

P. del Río-Hortega.

COLORACION SELECTIVA DE PIGMEN-
TOS Y PREPIGMENTOS.—*Boletín de la So-
ciedad Española de Historia Natural*, marzo
de 1925.

TRABAJOS DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA
DE LA JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS. Núm. 36.

Coloración selectiva de pigmentos y prepigmentos

por

P. del Río-Hortega.

Entre los procedimientos usados actualmente para teñir los pigmentos y prepigmentos cutáneos, los más frecuentados por histólogos y dermatólogos son los que llevan los nombres de Masson y de Bloch, el primero, basado en el empleo de solución argéntica amoniaca, y el segundo, fundado en la reacción de la dopa-oxidasa. Pero, a juzgar por las ilustraciones que aparecen en los trabajos concernientes a las células de Langerhans y cromoblastos dérmicos, estudiados con ayuda de los métodos citados, las tinciones que con ellos puede obtenerse son marcadamente incompletas. Basta para convencerse de ello hacer una coloración poco esmerada con carbonato argéntico y comparar después las imágenes obtenidas con las reproducidas por Bloch y Masson en sus importantes monografías.

El método de Bloch tiene además la desventaja de necesitar reactivos como la dioxifenilalanina, difíciles de encontrar en el comercio, que han de ser empleados, siguiendo una técnica muy cuidadosa.

Por estas razones, nos parece oportuno ofrecer a los investigadores interesados en estas cuestiones una técnica extraordinariamente fácil, que permite obtener en breve tiempo excelentes impregnaciones de las células de Langerhans, con todas sus expansiones, y de los cromoblastos estrellados del dermis.

Esta técnica no es del todo nueva. Ya en una publicación nuestra, que ha pasado totalmente inadvertida por los dermatólogos¹,

¹ Entre los histólogos especializados en pigmentos, ha tenido mayor fortuna, como puede juzgarse por el trabajo de Verne: «La méthode del Río-Hortega appliquée à l'étude des pigments des crustacés.» *Compt. Rend. Soc. de Biol.*, 1921.

se halla descrita detalladamente ¹. No valdría, pues, la pena de insistir sobre ella, si no hubiésemos logrado mejorarla con algunas modificaciones.

Para la coloración de los cromoblastos tegumentarios, epidérmicos y dérmicos, basta de ordinario la siguiente técnica:

- 1.º Fijación breve en formalina al 10 por 100 (doce a cuarenta y ocho horas).
- 2.º Seccionamiento por congelación (cortes de 15 a 20 micras).
- 3.º Impregnación en la solución amoniacal de carbonato argéntico ², con preferencia al licor de Bielschowsky, diluido, dejándola actuar de uno a dos minutos.
- 4.º Reducción en formalina al 1 por 100, agitando ligeramente a los cortes.
- 5.º Virado en cloruro de oro al 1 por 500 (uno a cinco minutos).
- 6.º Fijación en hiposulfito de sosa al 5 por 100.
- 7.º Coloración complementaria, eventual, con picrofucsina o picroíndigo.

Las células de Langerhans muestran con esta técnica todas sus expansiones teñidas, penetrando por los intersticios de los corpúsculos epidérmicos. Los cromatóforos del dermis ofréncense también coloreados, adivinándose sus expansiones por la orientación en series de los granos pigmentarios.

Lo más importante de este método es su gran electividad por los corpúsculos pigmentarios. Siendo la melanina y el prepigmento de las células de Langerhans más ávidos de plata que las restantes estructuras del tejido, téñense exclusivamente o lo hacen con gran intensidad cuando ni siquiera los núcleos comienzan a esbozarse. La solución argéntica amoniacal, oxidando al prepigmento y a la melanina ya formada, ennegrécelos rápidamente, haciéndolos visibles macroscópicamente en los cortes observados sobre fondo blanco.

Cuando para el estudio se elige una región no demasiado pigmentada, y principalmente la piel de la cara, labio, párpados, gran-

¹ P. del Río-Hortega, «Algunas observaciones sobre los cromoblastos cutáneos.» Mem. de la Soc. de Hist. Nat., vol. del L aniversario, 1920.

² Solución de nitrato de plata al 10 por 100, 5 cm³; solución de carbonato de sosa al 5 por 100, 15 cm³; amoníaco, cantidad suficiente para disolver el precipitado; agua destilada, 55 cm³.

des lablos, surco balano-prepucial, etc., obtiéndose las imágenes perfectas que aparecen copiadas en nuestro trabajo ya citado.

En algunos casos, sin embargo, los resultados son menos favorables, y precisamente para ellos hemos procurado perfeccionar la técnica con ligeras variaciones, obteniendo al fin la ventajosa fórmula siguiente:

- 1.º Fijación uno o varios días en formalina al 10 por 100.
- 2.º Secciones de unas 20 micras, obtenidas por congelación.
- 3.º Inmersión durante cinco a diez minutos en solución de sulfito de sosa al 4-6 por 100, recientemente preparada ¹.
- 4.º Inmersión, sin previo lavado, en la solución ordinaria de carbonato argéntico, dejándola actuar un minuto.
- 5.º Lavado rápido en agua común.
- 6.º Inmersión en alcohol de 95° durante un minuto.
- 7.º Nuevo lavado rápido en agua.
- 8.º Reducción en formalina al 1 por 100.

Aunque no siempre es necesario, porque los cortes quedan grises y muy pálidos, puede hacerse un virado en oro, con fijación subsiguiente en hiposulfito, así como también una coloración complementaria de los núcleos, grasa, tejido conectivo, etc., mediante los colorantes más adecuados.

Tanto las células de Langerhans como los cromatóforos yacentes en el espesor del dermis, muéstranse totalmente coloreados, exhibiendo en las regiones más propicias para su estudio sus abundantes expansiones, que aparecen mucho más numerosas que con otras técnicas.

Siguiendo las reglas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 8 de la técnica descrita, muéstranse bien teñidos los macrófagos, que, por lo demás, revélanse perfectamente en las impregnaciones rapidísimas con carbonato argéntico seguidas de reducción, agitando rápidamente a los cortes, en formalina al 1 por 100 ².

¹ Como la concentración de este reductor puede variar dentro de amplios límites, acostumbramos a poner el volumen de un guisante de sulfito de sosa cristalizado o amorfo en un vasito con 10 cm³ de agua destilada.

² Véase P. del Río-Hortega y F. Jiménez Asúa, «La fagocitosis en los tumores y en otros procesos patológicos». *Archivos de Cardiología y Hematología*, 1921.

Para la demostración de las expansiones protoplásmicas de las células conjuntivas, basta seguir las reglas 1, 2, 3, 4, 6 y 8, que permiten obtener coloraciones muy demostrativas.

Coloración de pigmentos nerviosos y neuróglícos.

La obtención de buenas coloraciones de los diversos pigmentos existentes en el protoplasma de las células nerviosas y neuróglícas, que en parte dan las reacciones de la grasa (lipocromo); en parte toman matices orto o metacromáticos con las anilinas básicas (granulaciones protagonoides de Reich), y en parte muestran apetencias por diversas fórmulas de plata y oro, es relativamente fácil de lograr con los métodos de Bielschowsky y sus numerosas variantes, los de Cajal a la plata reducida, al formol-urano y al oro-sublimado, y los de Achúcarro, con nuestras variantes. La solución amoniaca de carbonato argéntico se ha mostrado también muy favorable para la tinción de ciertas inclusiones celulares de carácter pigmentario y naturaleza desconocida, como lo son la mayor parte de los pigmentos auro y argentófilos.

Pero para la práctica diaria, y sobre todo para el estudio de piezas patológicas, no basta con que eventualmente se obtengan excelentes tinciones de los productos de desecho celular con aspecto pigmentario, sino que se requiere poder disponer de una técnica segura, que pueda practicarse en algunos cortes en que haya de teñirse la neuroglia o las células nerviosas.

Es evidente que el método áurico de Cajal llena en parte dicha necesidad; pero las tinciones son incompletas, excepto en algunos pigmentos neuróglícos. El método del formol-urano ideado por nuestro maestro para la tinción del aparato de Golgi, en lo que se muestra insuperable, revela también con frecuencia los pigmentos neuróglícos; pero la lectura de los preparados precisa gran cuidado, para no interpretar como pigmento los aspectos granulados del aparato de Golgi incompletamente teñido, efectuando deducciones completamente erróneas, tanto más lamentables cuando a base de ellas se pretenda señalar las perturbaciones de la neuroglia en diferentes pruebas fisiológicas con fármacos o productos opoterápicos (pilocarpina, atropina, adrenalina, tiroidina, etc.).

Para obviar los inconvenientes anotados, y ya que reciente-

mente ¹ hemos dado a conocer una técnica para la tinción selectiva de los gliosomas, vamos a copiar la fórmula que desde hace algún tiempo venimos utilizando para los estudios de histopatología nerviosa, que es igualmente aplicable a los tejidos normales.

Consiste, como la técnica precedente, en el empleo del sulfito de sosa como sensibilizador de la impregnación argéntica.

1.º Fijación por tiempo ilimitado en formol o formol-bromurado de Cajal (formalina, 10; bromuro amónico, 2; agua, 100).

2.º Hiperbromuración, calentando las piezas en formol-bromuro diez minutos a 45-50º.

3.º Cortes por congelación.

4.º Lavado en agua fuertemente amoniacal.

5.º Inmersión de los cortes en sulfito de sosa al 5 a 10 por 100 durante algunos minutos.

6.º Inmersión, sin previo lavado, en solución de carbonato argéntico con tres gotas de piridina en 10 cm³, calentando a unos 50º, hasta coloración tabaco de los cortes.

7.º Lavado en agua (medio a un minuto).

8.º Lavado en alcohol de 95º (medio minuto).

9.º Reducción en formalina al 1 por 100.

10. Virado en cloruro de oro, reforzando ligeramente la coloración al calor.

11. Fijación en hiposulfito de sosa.

Tanto en las células nerviosas como en las neuróglías y microgliales, aparecen los pigmentos característicos del estado normal y los que se presentan en casos patológicos con profunda desintegración molecular del tejido. La tinción suave del soma neuronal y la muy delicada de las expansiones neuróglías permite apreciar exactamente la situación de las inclusiones pigmentarias, que en gran parte de los casos parecen más bien incrustaciones marginales del cuerpo y de las prolongaciones protoplásmicas.

¹ P. del Río-Hortega, «Condrioma y granulaciones específicas de las células neuróglías.» BOL. DE LA SOC. ESP. DE HIST. NAT., enero 1925.