

INSTITUTO  
CAJAL  
Cajal  
Despacho  
(R. 9002)

MÉTODOS  
DE  
COLORACIÓN DE LAS NEOPLASIAS

por el Profesor

Dr. S. RAMÓN y CAJAL

DE LA UNIVERSIDAD DE MADRID



(Extraído de la *Revista de Ciencias Médicas de Barcelona*,  
núm. del 10 de Marzo de 1896.)

—\*—



**T**odo el que haya consultado los libros modernos de técnica anatomo-patológica, habrá notado la falta casi total de indicaciones especiales en lo referente á la coloración de los cortes de neoplasias. Se exponen, es cierto, los métodos generales de teñir las secciones finas de tumores y de granulomas infecciosos; pero no se determina cuál de ellos es el más ventajoso para tal ó cual neoplasia. Además, ciertos métodos modernos, sumamente valiosos, el de Gieson por ejemplo, no figuran todavía en los libros de técnica histológica.

En el actual trabajo, vamos á llenar este vacío, dando á los aficionados á los trabajos de anatomía patológica indicaciones precisas acerca de los procederes más ventajosos para la coloración de los tumores, incluyendo de pasada algunos métodos todavía inéditos, que nosotros usamos de preferencia en el análisis del epiteloma y carcinoma. Prescindiremos como es consiguiente de las preparaciones clásicas al carmín, hematoxilina, eosina, etc., puesto que en todas las obras de técnica figuran y todo el mundo las conoce.

*Método de van Gieson.* Este es uno de los mejores métodos de teñido introducidos en estos últimos años en la técnica de neoplasias. He aquí el *modus operandi*:

1.—Cortes de tumores indurados en sublimado, líquido de Flemming ó alcohol, se dejan desde cinco minutos á media hora en una solución de hematoxilina madura (fórmula de Dielafeld, Böhmer, etc.)

2.—Lavado rápido en agua.

3.—Los cortes se abandonan por dos á cuatro minutos en una solución saturada de ácido pícrico que contenga algunas gotas de solución saturada de fuchina ácida (para un pocillo de porcelana de mediano tamaño se ponen dos ó tres gotas de la solución de fuchina).

En este líquido, que debe tener un color naranja vivo, el exceso de hematoxilina se disuelve y los cortes adquieren un color marrón oscuro.

4.—Lavado rápido en agua.

5.—Deshidratación en alcohol de 40° ó absoluto. Aclaramiento en esencia de clavos ó de bergamota. Montaje en bálsamo.

Este método, preconizado primeramente por van Gieson para el sistema nervioso, ha sido aconsejado por Ernst (1) para ciertas neoplasias con degeneraciones

---

(1) Ernst. Ueber Beziehungen des Hämatoxylin's zum Hyalin, *Virchow's Arch.* Bd. 130.

hialinas y por Kahliden (1) para todos los tumores que contengan asociadas masas epiteliales y trama conjuntiva. En efecto; los fascículos conjuntivos destacan en rojo puro é intenso; los epitelios adquieren un tono amarillento ó violado amarillento; los núcleos aparecen violados ó violados azulados; y las masas de keratina antiguas se muestran de color anaranjado intenso.

Dos inconvenientes tiene este bello método: 1.º, que es preciso, para que los núcleos queden bien teñidos, usar una hematoxilina madura, dotada de gran selección por los núcleos, lo que no siempre es posible; 2.º, que la intervención del ácido pícrico, del cual quedan más ó menos impregnados los cortes, acaba por hacer palidecer la hematoxilina de los núcleos, resistiendo solamente la coloración roja del tejido conjuntivo y la amarillenta de los epitelios.

Por estos inconvenientes, y después de varias tentativas con varias hematoxilinas, nosotros preferimos actualmente usar como coloración nuclear el método de la hematoxilina de Martín Heidenhain (2) combinado al de la picro-fuchina. He aquí la marcha de las operaciones:

1.— Los cortes, procedentes de piezas induradas en alcohol ó sublimado, se abandonan por media hora en la siguiente solución mordiente de Heidenhain:

Alumbre de hierro. . . . .	2
Agua. . . . .	100

2.— Lavado rapidísimo de los cortes en agua para quitar el exceso de mordiente.

3.— Inmersión de los cortes por una hora ó más en una solución acuosa saturada de hematoxilina pura. En este líquido adquieren un color violado-negro que se acentúa progresivamente.

4.— Decoloración de los cortes en un exceso de mordiente, es decir, en la misma solución mencionada de alumbre de hierro, hasta que tomen una tinta gris más ó menos transparente, lo que se logra en dos á cuatro minutos. Procúrese no sobrepasar la decoloración, á fin de evitar que los núcleos palidezcan demasiado.

5.— Lavado en agua.

6.— Inmersión por dos á cinco minutos en la solución pícrico-fuchínica del método de Gieson.

7.— Deshidratación en alcohol, aclaramiento en esencia de clavos, y montaje en bálsamo ó damar.

Las coloraciones obtenidas por este método, además de ser fáciles y constantes, tienen una gran solidez; pues la laca negra ó gris azulada que forma la hematoxilina con el hierro no es atacada por el ácido pícrico ni por ningún líquido deshidratante ó aclarador. Los núcleos se muestran teñidos en negro azulado intenso, percibiéndose claramente la red cromática y las figuras mitóticas; los protoplasmas epiteliales adquieren un tono moreno amarillento; las masas de kera-

(1) Kahliden. Ueber die van Gieson'sche Färbung. *Centralbl. f. allgem. Patholog.* Bd. IV. 1893.

(2) Este método de coloración con la hematoxilina asociada al alumbre de hierro ha sido propuesto por M. Heidenhain para la revelación de los centrosomas de las células. Véase: M. Heidenhain: Neue Untersuchungen über die Central-Körper und ihre Beziehungen zum Kern und Zellenprotoplasma. *Arch. f. mik. Anat.* Bd. 43. 1894.

tina se presentan rojas con matices más ó menos moreno-anaranjados, y los fascículos conectivos exhiben un color rojo vivo.

En fin es éste un método cómodo, de gran solidez, que aconsejamos especialmente para el estudio del epiteloma, carcinoma, sarcoma, fibrocistoma, etc. En el sarcoma, se acusan perfectamente hacecillos conectivos completamente invisibles por otros métodos, y la coloración de los núcleos nada deja que desear.

Dentro de algunas células gigantes, adviértense, teñidas en negro puro, ciertas inclusiones protoplásmicas de forma esférica, homogéneas, que ciertos autores (Sanfelice, Corselli y Frisco, Roncali, etc.) han creído poder identificar con los *blastomicetos* hallados en determinados tumores infecciosos. Si la decoloración de la laca negra de hematoxilina es insuficiente, hasta los microbios quedan impregnados de negro ó de gris obscuro; tal hemos confirmado en un sarcoma cuyas células gigantes, con aspecto de mieloplaxias, presentaban grandes vacuolas llenas de larguísimos y gruesos bacilos, quizás de naturaleza saprofita.

*Método de triple coloración con el azul de metileno en combinación con la picrofuchina.* Este método, que nosotros usamos á menudo, da á los epitelios hermosos tonos verdes que contrastan notablemente con el rojo vivo que adquiere el tejido conectivo. He aquí la marcha de las operaciones:

1.— Los cortes se abandonan, de dos á cinco minutos, en una solución débil de azul de metileno B B. (0'1 de azul y 200 de agua.)

2.— Se lavan perfectamente en agua hasta que no suelten ningún color. Un lavado imperfecto produciría en el baño siguiente precipitaciones irregulares.

3.— Los cortes se dejan, de diez minutos á media hora, en este baño de picrofuchina:

Fuchina ácida . . . . .	0'1
Agua saturada de ácido pícrico . . . . .	100 g

4.— Lavado rápido en agua.

5.— Decoloración en alcohol absoluto y aclaramiento en xilol ó bergamota. Si, bajo el examen microscópico, notáramos los protoplasmas celulares teñidos de azul ó violado obscuro, se colocarán los cortes, por pocos segundos, en esencia de clavos, que arrebatará el exceso de color y dará instantáneamente al protoplasma epitelial un hermoso color verde claro. Los cortes deben volver inmediatamente al xilol ó bergamota y se montarán en bálsamo ó damar disueltos en xilol.

En este método, los epitelios adquieren un hermoso verde botella; los núcleos se tiñen de verde azulado intenso, y el tejido conectivo toma un tono rojo vivísimo, que permite reconocer los fascículos con extraordinaria facilidad. El estroma del carcinoma y epiteloma revela claramente dos clases de haces conectivos: unos que se tiñen pálidamente (fascículos jóvenes); otros que se impregnan de rojo obscuro (fascículos adultos). Los músculos de fibra lisa y glándulas toman una tinta verde característica.

En el cancroide las masas epiteliales jóvenes se coloran en verde obscuro; las que comienzan á keratinizarse toman color verde claro ó amarillo puro; y los globos antiguos se presentan, ora anaranjados, ora de azul turquí. Finalmente, los fascículos musculares exhiben un color amarillo ó amarillo verdoso.

En suma; este método es, por la variedad de matices que da á los diversos tejidos, un recurso excelente para casi todas las neoplasias, pero muy particularmente para el cancroide.

*Método de triple coloración con la fuchina ó magenta, el ácido picrico y el carmín de índigo.*

1.— Los cortes se sumergen, durante 5 á 10 minutos, en una solución saturada ó muy concentrada de rojo magenta (fuchina roja ordinaria).

2.— Lavado rápido en agua abundante para arrastrar el exceso de color.

3.— Coloración por 5 á 10 minutos en la siguiente solución: agua saturada de ácido picrico, 100; carmín de índigo, 0'25.

4.— Lavado rápido en agua acética (en un pocillo de porcelana lleno de agua se echan dos ó tres gotas de ácido acético).

5.— Decoloración en alcohol absoluto, hasta que los cortes hayan desprendido el exceso de magenta, lo que se conocerá en el color violado general adquirido por aquéllos.

6.— Aclaramiento en xilol ó bergamota.

7.— Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Es éste sin disputa el método más bello que se conoce para teñir todos los tumores que contienen epitelios y trama conectiva. Los núcleos aparecen impregnados enérgicamente en rojo vivo; los protoplasmas exhiben una tinta verde clara ó rosácea-amarillenta; y los haces conjuntivos se presentan de azul puro intensísimo. En los epitelomas con globos, las masas de keratina recientes adquieren color verde, mientras que las más antiguas, es decir, las constitutivas de los focos mismos de los globos, conservan una tinta rojo rubí. Tiene además este método la ventaja de la facilidad y rapidez de ejecución, así como la perfecta conservación de las preparaciones. Añadamos aun, que el rojo magenta se fija en muchos microbios, impregna intensamente los *corpúsculos fuchinofilos* de Russel, y presta, en combinación con el índigo, espléndidas y variadas tintas al tejido cartilaginoso. Decolorando poco en alcohol, la trama azulada del estroma del carcinoma mostrará también en rosa fuerte las fibras de *elastina* (elastina alterada, dotada de acidez para las anilinas básicas) mencionadas por Unna (1) en algunas lesiones de la piel.

Pueden hacerse otras combinaciones sobre la base de la coloración de la mezcla picro-índigo-carminosa. Así, en vez del magenta cabe usar la safranina, con la cual obtendremos coloraciones rojas matizadas de los condromas y de los epitelomas pavimentosos, pues la safranina tiñe en variedad de tintas tanto la keratina como la materia fundamental cartilaginosa. Este reactivo impregna además en rojo los granos de las células cebadas de Ehrlich.

También podremos sustituir la safranina ó fuchina por la vesubina (pardo Bismark) con cuyo color se obtienen bellos teñidos, en los cuales los epitelios contrastan, por su tinta pardo-amarillenta, del tono azulado-verdoso de la trama conectiva. Una pequeñísima cantidad de Bordeaux R (color caoba) adicionada al baño de vesubina, servirá para teñir en pardo rojizo el protoplasma epitelial.

*Método de la tionina.* — Recientemente ha preconizado von Lenhossek (2), para la coloración, por el método de Nissl, de los husos cromáticos del protoplasma nervioso, la *tionina*, materia colorante azul, que posee la propiedad de descomponerse en tintas variadas en presencia de diversas sustancias amorfas é inclusiones

(1) Unna: Elastin und Elacin. *Monatsh. f. prakt. Dermat.* Bd. XIX. 1894.

(2) Von Lenhossek. *Der feinere Bau des Nervensystems*, &. — 2. Aufl. 1895.

celulares. Tiene este reactivo además la virtud, ya mencionada por Jadassohn (1) y Marschalkó (2), de impregnar en un hermoso rojo heliotropo los granos basiófilos de las células cebadas de Ehrlich (las *Mastzellen* de este autor), corpúsculos abundantísimos en el estroma de los tumores. Pero la ventaja más valiosa de este reactivo es la gran facilidad con que se obtienen espléndidas coloraciones de la cromatina nuclear y figuras mitóticas, cualquiera que sea el líquido fijador utilizado; por lo cual, apelaremos á la tionina siempre que deseemos hacer un buen estudio de los núcleos de las neoplasias. He aquí el *modus operandi*:

1. — Cortes procedentes de tumores, indurados de preferencia en sublimado ó alcohol, se someterán, por dos ó más minutos, á la acción de una solución acuosa concentrada de tionina.

2. — Lavado rápido en agua.

3. — Decoloración en alcohol hasta que los cortes tomen un matiz azul claro ó violado-azulenco.

4. — Aclaramiento en xilol ó bergamota y montaje en bálsamo disuelto en xilol. Si procedemos rápidamente, podremos también aclarar en esencia de clavos.

En general, las coloraciones de fondo no pueden hacerse sin riesgo de decolorar con exceso; no obstante, se logrará una impregnación rosa del tejido conectivo, si en vez de aclarar con xilol, lo hacemos con esencia de clavos que tenga en disolución un poco de eosina. Un lavado rápido en esencia de clavos incolora y la traslación inmediata al xilol ó á la bergamota, quitarán el sobrante de eosina, y terminarán la preparación. Este modo de empleo de las coloraciones de fondo tiene la doble ventaja de quitar fuerza decolorante á la esencia de clavos y de sobreañadir, sin daño del color principal, un matiz nuevo á todo lo no impregnado.

El método de la tionina es excelente, aun sin coloración de fondo, para preparar el cancroide, carcinoma, fibroma, mixoma y condroma, gracias á la variedad de tintas en que este reactivo se descompone. Así, en el cancroide, tiñe los núcleos de azul intenso, los nucleolos de azul violado, los granos basiófilos de las células de Ehrlich de rojo heliotropo, de azul claro los protoplasmas epiteliales y tejido muscular, y de azul turquí casi negro las partes centrales de los globos y toda la keratina antigua.

En el condroma, aparte la espléndida coloración azul de los núcleos, la tionina impregna la materia fundamental de varios matices: las cápsulas recientes aparecen rojas ó rojo-violadas; la materia fundamental relativamente nueva exhibe una tinta azul violada; y la más antigua se presenta incolora ó teñida de un azul verdoso pálido.

En el mixoma, la materia fundamental no se tiñe; pero, en cambio, los elementos conjuntivos estrellados toman una tinta azulada intensa, lo que permite perseguir las expansiones protoplásmicas durante un gran trecho; los leucocitos mononucleados muy abundantes en este tumor, muestran también un protoplasma intensamente colorado en violado ó azul; y finalmente los corpúsculos de Ehrlich, diseminados por la materia fundamental, adquieren un hermoso rojo

(1) *Jadassohn*: (Verhandt. d. deutsch. Dermat. Gessellsch. III. Congr. 1892.)

(2) *Marschalkó*: Ueber die sogenannten Plasmazellen, &c. — *Arch. f. Dermatol. u. Syphil.* Bd. XXX. 1895.

heliotropo. En torno de ellos, el tejido conectivo muestra un limbo rosáceo espeso, vagamente limitado hacia afuera (*atmósfera secretoria*), disposición que parece demostrar que las granulaciones basiófilas se disuelven en los plasmas interorgánicos.

En el carcinoma, la tionina revela distintamente en el estroma, además de las células conjuntivas y de los leucocitos polinucleados, dos clases de corpúsculos: los ya citados de Ehrlich, y ciertos elementos esferoidales de núcleo esférico y excéntrico y de protoplasma vacuolado y coloreado en azul intenso. Estos últimos corpúsculos, que abundan también en el epiteloma, acaso correspondan á los leucocitos mononucleados de la sangre, los cuales, en presencia de la trama conectiva ó de las secreciones epiteliales, sufrirían una degeneración vacuoliforme.

En suma; el método de coloración con la tionina será preferido para el estudio del modo de repartición en las neoplasias de las células emigrantes, y singularmente de los corpúsculos de Ehrlich; así como para reconocer fácilmente las diversas especies de materias amorfas que se observan en el condroma, el mixoma y ciertos procesos degenerativos (amilosis, degeneración hialina, coloidea, etc.).

Por lo que se refiere á las células de Ehrlich, es este el método más eficaz que se conoce para ponerlas en evidencia. Como han demostrado Unna y otros autores, dichos corpúsculos abundan en las dermatosis y muchas flegmasias infecciosas (nódulos tuberculosos, muermosos, abscesos, etc.) y la tionina permite demostrarlas en casi todas las neoplasias, excepción hecha del sarcoma puro y de alguna modalidad carcinomatosa. Observándolas cuidadosamente en los tumores epiteliales, se confirma en ellas la existencia de dos estados fisiológicos: uno de secreción, durante el cual el protoplasma de dichos corpúsculos se presenta esferoidal y repleto de gruesas esferas basiófilas; y otro de excreción, en virtud del cual los granos disminuyen en tamaño y número, disolviéndose en los plasmas interorgánicos. En esta fase el protoplasma aparece deformado, y en curso de emigración, llegando á veces en sus excursiones á inmiscuirse en los mismos nidos epiteliales.

Imposible adoptar una opinión suficientemente fundada sobre el significado que puede tener la presentación de los corpúsculos de Ehrlich en las neoplasias de gran pujanza vegetativa. Empero, la circunstancia de carecer tales elementos de virtud fagocitaria, y el hecho de invadir ya el espesor de los epitelios cuyas células impregnan con secreciones basiófilas, ya el centro de los granulomas infecciosos donde disuelven sus granulaciones, permiten conjeturar que semejantes corpúsculos tienen por oficio elaborar algún principio capaz de minorar ó de suspender la vegetación de epitelios y parásitos. Defensa orgánica casi siempre ineficaz en el carcinoma y epiteloma, pero no por eso menos importante, pues viene á demostrar que el organismo siente la inminencia del peligro en frente de la invasión de las masas epiteliales, y se apercibe á defenderse poniendo en juego los únicos medios de que dispone: la acción bactericida de los corpúsculos emigrantes, y la influencia quizás inhibitoria de las células de Ehrlich.

Madrid, 25 de Febrero de 1895.