

EL TEJIDO CONJUNTIVO DEL CORAZÓN DE «HELIX»

por

E. FERNÁNDEZ GALIANO

En esta misma Revista hemos publicado en 1917 un trabajo titulado: *Sobre la fina estructura del corazón de «Helix»*, en el que estudiábamos dos cosas: las fibrillas conectivas del citado órgano y algunas particularidades estructurales de las fibras musculares cardíacas. En el presente estudio insistimos en la investigación de las fibras conectivas, y en él anotamos detalles estructurales que antes no habíamos observado, además de rectificar algunas interpretaciones que se apoyaban en imágenes microscópicas imperfectas.

Para el estudio de las fibras conectivas empleamos en el citado trabajo exclusivamente el conocido método de Achúcarro de la impregnación tano-argéntica (1). En el que ahora hacemos nos hemos servido de un método de impregnación argéntica de Cajal, además de los procedimientos tricrómicos de Calleja (2) y de Van Gieson. El aludido procedimiento de Cajal fué publicado por su autor en

(1) N. ACHÚCARRO: *Nuevo método para el estudio de la neuroglia y del tejido conjuntivo*. (Bol. de la Soc. esp. de Biol., 1911, n.º 7.)

(2) Debo hacer constar mi gratitud a mi querido amigo y compañero el catedrático de Histología en la Facultad de Medicina de Barcelona, Dr. C. Calleja, quien, amablemente, me ha favorecido con algunos consejos relativos a la buena aplicación de su método tricrómico.

1904 (1) a título de fórmula para teñir la porción terminal de las fibras nerviosas.

Este procedimiento se desarrolla como sigue:

1.º Los trozos de tejido nervioso se conservan durante 24 horas en el siguiente líquido fijador:

Formol	25	c.	c.
Agua	100	»	»
Amoniaco, algunas gotas, lo más.	0,5	»	»

2.º Lavado de las piezas, durante seis a doce horas en agua corriente, a fin de extraer completamente el formol y el amoniaco.

3.º Inmersión de las piezas en nitrato de plata (solución desde el 1 al 3 por 100) donde permanecerán tres días en estufa.

4.º Reducción en el líquido siguiente:

Acido pirogálico o hidroquinona.	1 ó 2	grs.	
Agua	100	c.	c.
Formol	5	»	»
Sulfito de sosa anhidro ... de	0,25	a	0,50 grs.

5.º Lavado en agua, deshidratación, inclusión en celoidina.

Este procedimiento ha sido modificado por el propio Cajal dos veces sucesivas, en 1907 y en 1910 respectivamente. La primera modificación (2) consiste en emplear

(1) S. R. CAJAL: *Algunos métodos de coloración de los cilindros-ejes, neurofibrillas y nidos nerviosos.* (Trab. del Labor. de Investig. biol. de la Univers. de Madrid, t. III, 1904.)

(2) S. R. CAJAL: *L'appareil réticulaire de Golgi-Holmgren coloré par le nitrate d'argent.* (Trav. du labor. de Rech. biol. de l'Univers. de Madrid, t. V, 1907.)

como fijador un líquido compuesto de una parte de formol y diez de agua destilada (sin amoníaco); la segunda modificación (1), empleada para el sistema nervioso, se expresa como sigue:

1.º Fijación de las piezas, que no deben pasar de 4 milímetros de espesor, durante seis a doce horas en formol al 15 por 100.

2.º Lavado durante seis o más horas en agua corriente para extraer el formol.

3.º Inmersión de las piezas, durante 24 horas, en el alcohol amoniacal (alcohol de 96º, 50 c. c.; amoníaco V gotas).

4.º Enjugadas las piezas en papel chupón, llévanse por cinco días al nitrato de plata (si la estufa está a 38º ó 40º, cuatro días tan sólo).

5.º Reducción por 24 horas en este líquido:

Acido pirogálico o hidroquinona .	1 gramo.
Agua	100 c. c.
Formol	5 a 10 c. c.

6.º Lavado, deshidratación, etc.

Estas fórmulas han sido aplicadas por Cajal con éxito para la impregnación de diversos pormenores de estructura de los elementos nerviosos; advierte, además, el citado sabio, en sus dos trabajos ya citados (1907 y 1910) que también se muestran teñidas las células y las fibras colágenas del tejido conjuntivo.

Hemos querido aplicar el método en cuestión al estudio del tejido conjuntivo del corazón de *Helix*, para obtener

(1) S. R. CAJAL: *Las fórmulas del proceder del nitrato de plata reducido y sus efectos sobre los factores integrantes de las neuronas.* (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univers. de Madrid, t. VIII, 1910.)

el cual lo más fresco posible, hemos extraído el corazón del caracol vivo del modo que en la página 3 de nuestro mencionado trabajo queda consignado.

El proceder por nosotros empleado en el corazón del caracol común ha sido, en esencia, el que nos ocupa. Los líquidos que hemos utilizado son los siguientes:

Fijador: Formol al 10 por 100 (1).

Impregnador: Solución de nitrato argéntico al 2 por 100.

Reductor: Un líquido compuesto de

Hidroquinona.	2 gramos
Formol	15 c. c.
Agua	100 » »
Sulfito sódico, cantidad suficiente para dar al licor un tono amarillo o café claro.	

Este reductor es el preconizado por Cajal para observar el aparato reticular de Golgi (2).

Hemos ensayado algunas variaciones tocante al tiempo de permanencia en los diversos líquidos. Así, por ejemplo, hemos hecho preparaciones de corazones que han permanecido en el fijador (formol al 10 por 100) 48 horas, cuatro días, nueve días, 19 días y 30 días, obteniendo sensiblemente los mismos resultados.

La solución de nitrato de plata al 2 por 100 ha actuado sobre las piezas, unas veces 58 horas, otras 62 y otras cuatro días, sin que tampoco hayamos observado grandes diferencias entre las respectivas preparaciones.

Y, finalmente, en el baño reductor (hidroquinona-

(1) Con objeto de evitar la acidez del formol, hemos empleado este líquido después de permanecer muchos días en contacto con gran cantidad de creta pulverizada.

(2) S. R. CAJAL: *Algunas variaciones fisiológicas y patológicas del aparato reticular de Golgi.* (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univers. de Madrid, t. XII, 1914.)

formol-sulfito sódico) han permanecido los corazones tiempos variables entre 16 y 24 horas.

En resumen, pues, se puede emplear este método, con los resultados que luego veremos, fijando las piezas en el formol durante dos o más días, lavándolas a continuación en agua destilada, sumergiéndolas después en la solución argéntica durante dos a cuatro días y dejándolas, por último, en contacto con el líquido reductor 18 ó 20 horas. Los cortes han sido efectuados con el microtomo de congelación, deshidratados y montados en bálsamo del Canadá.

Todo el que ha empleado el método de Achúcarro sabe cuán grande es la electividad de la plata para las fibras conectivas que dibuja con toda corrección, incluso las más finas; pero también es cosa sabida que tal proceder es algo inconstante y los resultados que se obtienen con su aplicación son variables, dependiendo tal variabilidad de múltiples causas, como, por ejemplo, la concentración de la solución acuosa de tanino, la temperatura a que se someten los cortes en el líquido tánico, el mayor o menor lavado de las secciones, etc.

Por lo que a nosotros nos ha sido dado observar, el método del nitrato de plata reducido con previa fijación en formol, en el corazón de *Helix* y en las condiciones en que lo hemos ensayado da un resultado absolutamente constante en lo que se refiere a la impregnación de las fibras conectivas, habiéndonos permitido esta circunstancia comprobar detalles que en las preparaciones efectuadas según el procedimiento de Achúcarro no nos fué posible hacer patentes. Con el proceder del nitrato de plata reducido todas las secciones hechas han quedado bien teñidas y en toda su extensión. A esta ventaja hay que sumar la de la extraordinaria sencillez de la técnica.

Examinado a regular aumento un corte, ya transversal, ya longitudinal, de ventrículo de *Helix*, teñido por el procedimiento de que hemos hecho mención (nitrato argéntico reducido con fijación previa en formol al 10 por 100), llama la atención un plexo inextricable de fibras, unas gruesas y otras finas, que recorren el corte en todas direcciones, cruzándose unas con otras, juntándose y volviéndose a separar, formando mallas irregulares de figura y tamaño diversos y constituyendo, en total, un conjunto sumamente enredado que no sin trabajo puede llegar a interpretarse, destacándose sobre un fondo uniformemente amarillo, rojizo o incoloro. (Véase la microfotografía.)

Observando, sin embargo, el preparado, con buenos objetivos de inmersión, se llega prontamente a discernir tres clases de fibras: unas que recorren la periferia del ventrículo, de color amarillo rojizo o pardo; otras, que son la mayoría, surcan todo el resto del músculo entrecruzándose, descomponiéndose en otras más finas, siguiendo un curso sumamente tortuoso e imposible de describir y aparecen teñidas en negro más o menos intenso o pardo rojo; y, finalmente, fibrillas muy finas, débilmente impregnadas por la plata, pero lo bastante, sin embargo, para poder hacer su estudio y distinguir claramente unas de otras, que envuelven inmedatamente las fibras musculares.

Hablemos primeramente de los cordones periféricos. En nuestro ya citado trabajo hacíamos constar la existencia por debajo del epitelio pericárdico de un grueso cordón conectivo, único o múltiple, formando arcadas y enviando hacia el interior prolongaciones que ciñen las fibras y paquetes musculares, y que se extiende alrededor de todo el miocardio.

En las preparaciones que ahora hemos ejecutado se puede comprobar que el tal cordón es casi siempre grueso

e integrado por numerosas fibrillas conjuntivas; es decir, que el miocardio está totalmente recubierto por uno o varios (casi siempre varios) hacecillos conjuntivos que siguen un curso irregularmente ondulado, cuyas ondulaciones corresponden a las arcadas de que acabamos de hablar. (Fig. 1.^a, A.) En algunas regiones estos hacecillos son numerosos y se entrecruzan, formando así un plexo muy complicado.

Tal formación conjuntiva toma color amarillo-rojizo, destacándose con poca claridad las fibrillas que componen los haces. Algunos cortes han sido teñidos, ya con ayuda del método tricrómico de Calleja, ya con el de Van Gieson, habiendo así obtenido dichos manojos conjuntivos de color azulado y color rosa respectivamente.

El hecho de teñirse estos hacecillos por los métodos clásicos mencionados, unido al de su poca apetencia por la plata, nos inclina a diputarlos construídos de materia colágena, la cual, como es sabido, toma particularmente bien las anilinas ácidas, pero se impregna mal con la plata. Asimismo, con el método de Achúcarro, los hacecillos perimicárdicos se destacan menos vigorosamente que las restantes fibras conectivas del corazón del caracol.

Como se ve, nuestras observaciones contradicen la afirmación de Marceau de que en los gasterópodos el epitelio pericárdico reposa directamente sobre las fibras musculares (1).

De la capa conjuntiva perimicárdica surgen numerosos cordones que se dirigen hacia el interior. Vistos a favor de un buen objetivo se puede observar que tales cordones tienen su nacimiento en la reunión de varias fibrillas conectivas del plexo perimicárdico, las cuales cambian su

(1) F. MARCEAU: *Recherches sur la structure du cœur chez les Mollusques*. (Arch. d'Anat. microsc., t. VII, 1904-1905.)

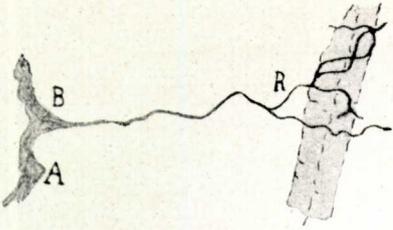


Fig. 1.ª

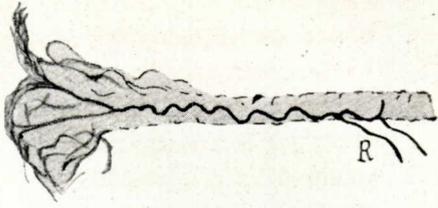


Fig. 2.ª

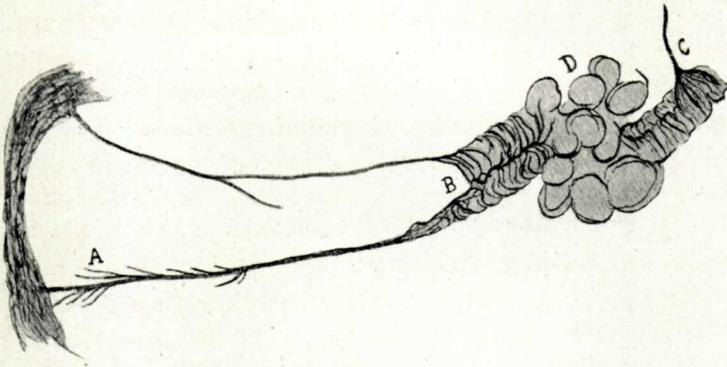


Fig. 3.ª

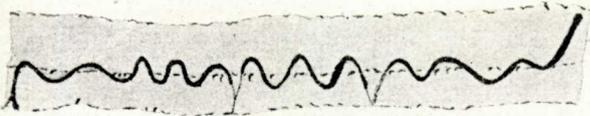


Fig. 4.ª

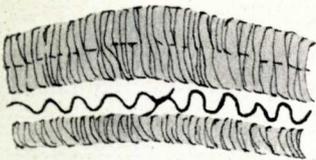


Fig. 5.ª



Fig. 6.ª



Fig. 7.ª

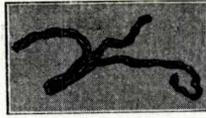


Fig. 8.ª

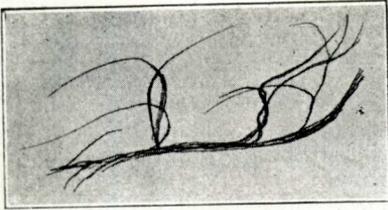


Fig. 9.ª

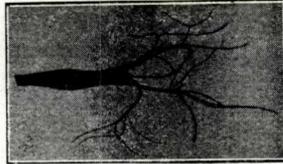


Fig. 10.ª

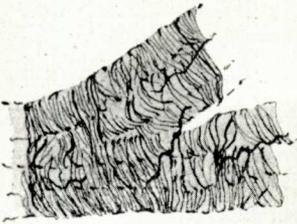


Fig. 11.ª



Fig. 12.ª

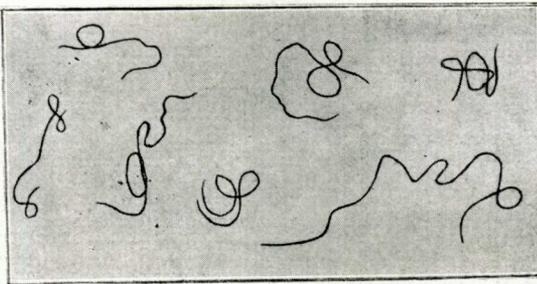
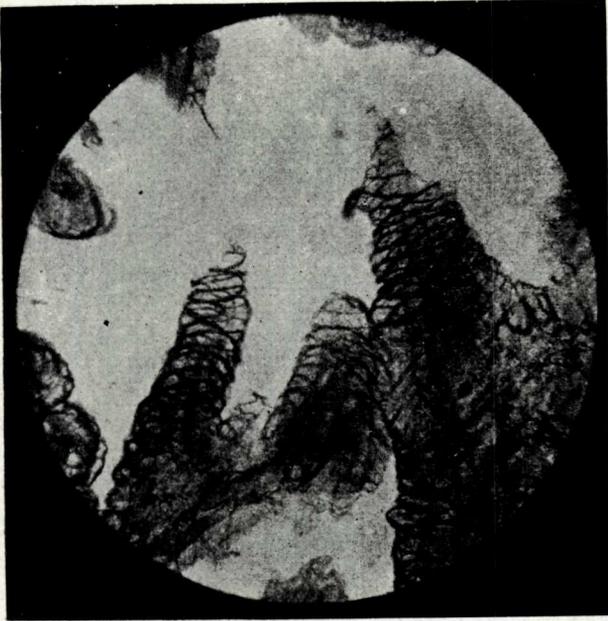


Fig. 13.ª

E. Fernández Galiano



curso tangencial por la dirección radial y se juntan formando un cono de origen cuyo vértice se prolonga en un cordón más o menos largo. (Fig. 1.^a B.)

Algunas veces los cordones conectivos de que hablamos proceden de fibras que forman, no un cono de origen, sino dos o más, o, dicho en otros términos, tales cordones resultan de la fusión de varios. Tal es el caso que representa la fig. 2.^a En fin, no es raro observar que durante el trayecto de uno de estos cordones se le unan fibrillas conectivas que proceden de diversos territorios del plexo perimicárdico, ya sueltas, ya reunidas en cordoncitos finos. (Fig. 3.^a, A.) En muchas ocasiones no es dable sorprender el origen de estos cordones porque surgen ya formados de entre la maraña conjuntiva que rodea el miocardio.

Los cordones radiales siguen un trayecto mayor o menor y más o menos rectilíneo, perdiéndose finalmente entre las fibras del miocardio. En algunos casos puede verse cómo los cordones se ramifican dando ramas secundarias, según puede observarse en las figuras 1.^a y 2.^a, R. En la figura 3.^a pueden verse dos hacecillos conjuntivos procedentes de la trama perimicárdica que al ponerse en contacto con fibras musculares se resuelven en una porción de fibras que rodean transversalmente el elemento muscular. (Fig. 3.^a, B.) En la misma figura (C) está representado un fascículo que aborda perpendicularmente una fibra muscular, descomponiéndose a su contacto en un pincel de finas fibras que se extienden en sentido transversal alrededor de la miofibra. Entre las miofibras B y C aparecen algunas fibras musculares cortadas de través y circundadas también por hebras conectivas. (Fig. 3.^a, D.)

En todos los cortes que hemos hecho pueden ser observadas unas fibras onduladas de longitud variable que ya hemos descrito en nuestro mencionado trabajo. Las fibras

onduladas se encuentran de ordinario a lo largo de las musculares y, de preferencia, siguiendo la línea de unión de dos miofibras (fig. 4.^a) u ocupando los huecos o intersticios que quedan entre éstas, como lo muestra la figura 5.^a

Verosímilmente, las fibras onduladas no son otra cosa que hacecillos radiales como los antes descritos, pero con ondulaciones: véase, como ejemplo, la figura 2.^a en que un cordoncito radial con dos conos de origen afecta figura ondulada durante su trayecto por encima de una miofibrá. Probablemente son dichas fibras onduladas equivalentes a las de la misma forma que Achúcarro y Calandre han descrito en el corazón de los mamíferos (1).

La mayoría de las fibras musculares cardiacas aparecen materialmente cubiertas por un tupidísimo plexo de hacecillos conectivos que dibujan asas, festones, arabescos, envolviendo los paquetes de miofibras (véase la microfotografía). Observados a gran aumento muéstranse los mentados fascículos en muchas partes como deshilachados, a causa de lo flojamente unidas entre sí que están las hebras conectivas que los integran. Muchas de éstas abandonan los cordones de que forman parte, tomando otra dirección y construyendo con sus análogas otro plexo constituido por fibrillas más finas. Las figuras 6.^a y 7.^a copian el aspecto de dos paquetes de miofibras reforzados a favor de la susodicha envoltura conectiva.

El modo de ramificación de los hacecillos conectivos es variado. Así, por ejemplo, en la figura 8.^a se ve un haz grueso y flojo que se reparte en tres, asimismo laxos; la figura 9.^a reproduce el aspecto de un cordón conectivo que

(1) N. ACHÚCARRO y L. CALANDRE: *El método del tanino y la plata amoniaca aplicada al estudio del tejido muscular cardíaco del hombre y del carnero*. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univers. de Madrid, t. XI, 1913.)

se descompone en otros más finos, los que, a su vez, se resuelven en fibras, mediante ramificaciones en Y; otros hacecillos, en fin (fig. 10), gruesos y homogéneos, se disgregan de una vez, dando una porción de fibras o de cordoncitos muy finos que también se arborizan emitiendo ramitas más delgadas.

En el corazón de *Helix* se encuentran muy frecuentemente unas fibras bien teñidas por la plata, de grosor variable y que siguen un curso sumamente irregular, revolviéndose sobre sí mismas y formando lazadas, anillos y otras figuras de mayor complicación. Unas veces aparecen sueltas, pero en otras ocasiones se continúan en forma de hilos que se incorporan y pierden en el plexo conectivo general. (Fig. 11.)

Achúcarro y Sacristán (1) han descrito unas fibras conectivas muy semejantes en la glándula pineal humana, a las que han dado el nombre de *fibras ensortijadas*: reputan dichos autores tales fibras como denunciadoras de un estado atrófico del órgano, fundados en haberlas encontrado con más profusión en epífisis con fenómenos regresivos bien marcados y en su semejanza con las variadas figuras, tales como asas, lazos y trenzas que, según Cerletti (2) dibujan los vasos en la corteza cerebral afecta de atrofia.

Si se compara nuestra figura 11 con la figura 5.^a del citado trabajo de Achúcarro y Sacristán, se puede uno persuadir de la semejanza de las fibras halladas en el corazón de *Helix* con las de la glándula pineal. Sin pre-

(1) J. M. SACRISTÁN: *Observaciones histológicas sobre la epífisis*. (Bol. de la Soc. esp. de Biol., 1912, n.ºs 11 y 12.)

N. ACHÚCARRO y J. M. SACRISTÁN: *Investigaciones histológicas e histopatológicas sobre la glándula pineal humana*. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univers. de Madrid, t. X, 1912.)

(2) CERLETTI: *Die Gefaessvermehrung in Zentralnervensystem*. (Histol. und histopat. Arbeiten, Bd. IV, 1910.)

juzgar si en este último órgano son o no consecuencia de fenómenos de atrofia, es evidente que en el músculo cardíaco del caracol no tienen este carácter. Si se tiene en cuenta que aquí los hilos conectivos ostentan una variedad inmensa de figuras y tamaños, se encontrará justificada nuestra opinión de que las tales hebras no representan sino casos exagerados de ausencia de regularidad en la forma. Por otra parte, muy a menudo se puede comprobar que se continúan con fibras rectas, o, por lo menos, no tan incurvadas como en el trayecto en que las consideramos.

Algunas veces yacen las fibras ensortijadas junto a los cabos terminales de las miofibras, lo cual nos induce a pensar que son fibras conectivas que envolvían las musculares y que han perdido esta posición, bien por retracción de las miofibras, bien mecánicamente por accidentes de la preparación.

Las finísimas fibras conectivas que envuelven las musculares, y que ya dejamos descritas en nuestro trabajo anteriormente citado, se dibujan en amarillo más o menos intenso con el método que ahora hemos empleado. En algunos parajes de la preparación se observan con una profusión extraordinaria, de lo que da idea la figura 11. En ella se ve que las miofibras están encerradas en un denso estuche conectivo.

Sin embargo, es lo más frecuente que tales fibrillas rodeen, no una, sino dos o más fibras musculares, según puede notarse en la figura 12. En ella se observan los tenues hilos conectivos que surcan transversalmente dos miofibras e inician una curva que tiende a envolver éstas. Otro hecho puede comprobarse también en la mencionada figura y es que muchos de los hilos conectivos se bifurcan al nivel de la unión de las dos miofibras (aunque también puede acaecer la partición a otro nivel), lo que presta al

estuche perimiofibrilar el aspecto de una red de mallas estrechas.

Todas estas fibras que hemos descrito (salvo las que forman parte del plexo perimiocárdico, cuya naturaleza colágena nos parece indudable), tiñense intensamente con la plata reducida, quedando, en cambio, incoloras con los procederes de Van Gieson y Calleja. Esto, unido a la extrema tenuidad de muchas de ellas, nos hace suponer que están construídas de *reticulina*.

Abona esta opinión la circunstancia de que los cordoncitos conectivos que surgen del plexo perimiocárdico se tiñen con más intensidad a medida que se alejan del mencionado plexo, según enseñan las figuras 1.^a, 2.^a y 3.^a; creemos que esta diferencia de matiz es debida a la progresiva transformación de la *reticulina* en colágena. Cajal (1) cree, asimismo, que son de *reticulina* los finos hilos conectivos que rodean individualmente las fibras musculares.

Al objeto de comprobar si las hebras en cuestión están formadas por *reticulina*, hemos aplicado al corazón de *Helix* las variantes de Del Río-Hortega al método de Achúcarro (2), y nos hemos sorprendido al comprobar que ninguna de ellas acertaba a teñir el fino conectivo perimiofibrilar. Teniendo en cuenta los magníficos resultados que dichas variantes consiguen para teñir la *reticulina* (segunda variante), la materia colágena (tercera variante) y el material elástico (primera variante), concluimos por pensar que la substancia que compone las fibras conectivas

(1) S. R. CAJAL: *Manual de Histología normal y de Técnica micrográfica*, 6.^a ed., Madrid, 1914, p. 459.

(2) P. DEL RÍO-HORTEGA: *Nuevas reglas para la coloración constante de las formaciones conectivas, por el método de Achúcarro*. (Trab. del Labor. de Invest. biol. de la Univers. de Madrid, t. XIV, 1916.)

del corazón del caracol goza de propiedades diferentes de las del conectivo ordinario.

No hay que olvidar que aunque con el primitivo método de Achúcarro hemos logrado teñirlas, los resultados obtenidos son, como decimos al principio, incomparablemente mejores con la aplicación del proceder del nitrato de plata reducido.

*Laboratorio de Histología de la Facultad de Ciencias.
Universidad de Barcelona.*