavado en agua; alcoholes, etc. Los núcleos y demás sustancias basófilas se tiñeron en violeta; los haces colágenos en rojo; *las fibras musculares en amarillo rojizo o en rojo*. Con esta coloración no destacaban bien las fibras elásticas, ni había perfecta diferenciación entre los haces colágenos y las fibras musculares y, lo que era aún peor, las preparaciones se decoloraban.

Muy pronto nos dimos cuenta del por qué de nuestro fracaso. Las fibras elásticas se teñían más o menos intensamente con la picrofuchina adquiriendo una coloración roja, modificada, hasta cierto punto, por la coloración violeta que les comunicaba la fuchina y el formol alumínico acético. El tejido muscular no se coloraba en amarillo puro, sencillamente porque, teñido ya con la fuchina y el formol alumínico acético, en rosa violáceo, el ácido pícrico no lograba desalojar el colorante que de antemano le impregnaba. La coloración de las fibras elásticas no se conservaba, porque la picrofuchina iba poco a poco difundiéndose por toda la preparación y, sobre todo, por las fibras elásticas.

Había que remediar estos inconvenientes. Era preciso aumentar la afinidad de la fuchina, modificada por la acción del formol y del cloruro de aluminio, para las fibras elásticas, o, por lo menos, lograr que el colorante que las impregnase no sufriera alteración por la picrofuchina. A este fin intentamos insolubilizar la fuchina alumínico-formolada haciendo pasar los cortes, que habían permanecido diez minutos en el formol alumínico acético, a la solución de ácido tánico al 10 por 100.

Sospechábamos que el ácido tánico se comportaría con la fuchina alumínico-formolada como se comportaba con

el azul de metileno (método de Nicolle para la tinción de los microbios en los cortes) y, además, que el cloruro de aluminio en presencia del ácido tánico se transformaría en tanato alumínico insoluble. Pero procediendo como acabamos de indicar no conseguimos mejorar gran cosa la coloración de los haces conjuntivos y fibras musculares aunque sí logramos que las fibras elásticas se percibieran mejor.

Resultaba indudable que no conseguiríamos la coloración amarilla del tejido muscular y la roja de las fibras colágenas, sino con esta condición: tiñendo menos intensamente con la fuchina, bien disminuyendo su concentración o haciendo una coloración más breve. Intentamos utilizar la solución de fuchina de Ziehl diluída al 5 por 100 y acetificada, dejándola actuar durante 5 minutos, y terminando la preparación como queda indicado, aunque sin la intervención del ácido tánico, y ni aun así logramos teñir el tejido muscular en amarillo y el conjuntivo en rojo, y con la particularidad de que las fibras elásticas aparecían ya en un color violeta pálido. Era, pues, inútil disminuir el tiempo de acción de la fuchina y más inútil aún rebajar su concentración, pues llegaríamos a dejar sin teñir las fibras elásticas.

Indudablemente; el formol alumínico acético actuando como mordiente fijaba la coloración de la fuchina con tal intensidad sobre las fibras musculares, que el ácido pícrico era incapaz de teñirlas en amarillo. El dilema era este: *o teñir las fibras elásticas en violeta o el tejido muscular en amarillo*; las dos cosas a la vez parecía imposible. Por lo demás, la decoloración de las preparaciones era inevitable, porque, *coloración mal diferenciada, preparación perdida*.

Sería inútil mencionar todos los ensayos que realizamos para vencer estas dificultades — creemos haber inten-

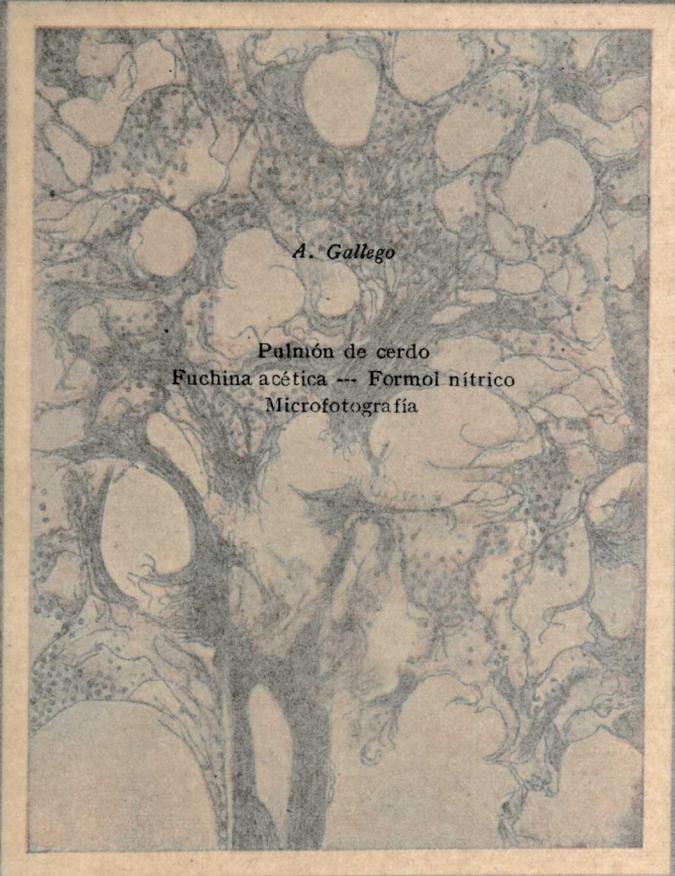
tado todo lo posible y todo lo imposible, — pero sí queremos dar cuenta de estas dos tentativas:

1.^a Se nos ocurrió pensar que lo que no podíamos realizar con la picrofuchina, quizá lo lográsemos empleando sucesivamente la fuchina ácida y el ácido pícrico (estábamos muy escarmentados de las mezclas colorantes para obtener coloraciones combinadas simultáneas). Hicimos, pues, la coloración de van Giesson en dos tiempos, y aunque conseguimos, es verdad, alguna mejora en la coloración de las fibras elásticas y del tejido muscular, no quedamos completamente satisfechos.

2.^a Sabiendo que la solución de cloruro de aluminio al 1 por 100, empleada antes de la coloración con la fuchina acética disminuía la coloración de todos los elementos anatómicos (fibras musculares inclusive), con excepción de las sustancias cromotropas, ensayamos este procedimiento: Cloruro aluminico — Fuchina acética — Formol aluminico acético — Picrofuchina, y como habíamos previsto, las fibras elásticas se tiñeron en violeta intenso, esto es, se comportaron como sustancias cromotropas; los haces colágenos tomaron un tinte rojo y las fibras musculares adquirieron un color amarillo ligeramente verdoso. Ved cómo de nuestras investigaciones relativas a la coloración de las sustancias cromotropas, fuimos a la coloración de las fibras elásticas, y de la coloración de las fibras elásticas volvimos a la coloración de las sustancias cromotropas.

Estábamos ya satisfechos. Sin embargo, al examinar, a los pocos días, las preparaciones con tanto trabajo logradas, observamos con disgusto que el matiz ligeramente verdoso del tejido muscular se había acentuado en tal forma, que hacía desmerecer grandemente las preparaciones.

Por fin, sospechando que las coloraciones se conserva-

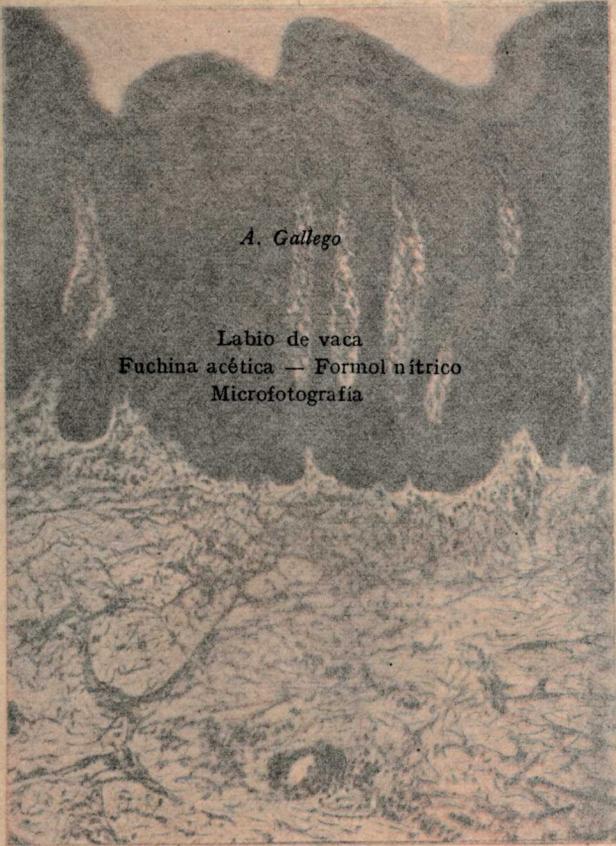


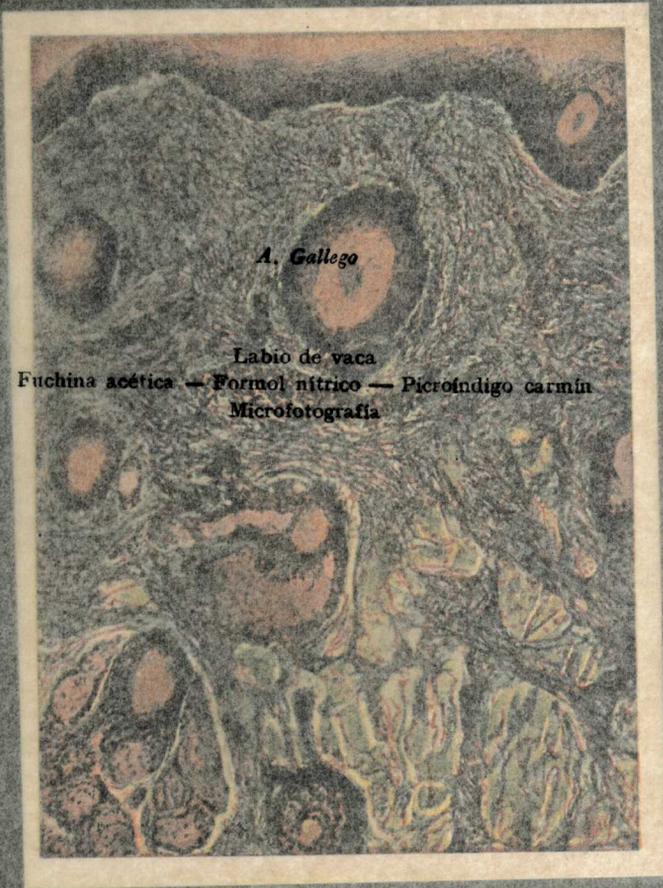
A. Gallego

Pulmón de cerdo
Fuchina acética --- Formol nítrico
Microfotografía

A. Gallego

Labio de vaca
Fuchina acética — Formol nítrico
Microfotografía



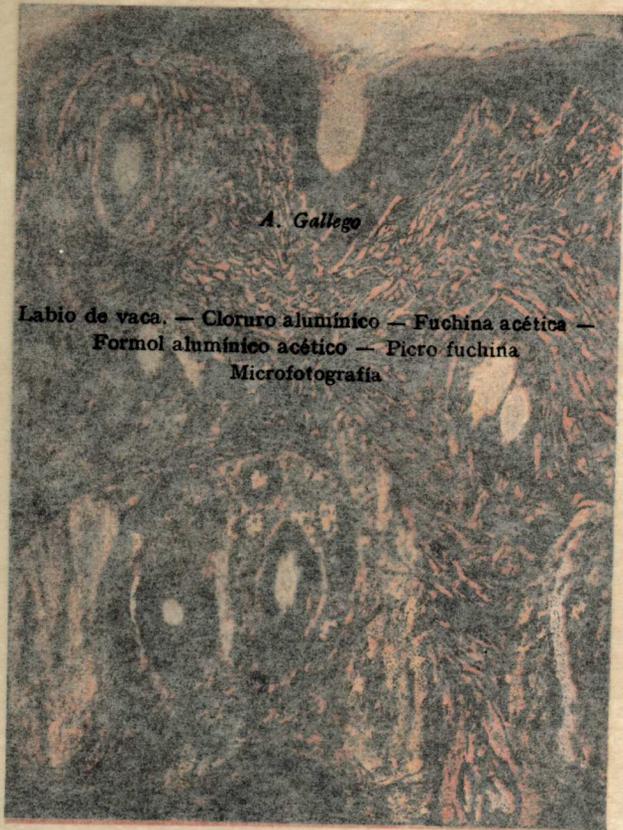


A. Gallego

Labio de vaca

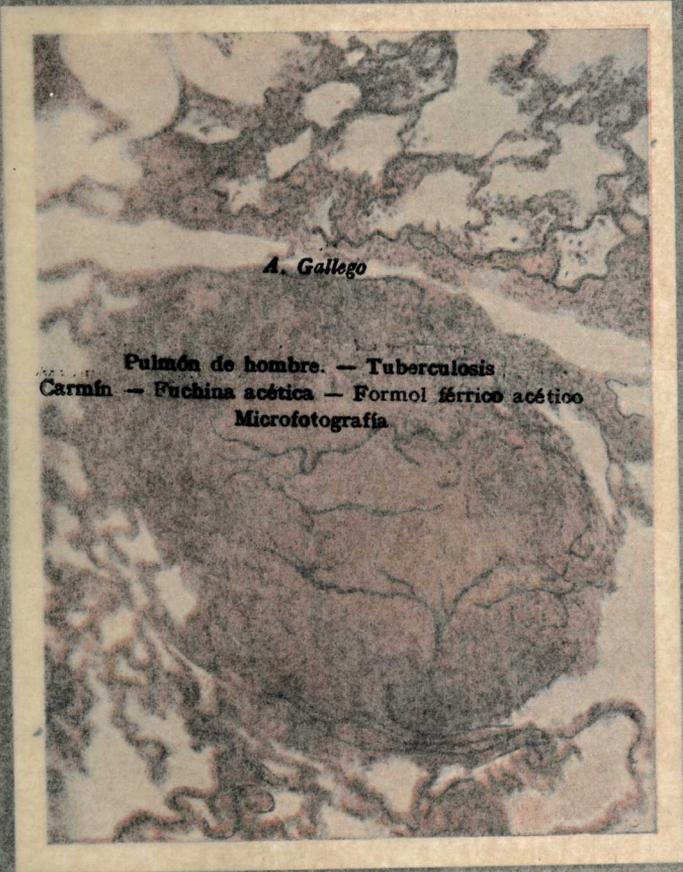
Fuchina acética — Formol nítrico — Picroíndigo carmín

Microfotografía



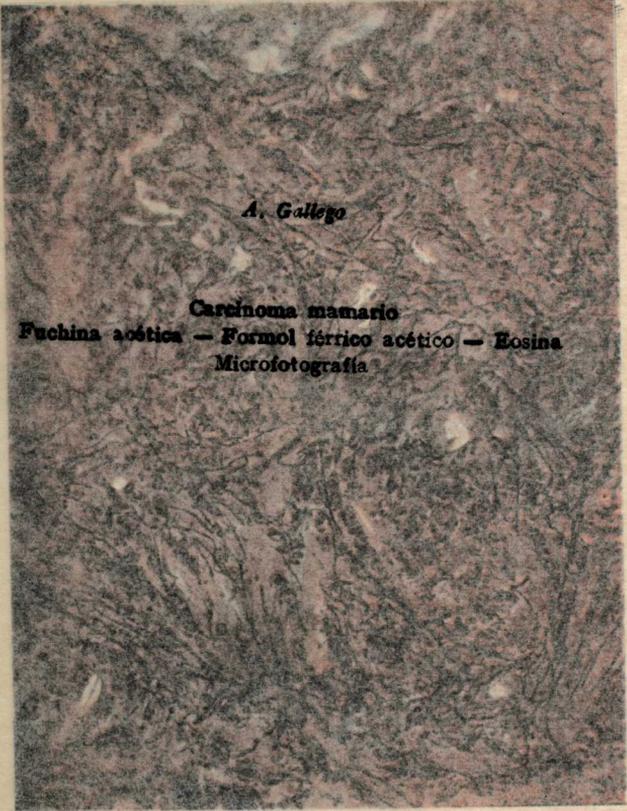
A. Gallego

Labio de vaca. — Cloruro aluminico — Fuchina acética —
Formol aluminico acético — Picro fuchina
Microfotografía



A. Gallego

Pulmón de hombre. — Tuberculosis
Carmín — Fuchina acética — Formol férrico acético
Microfotografía



A. Gallego

Carcinoma mamario
Fuchina acética — Formol férrico acético — Eosina
Microfotografía

rían mejor substituyendo el xilol fenicado por la esencia de Cayeput, empleamos ésta como aclarante, consiguiendo conservar por más tiempo las coloraciones, incluso el color amarillo del tejido muscular, aunque sin lograr completamente que adquiriese un ligero matiz verdoso.

Así y todo, nuestras preparaciones obtenidas con estas últimas modificaciones, son muy superiores a las que se tienen guardadas como oro en paño en los laboratorios de Histología, por considerarlas como el colmo de la perfección de las coloraciones con el método de van Giesson, y esto, claro está, aun sin que en ellas se haya conseguido la coloración de las fibras elásticas.

No hemos podido ir más lejos. ¡Ojalá que otros investigadores acierten a resolver todas las dificultades que a nosotros nos han parecido insuperables!

En resumen: la técnica que nos parece más apropiada para obtener buenas coloraciones de van Giesson y a la vez una admirable tinción de las fibras elásticas, es la siguiente:

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100, 1 minuto.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100, 5 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Formol alumínico acético, 10 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Picrofuchina de van Giesson, 1 minuto.
10. Lavado en agua.
11. Alcoholes de 95º y absoluto.
12. Esencia de Cayeput.
13. Bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

Núcleos en violeta; substancias cromotropas en violeta azulado intenso; haces conjuntivos en rojo; fibras musculares en amarillo ligeramente verdoso; fibras elásticas en violeta.

Excusado decir que hemos ensayado el procedimiento: Fuchina acética—Formol nítrico—Picrofuchina, y el: Fuchina acética — Formol férrico acético — Picrofuchina, y,

en fin, ambos con la acción previa del cloruro de aluminio, sin resultados satisfactorios. Tampoco había necesidad de decir que habíamos intentado insolubilizar la fuchina férrica formolada, mediante el ácido tánico, buscando, claro está, la formación del tanato férrico insoluble, aunque sin lograr, ni mucho menos, lo que pretendíamos. Y, por último, bueno será decir que también hemos ensayado el procedimiento: Percloruro de hierro — Fuchina acética — Formol férrico acético — Picrofuchina, sin ninguna ventaja, y que, asimismo, nuestras tentativas de diferenciación de la coloración de la fuchina alumínica, férrica y nítrica formoladas, mediante el empleo de los ácidos acético, clorhídrico, sulfúrico y nítrico, fueron otros tantos fracasos.

Séptimo procedimiento. Carmin—Fuchina acética—Formol nítrico (C. Fa. Fn.)

Y vamos a terminar por donde cualquier histólogo hubiera comenzado: por dar a conocer un procedimiento en que la coloración nuclear se obtiene con un colorante rojo y la tinción de las fibras elásticas con un colorante violeta.

Confesemos, ante todo, que la resolución de tal problema apenas nos ha preocupado. ¿Motivo? ¿Por qué razón ha de haber dificultades para distinguir un elemento de forma alargada y de gran longitud de otros redondos, aunque tengan igual color? ¿Qué importa que las fibras elásticas se tiñan en violeta lo mismo que los núcleos de todas las células?

Sin embargo, llegó para nosotros la ocasión de preocuparnos el problema. Quisimos teñir las fibras elásticas del pulmón del carnero y del perro, animales en que tales fibras son tan sutiles que apenas se perciben con un

aumento de 100 diámetros. En el pulmón de estos animales la abundancia de núcleos, teñidos en violeta, enmascara las finas fibras elásticas que corren en todos sentidos. Ninguno de los procedimientos indicados permiten ver claramente tales fibras. Hubo necesidad de recurrir a otros.

Por de pronto, sabiendo ya que las fibras elásticas se comportaban con nuestros métodos de coloración, de manera análoga como lo hacían las sustancias cromotropas, esto es, atrayendo la fuchina modificada por la acción del formol, aun en el caso en que la coloración previa con otro colorante dificultase la tinción de los demás elementos y sustancias intercelulares, máxime si dicho colorante contenía alguna substancia que actuase como mordiente, el aluminio por ejemplo; y sabiendo también que la tinción previa con el carmín no impedía la coloración ulterior de las sustancias cromotropas, con la fuchina y el formol acético, se nos ocurrió teñir los cortes previamente con carmín aluminoso y después con fuchina acética y formol nítrico. Logramos así teñir los núcleos, no en rojo puro, sino en rojo algo violáceo, lo que nos permitió percibir con toda claridad las fibras elásticas teñidas en violeta intenso.

Tratamos de evitar el ligero matiz violeta de los núcleos, primero, prolongando la acción del carmín, sin conseguir ningún resultado, y, después, abreviando el tiempo de acción de la fuchina. Así conseguimos teñir en rojo todos los elementos basófilos y acidófilos, y en violeta las sustancias cromotropas y las fibras elásticas. En una palabra: las fibras elásticas se comportaron como sustancias cromotropas — que buscan el color básico — como habíamos presentido.

Las fórmulas de carmín que hemos ensayado son las siguientes:

Carmalun de P. Mayer.

Acido carmínico	0'50 gr.
Alumbre potásico	5'00 gr.
Agua destilada.....	100 c. c.
Disolved en caliente. Filtrad.	

Paracarmín de P. Mayer.

Acido carmínico	1 gr.
Cloruro alumínico	0'50 gr.
Cloruro cálcico.....	4 gr.
Alcohol de 70°.....	10 c. c.

Carmín de Schwidd y Fricke.

Disolved en caliente 5 gramos de alumbre potásico en 100 c. c. de agua. Agregad un gramo de carmín y haced hervir la solución. Dejad enfriar y filtrad.

Pero huyendo de la coloración ligeramente violácea que adquieren los núcleos teñidos por el carmín y la fuchina, modificada por el formol, todavía intentamos otro ensayo, consistente en doblar la cantidad de carmín en la fórmula de carmalun de P. Mayer, esto es, emplear un gramo de carmín en vez de medio como aconseja el autor. Pero al probar este nuevo colorante advertimos que el formol alumínico acético ni el formol nítrico no nos daban buen resultado. Substituimos éstos por el formol férrico acético y conseguimos la coloración que habíamos perseguido.

Así, pues, recomendamos la técnica que sigue:

1.º Fijación en formol al 10 por 100. 2.º Cortes por congelación. 3.º Carmín aluminoso de P. Mayer, pero con

doble cantidad de carmín, 1 minuto. 4.º Lavado en agua. 5.º Fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100, 1 minuto. 6.º Lavado en agua. 7.º Formol férrico acético, 5 minutos. 8.º Lavado en agua, xilol fenicado, bálsamo del Canadá disuelto en xilol.

Los elementos basófilos y acidófilos se tiñen en rojo, el cartílago y las granulaciones de las células cebadas, en violeta azulado; la mucina, en violeta negro; las fibras elásticas, en violeta puro muy intenso.

Insistimos en que este procedimiento debe preferirse a todos los demás para la coloración de las fibras elásticas de los órganos que contienen muchos núcleos y, además, las citadas fibras, o son muy delgadas, o poco numerosas (pulmón sobre todo, matriz y, en fin, cánceres encefaloides, etc.).

Para las preparaciones de pulmón humano, que posee fibras elásticas muy gruesas y que, además, es siempre producto de autopsia, y ya la histolisis está muy avanzada, no es tan preciso recurrir al último procedimiento citado, pues los núcleos celulares se tiñen débilmente en violeta con la fuchina y el formol nítrico, mientras que las fibras elásticas, más resistentes a las alteraciones cadavéricas, fijan intensamente el colorante y aparecen en violeta intenso. De todas suertes, el procedimiento Carmín — Fuchina acética — Formol férrico acético, hace resaltar mejor las fibras elásticas más finas.

En fin; todavía, si se desea una preparación con más contrastes de color, después de la tinción con el carmín, la fuchina acética y el formol nítrico o férrico, hágase la coloración con el picroíndigocarmín, de Cajal, que teñirá en verde azulado los haces colágenos y en verde claro las fibras musculares.

RESUMEN

Ante la posibilidad de que este trabajo llegue a despertar algún interés entre los especialistas o aficionados a estos estudios, y unos y otros no dispongan de tiempo para leerlo con detenimiento o les importe poco enterarse de cómo hemos llegado a encontrar los métodos y procedimientos de coloración de las fibras elásticas que quedan descritos, nos decimos a exponer en forma lo más sintética posible cada uno de los métodos y procedimientos, de modo que aparezcan aislados unos de otros y puedan ser tenidos sobre la mesa de trabajo y no haya necesidad de buscar detalles de técnica que por el momento sean innecesarios.

Así, pues, para lograr cumplidamente nuestro propósito, haremos ante todo las advertencias siguientes:

1.^a El término *fuchina acética* significa: fuchina de Ziehl diluída al 7'5 por 100 en agua destilada y acetificada (3 gotas de fuchina de Ziehl por cada 2 c. c. de agua destilada y una gota de ácido acético por cada 4 ó 6 c. c. de dicha solución).

2.^a Las denominaciones *formol aluminico acético*, *formol férrico* y *formol nítrico* expresan: la primera, solución acuosa de cloruro de aluminio al 1 por 100, a la que se agregan una gota de formol y otra de ácido acético por cada 5 c. c.; la segunda, solución acuosa de percloruro de hierro, en la proporción de 3 gotas de éste por cada 5 c. c. de agua destilada, más 1 gota de formol y otra de ácido acético; y la tercera, solución acuosa de ácido nítrico y formol (ácido nítrico, 1 gota; formol, 1 gota; agua destilada, 5 c. c.).

3.^a Aunque al describir los diferentes procedimientos de coloración de las fibras elásticas los referimos al método tercero (Fuchina acética — Formol nítrico), entién-

dase que, salvo el 6.º y aun el 7.º procedimiento, todos los demás pueden ser utilizados con el primero y segundo métodos (Fuchina acética — Formol alumínico acético; Fuchina acética - Formol férrico acético).

4.ª A pesar de recomendar como único método de cortes el método de la congelación, no hay inconveniente en hacer todos los métodos y procedimientos de coloración de las fibras elásticas con cortes de tejidos incluidos en parafina. No hemos tenido tiempo para averiguar si los mismos resultados se obtendrán con cortes de tejidos incluidos en celoidina, aunque creemos que será necesario disolver previamente la celoidina.

5.ª No obstante aconsejar como aclarante el xilol fenicado, el aclaramiento puede hacerse en toluol fenicado, esencias de clavo, bergamota, orégano y Cayeput.

6.ª Las frases *serie de alcoholes* indican: alcohol de 95º y absoluto.

7.ª Cuando decimos simplemente *bálsamo del Canadá*, queremos indicar: bálsamo del Canadá disuelto en xilol y no en cloroformo. El bálsamo puede ser substituído por la resina Dammar.

MÉTODOS DE COLORACIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS

Primer método. Fuchina acética — Formol alumínico acético

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética, 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol alumínico acético; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado.
- 9.º Bálsamo del Canadá.

Segundo método. Fuchina acética — Formol férrico acético
(Fa. Ffa.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol férrico acético; 5-10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado.
- 9.º Bálsamo del Canadá.

Tercer método. Fuchina acética — Formol nítrico (Fa. Fn.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol nítrico; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Serie de alcoholes.
- 8.º Xilol fenicado.
- 9.º Bálsamo del Canadá.

PROCEDIMIENTOS DE COLORACIONES COMBINADAS SUCE-
SIVAS QUE COMPLETAN LOS TRES MÉTODOS FUNDAMEN-
TALES DE TINCIÓN DE LAS FIBRAS ELÁSTICAS.

Primer procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico—
Eosina (Fa. Fn. E.) (Recomendable)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.

- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol nítrico; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Solución acuosa de eosina al 1 por 100; medio a un minuto.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Segundo procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Acido pícrico (Fa. Fn. Ac. p.) (Preparaciones recientes admirables, pero se conservan mal.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol nítrico; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Solución acuosa de ácido pícrico; 1 minuto

Sol. ac. sat. en caliente de ácido pícrico.. 1 c. c.
Agua destilada 5 c. c.

- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Tercer procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Aurancia (Fa. Fn. A.) (Buenas preparaciones recientes, que se conservan mal.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.

- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol nítrico; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Solución acuosa de aurancia al 1 por 200; 5 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Cuarto procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Verde luz (Fa. Fn. VI.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Formol nítrico; 5 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Solución hidroalcohólica de verde luz; unos segundos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Quinto procedimiento. Fuchina acética — Formol nítrico — Picroíndigocarmín (Fa. Fn. P. i. c.) (Muy recomendable.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 4.º Lavado en agua.

- 5.º Formol nítrico; 10 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Picroíndigocarmín, de Cajal; 1 minuto.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Sexto procedimiento. Cloruro alumínico—Fuchina acética—Formol alumínico acético—Picrofuchina (Cal. Fa. Fal. Pf.) (Recomendable.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Solución acuosa de cloruro alumínico al 1 por 100; 1 minuto.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Fuchina acética; 5 minutos.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Formol alumínico acético; 10-15 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Picrofuchina de van Giesson; 1 minuto.
10. Lavado en agua.
11. Serie de alcoholes.
12. Esencia de Cayeput.
13. Bálsamo del Canadá.

Séptimo procedimiento. Carmin—Fuchina acética—Formol nítrico (Ca. Fa. Fn.) (Muy recomendable para órganos ricos en núcleos, que posean fibras elásticas muy finas, demasiado numerosas o muy escasas—pulmón, matriz, etc.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.

- 3.º Carmín (Carmalun de P. Mayer; Paracarmín o Carmín de Schridde); 1 minuto.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Fuchina acética; 1 minuto.
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Formol nítrico; o mejor formol férrico acético; 10 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Serie de alcoholes.
10. Xilol fenicado.
11. Bálsamo del Canadá.

Octavo procedimiento. Carmín — Fuchina acética — Formol nítrico — Picroíndigocarmín (Ca. Fa. Fn. P. i. c.) (Recomendable en los mismos casos que el anterior.)

- 1.º Fijación en formol al 10 por 100.
- 2.º Cortes por congelación.
- 3.º Carmín; 1 minuto.
- 4.º Lavado en agua.
- 5.º Fuchina acética; 1 minuto..
- 6.º Lavado en agua.
- 7.º Formol nítrico, o formol férrico acético; 10 minutos.
- 8.º Lavado en agua.
- 9.º Picroíndigocarmin de Cajal; 1 minuto.
10. Lavado en agua.
11. Serie de alcoholes.
12. Xilol fenicado.
13. Bálsamo del Canadá.

CONCLUSIONES

- 1.ª Los métodos clásicos de coloración de las fibras elásticas son dos: el de Unna-Taenzer y el de Weigert.

2.^a El primero adolece del defecto de la lentitud en la tinción; el segundo, de la dificultad para preparar el colorante. Son métodos de excepción.

3.^a Los métodos de coloración de las fibras elásticas que proponemos están fundados en el empleo de mordientes de la fuchina asociados al formol, y son los siguientes: *Primer método. Fuchina acética — Formol alumínico acético.* — *Segundo método. Fuchina acética — Formol férrico acético.* — *Tercer método. Fuchina acética — Formol nítrico.*

4.^a Todos estos métodos tiñen las fibras elásticas en violeta intenso y dan a los demás elementos anatómicos y substancias intercelulares gran variedad de tonos que permiten una fácil interpretación histológica.

5.^a Los tres métodos fundamentales pueden completarse con coloraciones de contraste y obtener hasta ocho procedimientos de coloración de las fibras elásticas.

6.^a De estos procedimientos son especialmente recomendables los siguientes: A) *Fuchina acética — Formol nítrico — Eosina;* B) *Fuchina acética — Formol nítrico — Picroíndigocarmín;* C) *Cloruro alumínico — Fuchina acética — Formol alumínico acético — Picrofuchina;* D) *Carmín — Fuchina acética — Formol férrico acético.*

7.^a Estos métodos de coloración de las fibras elásticas, como asimismo los procedimientos que los completan, superan a los métodos clásicos de Unna-Taenzer y de Weigert por su rapidez, facilidad, economía, seguridad y posibilidad de gran número de coloraciones combinadas, ventajas que permiten ser empleados a diario en cualquier laboratorio de histología, por escasos que sean sus recursos.

Laboratorio de Histología y Anatomía patológica de la Escuela de Veterinaria de Santiago.