

Coloración para nervios, fibras elásticas y grasa *

Dra. Artemia Fuentes **

Palabra clave: Técnica histológica.

RESUMEN BREVE

Se expone un método de coloración en base a la hematoxilina férrica y a la fucsina básica.

La primera etapa se caracteriza por la gran permanencia de los cortes en mordiente, colorante y agua.

En la segunda etapa se prescinde del mordiente y este pasa a ser usado como diferenciador de la fucsina.

Con la fijación y el montaje corriente se puede observar conjuntamente grasa, nervios, fibras elásticas, además de la mayor parte de las estructuras histológicas.

INTRODUCCION

Muchas son las estructuras coloreadas con hematoxilina férrica.

* Trabajo realizado en la Cátedra de Histología de la Facultad de Odontología.

** Catedrática de Histología General e Histología y Embriología Buco-Dental.

Recibido para publicar agosto 1980.

Desde que fue utilizada por Heidenhain^(8,9) ha permitido colorear diversos elementos tisulares variando concentración y tiempo de exposición de mordiente y colorante.

Fue empleada hasta como método progresivo en cultivo de tejidos. Malinin, G.⁽¹³⁾.

También la fucsina ha sido muy usada, especialmente por Gallego⁽⁶⁾.

Por la fucsina aldehído se colorean grasa y fibras elásticas. Gomori⁽⁷⁾.

Con orceína, azul de anilina y orange G, elástico y queratina. Margolena L. y Dolnic E.⁽¹⁴⁾.

Distintos autores utilizando uno y otro de los colorantes mencionados han conseguido teñir una u otra de las estructuras que se visualizan por la técnica aquí empleada.

Con fucsina aldehído y oil red O, grasa y fibras elásticas. Kwaan H.C. y Hopkins R.S.⁽¹¹⁾

Los mismos elementos son coloreados en base a la orceína. Mc. Kinney, B. et al.⁽¹⁵⁾

Por la fucsina aldehído y el azul de toluidina, fibras elásticas y gránulos glandulares. Kallman, I.⁽¹⁰⁾

Nosotros hemos utilizado la hematoxilina férrica y la fucsina básica en diferentes investigaciones.

A la primera la sometimos a trucos técnicos y nos permitió detectar fibras nerviosas en la dentina, Stella, A. y Fuentes, A.⁽¹⁹⁾ en el cemento dentario, Fuentes, A.⁽⁴⁾ y junto al límite amelo dentinario, Fuentes, A.⁽⁵⁾.

Modificamos el clásico método de Gallego para fibras elásticas.

Esto nos permitió observar tales fibras en tejidos calcificados y estudiarlas en paradero animal, Fuentes, A. y Mario, A.M.⁽²⁾ y en paradero humano; Fuentes, A.⁽³⁾.

El trabajo actualmente presentado involucra la hematoxilina férrica y la fucsina de Ziehl.

El método así obtenido, permite poner de manifiesto gran número de estructuras.

Resulta de interés para la tención de nervios, fibras elásticas y grasa simultáneamente.

MATERIAL Y METODOS

- I) Fijación: Formol 10%. (1)
- II) Cortes por congelación recogidos en agua destilada.
- III) Los cortes pasan al alumbre de hierro al 5%. (2)
- IV) Pasaje rápido por agua destilada.

- V) Coloración en hematoxilina férrica de Heidenhain. 4 días. (3)
- VI) Lavado en agua renovada, 25 minutos.
- VII) Diferenciación en alumbre de hierro al 5%. (4)
- VIII) Lavado en agua destilada. 2da. etapa. (5)
- IX) Colocación de los cortes en 10 c.c. de agua corriente con 10 gotas de fucsina de Ziehl. (6)
- X) Diferenciación en la solución integrada por: (7)
Agua corriente. 10 c.c.
Formol neutro. 4 gotas.
Percloruro de hierro. 2 gotas.
Acido nítrico. 2 gotas.
- XI) Lavado en agua corriente.
- XII) Molibdato de amonio. (8)
- XIII) Lavado en agua destilada.
- XIV) Secado rápido del corte con papel absorbente, sobre el porta-objeto. (9)
- XV) Alcohol absoluto, xilol, bálsamo del Canadá.

Aclaraciones para los siguientes numerales:

- (1) Pueden ser usadas piezas con mucho tiempo de fijación.
- (2) La solución de alumbre de hierro conviene hacerse con cristales violetas, tal como lo señala Romeis⁽¹⁷⁾. Debe ser nueva, a lo sumo tres semanas y permaneciendo en heladera.
- (3) La hematoxilina férrica se diluye por mitad con agua destilada al momento de usarse.
- (4) La diferenciación conviene controlarla al microscopio, hasta que se destaquen con precisión las fibras

nerviosas. Para evitar excederse, se pueden realizar soluciones mas diluídas, de modo que la diferenciación se realice con mayor lentitud.

(5) La segunda etapa, para obtener especialmente las fibras elásticas, se realiza con algunas variaciones al proceder de Gallego. (6)

En la técnica que se presenta, se usa agua corriente, formol neutro y se prescinde del ácido acético. Además se hace actuar primero el colorante y después el virofijador.

(6) Los cortes en la tucsina deben tener un tono rojo intenso, generalmente se logra en 10 minutos.

(7) En la solución diferenciadora, los cortes se vuelven violáceos. Conviene controlar al microscopio la perfecta diferenciación de las fibras elásticas.

(8) Puede prescindirse del moblidato de amonio, pero se le quita estabilidad a las preparaciones.

(9) El secado del corte histológico) con papel absorbente, hace innecesario el pasaje por alcoholes de menor graduación. Se excluye así toda el agua y la permanencia prolongada en alcohol absoluto. Se evita de este modo la dilución parcial de la grasa. Compárese las figuras 2 y 10.

RESULTADOS

Por la técnica de coloración expuesta se obtienen coloraciones estables, que ponen de manifiesto los elementos o estructuras que se detallan a continuación:

Nervios y células adiposas se colorean en azul negruzco, y en negro si

hay elementos superpuestos. Fig. 1, 2, 3, 4 y 5.

Fibras elásticas en fucsia, mas destacable cuanto mayor espesor tenga la fibra. Fig. 3, 4, 5, 6, 9 y 10.

Glóbulos rojos, queratina, granulaciones de mastocitos: negro. Figs. 3, 4, 6, 7, 8 y 9.

Epitelio: rosado intenso o rojizo. Figs. 4, 6, 7, 8 y 9.

Cartilago: rosado. Fig. 10.

Hueso y dentina en formación: marrón grisáceo. Fig. 11, 3.

Esmalte en formación: púrpura. Fig. 11.

Fibra muscular: rosados claros y oscuros. Más intensa la estriación transversal y los núcleos. Figs. 2, 3, 4 y 12.

En embriones hay variaciones de la apetencia tintorial de algunos tejidos, así el cartilago y el músculo pueden presentarse negruzcos.

DISCUSION

Ruddell (18) trata cortes por parafina con fucsina básica y azul de anilina. Obtiene la tinción del tejido elástico y fibras nerviosas mielínicas. No determina coloración de grasas.

Aparicio y Marsden (1) con fucsina básica y azul de metileno, obtiene un método eficaz para fibras nerviosas periféricas, obteniendo la coloración simultánea de otras estructuras,

entre ellas elástico. No menciona coloración de grasa.

La coloración específica por esta sustancia, como con los sudanos, ácido ósmico, etc. exigen fijación y montaje especiales.

Millot y Gibertih⁽¹⁶⁾, citados por Langeron⁽¹²⁾ consideran que el formol fija mal las grasas.

Gallego⁽⁶⁾ especifica que si junto a las fibras elásticas se quiere colorear grasa, se puede comenzar por teñir previamente esta sustancia con el Sudan III o el rojo escarlata, realizando después la coloración para elástico con la fucsina. Pero para ello se precisa además montar los preparados histológicos en vehículos apropiados.

Con la técnica presentada por la autora, se utiliza el formol como fijador, no se requiere usar un colorante específico para teñir grasa, se usa el montaje habitual y aún más simplificado.

RESUMEN

El método de coloración expuesto, permite una tinción estable de la mayor parte de las estructuras histológicas. Es conveniente cuando se desea estudiar especialmente nervios, fibras lásticas y grasas conjuntamente.

El material es fijado con formol al 1% y cortado por congelación.

Los colorantes utilizados son la hematoxilina férrica y la fucsina básica Ziehl.

La primera se usa después de un mordensaje prolongado en alumbre de hierro al 5%. La acción de la hematoxilina no debe ser de menos de 3 días.

La diferenciación conviene extenderla hasta individualizar cada tipo de fibra nerviosa con su morfología correspondiente.

Los lavados en agua deben ser prolongados.

La fucsina de Ziehl usada posteriormente no exige mordenzaje previo.

El tono rojo intenso de los cortes se produce a los pocos minutos. Es virado al violeta por el diferenciador de Gallego, pero prescindiendo del ácido acético.

El montaje se realiza en la forma habitual, salvo el empleo de papel absorbente, y el uso de un solo alcohol, el absoluto.

Con tal proceder se destacan: fibras nerviosas y grasa en azul negro; fibras elásticas en fucsia; músculo en rosado con su estriación en tono más fuerte, glóbulos rojos y queratina en negro, esmalte dentario inmaduro en púrpura, etc. No se requiere un colorante específico para teñir grasa. Se usa el montaje habitual, y aún mas simplificado.

SUMMARY

The staining method presented permits a stable tinction of most histologic structures. It is appropriate spe-

cially for the study of nerves, elastic fibers and fat at the same time.

The material is fixed with 10% formaline and frozen sectioned.

Stains used are iron hematoxylin and Zichl's basic fuchsin.

The former is used after prologed mordancy in 5% iron alum. Hematoxylin must act at least for 3 days.

It is better to extend differentiation until individualizing every kind of nerve fibers, with its corresponding morphology.

Water washing must be prolonged.

Zichl's fuchsin used later does not require previous mordancy.

The sections intense red color occurs within a few minutes and is turned to violet by Gallego's differentiator, but acetic acid is not used.

Mounting is performed as usual except for the use of absorbent paper and of only absolute alcohol.

Thus, the following structures show up: nerve fibers and fat in dark blue; elastic fibers in fuchsin; muscle in rose with its striation of a more intense shade red cells and keratin in black; develop tooth enamel in purple, etc. A specific stain for fat is not required. Usual and even more simplified mountaing is used.

BIBLIOGRAFIA

1. APARICIO Y MERSDEN: A rapid methylene blue basic fuchsin stain for semi sections of peripheral nerve and other tissues. *J. Micr.* 89 (1) : 139-141, 1969. *Excerpt Medica.* 24 (1) : 1970.
2. FUENTES, A. y NARIO, A.M.: Fibras elásticas en el paradencio. *Anal. Fac. Odont. Montevideo.* (2) : 139-157, 1955.
3. FUENTES, A.: Distribución y sistematización fibrilar periodontal. *Tejido conjuntivo.* Montevideo. 1968, p178-190.
4. FUENTES, A.: Fibras nerviosas en el cemento. *Rev. Odont. Montevideo.* 25 (1): 512-519, 1970
5. FUENTES, A.: Inervación de los tejidos calcificados del diente. *Congreso C.O.A. B.U.* Buenos Aires. 1973.
6. GALLEGO, A.: La fucsina básica y el formol en técnica histológica: Nuevos métodos de coloración de los tejidos y especialmente de las fibras elásticas. *Trabajo del Laboratorio de Investigaciones Biológicas Tomo XVII.* p.95-110, 1919.
7. GOMORI, G.: Aldehyde- Fuchsin. A new stain for elastic tissue. *Amer. J. Clin. Path.* (20) 665-666, 1950. (Cit. Kwaan, H.C. y Hopkins, R.S.)
8. HEIDENHAIN, M.: Noch einmal über die Zentralkörper durch, Eisenhämatoxylin-färben. *Z.W.M. Bd* 13, 186-199, 1896.
9. HEIDENHAIN, M.: 25 Jahre Eisenhämatoxylin. *Z.W.M. Bd.* 33, 225-231, 1916.
10. KALLMAN, J.: Aldehyde-fuchsin followed toluidine blue for pancreatic islets cells. *Stain Techn.* 464 (210) 71, 1971.
11. KWAAN, H.C. y HOPKINS, R.S.: Combined staining of fat and elastic tissue. *Stain Techn.* 39 (2): 123-125, 1964.
12. LANGERON, M.: Précis de microscopie/Paris/Masson, 1942.
13. MALININ, G.I.: A rapid tissue-culture stain based on Heidenhain's iron hematoxylin but requiring no differentiation. *Stain Techn.* 41 (3) : 193-194, 1966.
14. MARGOLENA, L. y DOLNIC, E.: A differential staining method for elastic fibers, collagen and keratin. *Stain Techn.* 26 (2): 119-121, 1951.
15. McKINNEY, B. et al.: An orcein oil red O Stain for concomitant demonstration of elastic tissue and lipid. *Stain Techn.* 42 (5) : 245-248, 1967.
16. MILLOT ET GIBERTIN: *C R Soc. Biol. (Paris)* X C VII. p.1674, 1927. (Cit. Langeron)
17. ROMEIS, B.: Guía formulario de técnica histológica. Traducción 11a. ed. Barcelona, Labor, 1928.

18. RUDDELL, C.L.: A general stain based in Gallego's method for connective tissue. Stain Techn. 4 (4) : 249-250, 1966.
19. STELLA, A. y FUENTES, A.: Inervación dentinaria intracanalicular; su demostración por el método de la Hematoxilina Férrica de Heindenhain. Anal. Fac. Odont. Montevideo (10) Supl.: 157-206, 1961-62.

Traducción del resumen al inglés: Dr. Mario Patriitti

Fotografía: Dr. pablo Rosini.

Fig. 1 - Región gingival. Nervio en el que se destacan sus fibras mielínicas con sus estrangulamientos de Ranier, en claro.

Fig. 2 - Lengua. Músculo estriado (M) rodeado por fibras nerviosas (N). Se destacan células adiposas (CA).

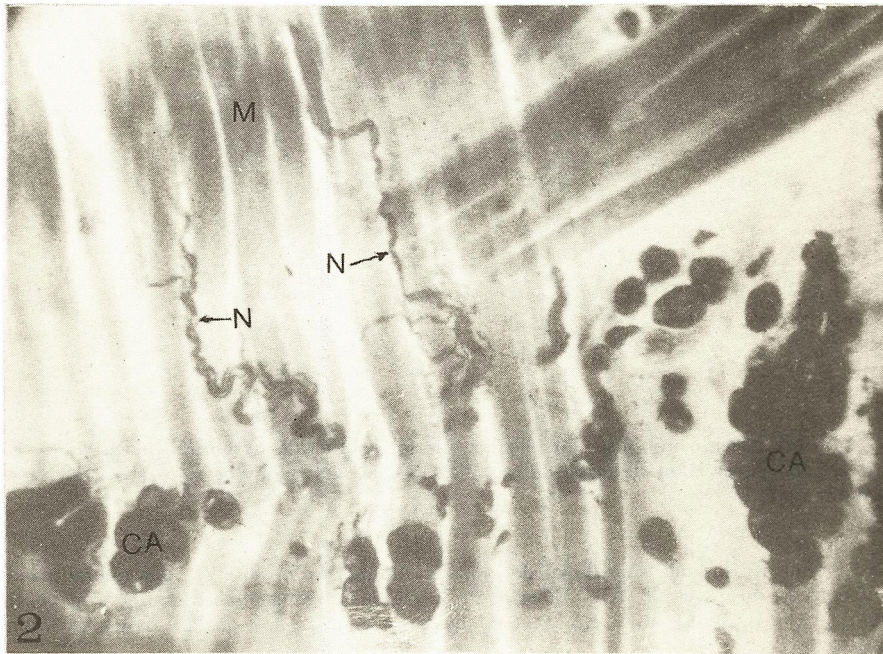


Fig. 3 - Paquete vásculo nervioso del maxilar inferior. Cortes de nervio (N) u vasos (V). En la pared arterial se señalan delicadas fibras elásticas. Se ven glóbulos rojos (R) y el hueso exteriormente (H).

Fig. 4 - Lengua. En la zona superficial del epitelio, lingual, se observa la zona queratinizada (K) y un corpúsculo gustativo. (CG). Dentro de la papila fungiforme se distribuye un nervio (N). Por debajo músculo. (M). En el conjuntivo subpapilar se señalan delicadas fibras elásticas.

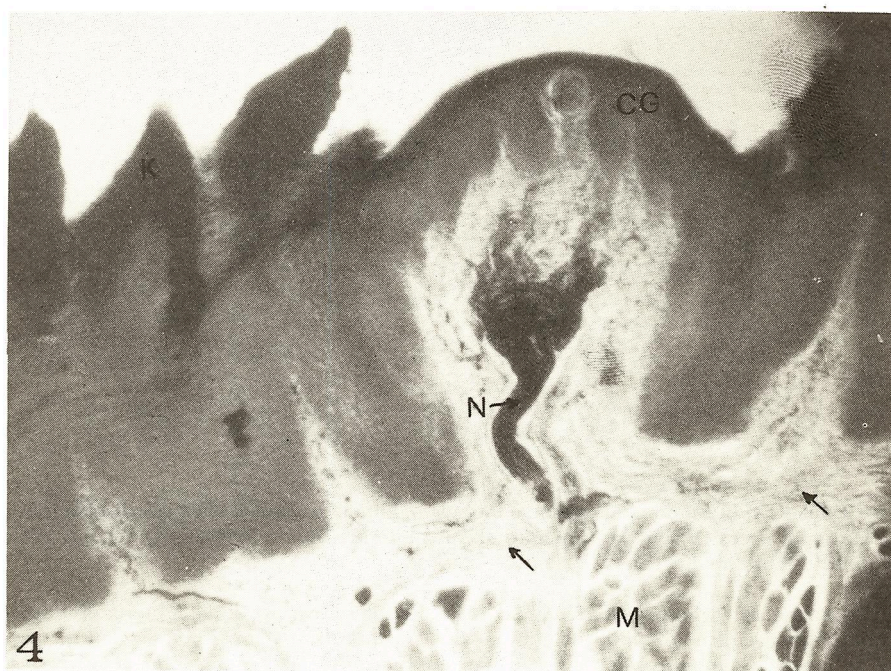


Fig. 5 - Encía. En el tejido conjuntivo se destacan abundantes fibras elásticas distribuidas en todo el campo; vasos (V) con su limitante elástica interna, fibra nerviosas (N) con sus cisuras de Schmidth-Lantermann (S).

Fig. 6 - Lengua. Epitelio espeso donde se destaca la queratina (K) de la cubierta epitelial de la papila filiforme. En el tejido conjuntivo de la papila se hallan capilares dentro de los cuales se localizan glóbulos rojos (R). En el conjuntivo subpapilar se ven fibras elásticas. (E).

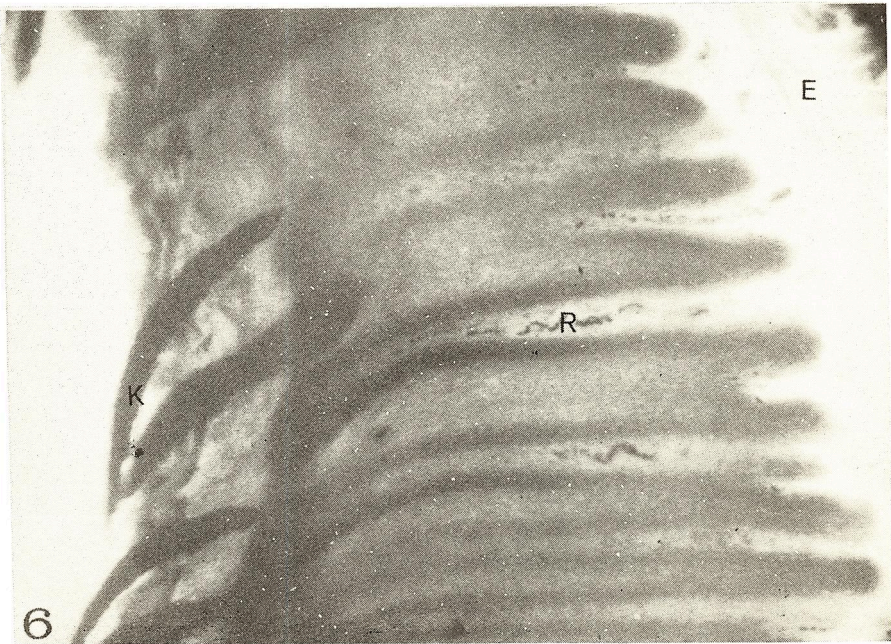


Fig. 7 y 8 - Lengua. En el tejido epitelial se destacan distintos grados de queratinización.

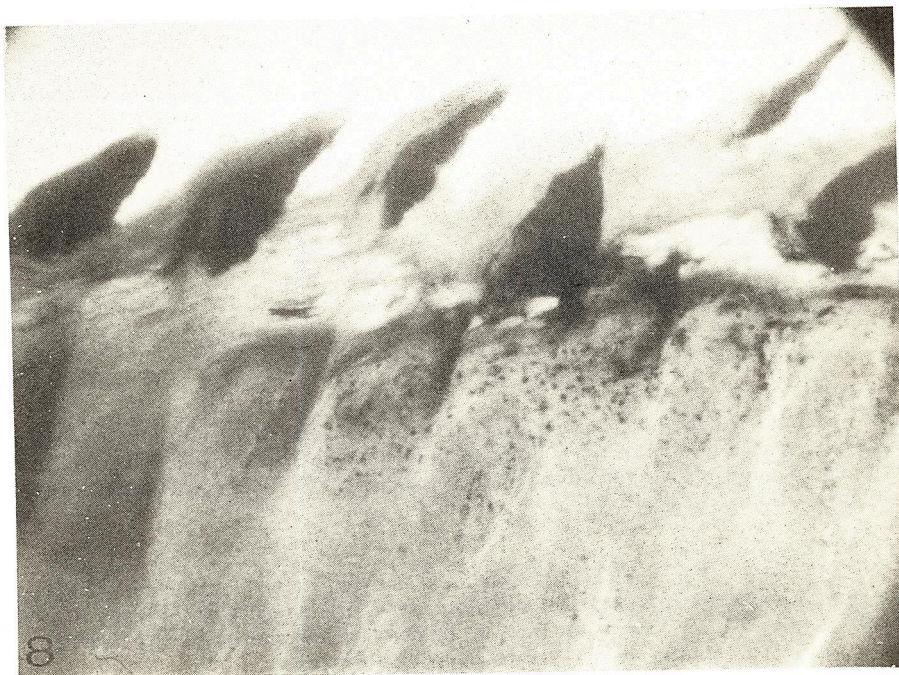


Fig. 9 - Diente y parodencio de protección. Junto a la dentina (D), entre ella y la encía se observa el espacio que ocupaba el esmalte y que ha desaparecido al realizarse la descalcificación. Compárese la queratinización del epitelio externo (EE) con el interno. (EI). En el conjuntivo fibras elásticas. (E).

Fig. 10 - Tráquea. Por debajo del epitelio y del conjuntivo subyacente, se observan glándulas (G) con distinta apetencia tintorial de acuerdo al adenómoro; cartílago (C), fibras elásticas (E) y células adiposas (CA). En estas ha desaparecido casi totalmente la grasa, al no seguirse los pasos técnicos que se preconizan en este trabajo.

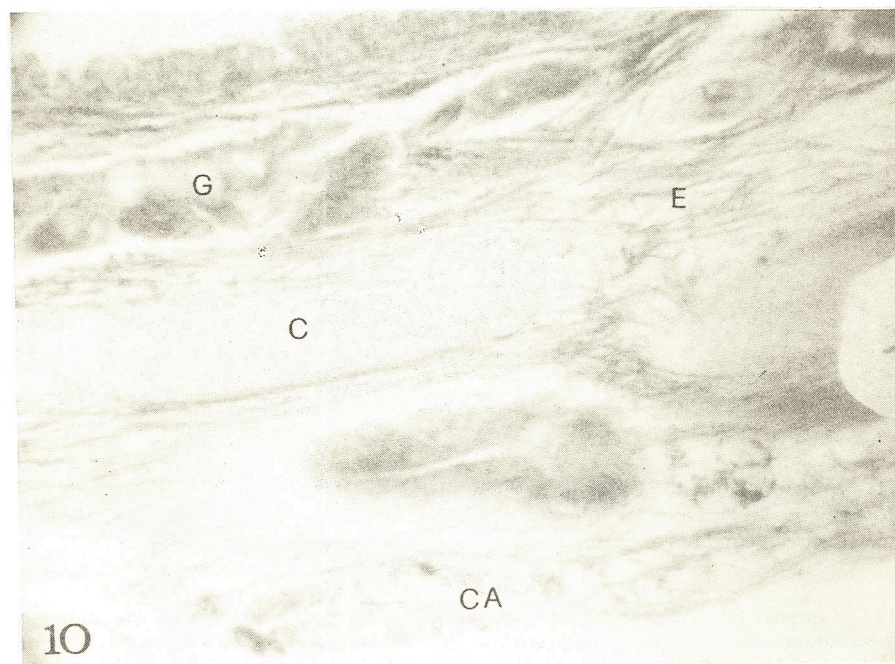
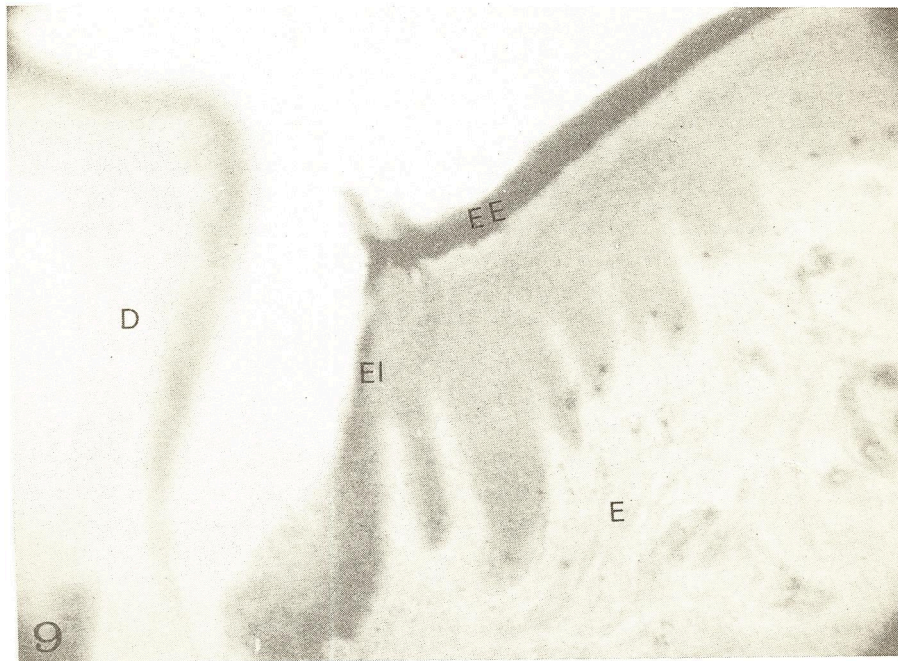


Fig. 11 - Folículo dentario. La dentina (D) y el hueso (H) se tiñe con el mismo tono. El esmalte (ES) se destaca por su intensidad de color. Los vasos (V) que abordan al epitelio externo, se presentan bien oscuros al estar llenos de glóbulos rojos.

Fig. 12 - Lengua. Se observan fibras musculares claras y oscuras cortadas longitudinal y transversalmente. Se destacan especialmente los núcleos que se hallan junto a las fibras musculares más claras.

