

P. DEL RÍO-HORTEGA

MANERA SENCILLA DE TEÑIR EPITELIOFIBRILLAS
Y CIERTOS RETÍCULOS PROTOPLÁSMICOS DE DIFÍ-
CIL DEMOSTRACIÓN

(Trabajo publicado en el Boletín de la Real Sociedad Española de Historia
Natural, tomo XXVI, núm. 2, febrero de 1926.)

TRABAJOS DEL LABORATORIO DE HISTOLOGÍA NORMAL Y
PATOLÓGICA DE LA JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS.—Núm. 50.

Manera sencilla de teñir epiteliofibrillas y ciertos retículos protoplásmicos de difícil demostración

por

P. del Río-Hortega.

En una nota técnica presentada hace un año a las Sociedades de Historia Natural y Biología dimos a conocer, casi en esquema, una fórmula frecuentemente empleada por nosotros para la tinción nuclear con las sales de plata, prescindiendo de la reducción formólica practicada ordinaria-

riamente por cuantos siguen nuestro método, ora utilizando la solución amoniaca de carbonato argéntico, ora el licor de Bielschowsky, cuyo empleo en condiciones semejantes venimos preconizando desde 1918.

Aunque con dicha técnica se obtiene en pocos minutos una excelente tinción de los núcleos (con intensidad y finura comparables a las que suministra, tras prolongada actuación, la hematoxilina de Heidenhain) y de diversos tipos celulares, cuales las células cianófilas de Cajal, las epidérmicas de Langerhans y especialmente las de Ciaccio-Masson del apéndice vermicular, mostrando a menudo los centrosomas baciloïdes de ciertos corpúsculos, no juzgamos oportuno detallar sus reglas, ya que, en definitiva, no resolvía problemas que otras variantes del mismo método hubieran dejado sin resolver.

Dicha técnica tiene, no obstante, adecuado empleo cuando se desea obtener una coloración fina y completa de los cromoblastos cutáneos, cuyos núcleos (invisibles siguiendo otros procederes) aparecen netamente, y de las células granulosas apendiculares, tanto las situadas en las invaginaciones epiteliales (excepto el tipo de Paneth), como las del corion, a las que los estudios recientes de Masson conceden extraordinaria importancia.

He aquí en lo que consiste tal variante:

1.^º Fijación preferente en formol, pudiendo emplearse otros fijadores.

2.^º Secciones por congelación, con preferencia, siendo utilizables también las obtenidas previa inclusión en los medios usuales.

3.^º Coloración en carbonato argéntico ¹ con piridina (10 cm.³ y III gotas, respectivamente), sumergiendo los cortes sin previo lavado y calentando hasta que éstos se tiñen intensamente, aunque el líquido se enturbie mucho.

4.^º Lavado en agua abundante, dos veces.

5.^º Virado en cloruro de oro, que hace palidecer considerablemente a los cortes, y refuerzo consecutivo, manteniéndolos a unos 40° hasta que se tornan violáceos.

6.^º Fijación en hiposulfito de sosa, lavado y montaje ².

La experiencia de algunos años nos ha llevado a la convicción de que una misma técnica es susceptible de dar con leves variaciones los más di-

¹ La solución de Bielschowsky, usada en análogas condiciones, es menos aconsejable.

² Puede usarse cualquier coloración complementaria. El virado en oro no es necesario, pero sí la fijación en hiposulfito de sosa cuando se desea hacer preparaciones permanentes.

versos resultados, y si en ella interviene un reactivo como el carbonato argéntico en solución amoniacal, con sólo diversificar un poco las condiciones de su empleo las posibilidades son inagotables.

En nuestros primitivos ensayos el método del carbonato de plata suministraba solamente tinciones, a veces espléndidas, de la neuroglia, del tejido conjuntivo, de las fibras musculares estriadas, etc.; más tarde logramos colorear con él las redes conectivas más delicadas; las fibras nerviosas; la microglia, los macrófagos ordinarios y las células pigmentarias; las variedades neuróglicas perivascular y de escasas radiaciones, etc. La organización del protoplasma celular comenzó a revelarse tras el empleo de mordientes, que hicieron posible y fácil el teñido de las granulaciones específicas de los corpúsculos neuróglicos y, en general, del condrioma.

Para el estudio del retículo protoplásmico más o menos diferenciado, no se mostró propicio el carbonato de plata, cuya capacidad discriminativa parecía extinguirse en las neurofibrillas, gliofibrillas y miofibrillas y en las sutiles formaciones espongioplásmicas de las células conjuntivas y endoteliales. Sin embargo, una pequeña variación de la técnica es ahora susceptible de descubrir maravillosamente el finísimo retículo de las células epidérmicas, con las epiteliofibrillas que en él se originan para enlazar a unos elementos con otros y formar la tupida trabazón del epidermis.

Al ampliarse las posibilidades tintóreas del carbonato argéntico, que poco a poco va convirtiéndose en reactivo panóptico, juzgamos interesante señalar cada nueva adaptación de su técnica de empleo, hasta que en momento oportuno inventariemos sus posibilidades y reunamos en una publicación el método original con todas sus variaciones.

La nueva fórmula, que en la demostración de las epiteliofibrillas aven-taja a la mejor técnica hasta ahora conocida, nuestra 1.^a variante al mé-todo de Achúcarro, se reduce a una sencilla impregnación colorante en carbonato argéntico fuertemente piridinado.

Aunque a veces no estorban, no son indispensables la reducción formólica ni el virado en oro, tan necesarios para otras variantes; en cambio, la fijación en hiposulfito de sosa es de rigor cuando las preparaciones han-yan de ser conservadas.

1.^o Fijación en formol al 10 por 100, que puede durar desde algu-nos días a varios años, siendo posible el empleo de otros fijadores.

2.^o Secciones por congelación, cuyo espesor no exceda de 15 mi-crás, que se recogen en agua destilada.

3.^o Sin previo lavado o tras lavado rapidísimo, inmersión de los

cortes en la solución ordinaria de carbonato argéntico¹, adicionada de una gota de piridina por cada centímetro cúbico, aproximadamente. Cúbrese el vasito con un vidrio de reloj y caliéntase a unos 50-55°, agitando de tiempo en tiempo hasta que los cortes se colorean intensamente.

Aunque el licor argéntico comienza a obscurecerse generalmente en seguida que se calienta y poco a poco se enturbia y ennegrece, su actuación debe prolongarse hasta que, iluminando el vaso inferiormente, se observa que los cortes han adquirido color pardo-rojizo. Tal enturbiamiento de la solución argéntica, que se debe al formol que llevan los cortes (el cual favorece mucho la reacción si no es excesivo), no ocasiona precipitado alguno.

El calentamiento tiene por principal objeto acelerar la tinción, que puede efectuarse también en la estufa a 35° o en frío durante varias horas (seis a diez y ocho).

4.^º Lavado en dos vasos con agua abundante.

La reducción formólica es innecesaria puesto que en realidad el formol actúa ya, asociado al calor, para producir la coloración. Puede, no obstante, hacerse una reducción más completa en formol débil después de lavar los cortes.

5.^º Fijación en hiposulfito de sosa.

El virado en oro es pocas veces verdaderamente útil, pues a menudo hace palidecer con exceso a los hilos del espongioplasma. El dorado puede ser ventajoso, sin embargo, cuando los cortes estén demasiado oscuros, para rebajar un poco la coloración del fondo.

6.^º Lavado en agua y montaje.

Los resultados de esta técnica, en la que podemos conseguir absoluta constancia, son sorprendentes por la finura y belleza de las coloraciones epiteliofibrilares.

En nuestras investigaciones sobre las epiteliofibrillas efectuadas a favor del método de Achúcarro, con nuestras variantes, en 1917, y en las que basamos extensa Memoria, nos fué imposible descubrir en los corpúsculos epidérmicos de los vertebrados el retículo primordial de donde habrían de surgir las epiteliofibrillas que constituyen los filamentos o puentes intercelulares.

Apoyándonos, no obstante, en observaciones efectuadas en epitelios

¹ Solución de nitrato de plata al 10 por 100, 5 cm.³; solución de carbonato de sosa al 5 por 100, 15 cm.³; amoniaco, cantidad suficiente para disolver el precipitado; agua destilada, 55 cm.³ Puede también emplearse la solución de Bielschowsky, muy diluida.

prismáticos de vertebrados e invertebrados y en las imágenes patológicas que aparecen en los elementos epiteliomatosos, no vacilamos en suponer la existencia de un citorretículo indiferenciado en los corpúsculos poliestratificados del epidermis.

En efecto, los resultados de la técnica descrita confirman enteramente nuestras inducciones, demostrando la existencia en los elementos de la piel humana de una organización reticular, constituida por hilos finísimos entrelazados limitando estrechas mallas, que ocupa todo el protoplasma; se condensa un poco en las regiones perinucleares, y en los bordes celulares se resuelve en un sistema de fibrillas más gruesas y resistentes, las cuales, irradiando asociadas en haces, penetran en células inmediatas, perdiéndose en su retículo o atravesándole para ganar el protoplasma de un tercer o cuarto elemento.

Aunque no pretendemos describir ahora los aspectos de la trama epiteliofibrilar, de cuya belleza no podría dar idea la más acabada descripción sin ilustraciones, añadiremos que lo descrito corresponde al cuerpo mucoso de Malpighi y que en la capa más inferior y en las superiores del epidermis la disposición epiteliofibrilar es diferente. En el estrato germinal, en efecto, las epiteliofibrillas tienden a la verticalidad, constituyendo, si son gruesas, los llamados filamentos de Herxheimer, bien estudiados por Alberca y que todavía algunos autores (Favre y Regaud, por ejemplo) consideran, a despecho de la realidad, como formaciones dependientes del condrioma; error en que incurriera también Tello al interpretar la formación filamentosa de las células hipofisarias.

En los estratos superiores del epidermis las fibrillas tienden a la horizontalidad, como los propios corpúsculos aplanados, en los que se distiende gran abundancia de fibrillas y progresiva desaparición del retículo perinuclear.

La técnica descrita aporta algunas indicaciones útiles respecto a dos hechos interesantes que un tiempo fueron asunto litigioso: son ellos la pretendida red superficial descrita por Ide, que en nuestras preparaciones (pertenecientes a epitelios normales y a toda suerte de epitelomas con hipertrofias reticulares) no se confirma, y los dermatosomas o nódulos de Ranvier, tingibles a perfección con la primera variante nuestra al método de Achúcarro y refractarios a la impregnación con la fórmula descrita del carbonato argéntico, que muestra las epiteliofibrillas sin engrosamiento alguno en los espacios intercelulares.

En nuestras investigaciones precedentes consideramos a dichos nódulos como simples engrosamientos de las epiteliofibrillas; hoy, por el contrario, nos vemos precisados a reconocer que se trata de formaciones

diferentes anejas a las fibrillas, a las que parecen rodear más o menos completamente¹ y sobre cuya naturaleza no podemos aventurar juicio definitivo, ya que no hemos conseguido hallar prueba alguna de que sean vainas de enquilema, como opinaba Ranvier, o dependencias de la membrana celular, como cree Cajal².

Por ser bastante conocidas, a partir de nuestras investigaciones, y por salirse su descripción detallada de los límites de esta nota, no hacemos hincapié en las variaciones texturales del armazón epiteliofibrilar que aparece en las formaciones epiteliomatosas. Recordaremos tan sólo que es en ellas donde se sorprende las más admirables coloraciones y que su riqueza de aspectos, todos ellos de gran belleza, exigiría amplia narración. Desde la general hipertrofia de los hilos citoplásmicos, sin perder la arquitectura típica, a la desaparición progresiva de las fibras diferenciadas y del retículo elemental, todas las fases son visibles en los epitelios de células espinosas y de células basales, en los que ora aparecen corpúsculos esféricos cuyas fibrillas irradian con toda regularidad pasando a elementos inmediatos, ora se muestra, con infinitos cambios de forma, riqueza de hilos y amplitud de mallas, el engrosamiento del retículo perinuclear. Basta saber que unas veces la diferenciación fibrilar es excesiva y los elementos refuerzan sus conexiones, y en otras circunstancias se asiste a la rotura de los enlaces celulares por desdiferenciación y retorno a un tipo más embrionario.

En todas nuestras observaciones sobre epitelios nos ha sorprendido el hallazgo de bastoncitos intracelulares, que en número de uno, situado más o menos cercano al núcleo, o de dos a seis, diseminados por el citoplasma, yacen en las células correspondientes al cuerpo mucoso de Malpighi y especialmente en las ensanchadas de los estratos superiores.

Tales bastoncitos, que por la constancia con que se presentan y la regularidad de sus dimensiones (2 a 6 micras) podrían ser interpretados como bacterias, son identificables con los bastoncitos de origen centriolar vistos por nosotros en células nerviosas, epifisarias, renales, hipofisarias, suprarrenales, etc. Con la técnica que los descubre no hemos podido, sin embargo, discernir el centrosoma normal de los corpúsculos epidérmicos.

¹ Con el método tanoargéntico puede apreciarse que en proyección vertical no aparecen circulares los nódulos de Ranvier, sino angulosos, triangulares, semilunares, etc.

² Acerca de la discusión promovida en torno a los filamentos epidérmicos y sus engrosamientos intercelulares, remitimos al lector a nuestro extenso trabajo «Contribución al conocimiento de las epiteliofibrillas.» *Trabajos del Lab. de Inv. Biol.*, 1917.

Otra formación reticular interesante que, según hemos podido ver Costero y nosotros, aparece netamente con la técnica descrita, hállase en los grandes corpúsculos placentarios de los mamíferos y especialmente de los roedores. En las células deciduales, en efecto, existe un espongioplasma formado por una red de finos hilos, que dibujan mallas anchas o estrechas y que en diferentes lugares se diferencian en verdaderas fibras de grosor variable, las cuales surcan el protoplasma y se confunden con las de otros elementos. Sin entrar aquí en una descripción completa, que será objeto de un trabajo aparte colaborado por Costero, anticiparemos que el citorretículo se extiende desde la membrana celular a la nuclear, y que con frecuencia no es posible precisar los límites de cada corpúsculo por ofrecerse aspectos syncytiales. En cuanto a las fibrillas diferenciadas es raro que abarquen toda la extensión del protoplasma, y más frecuentemente forman haces o bucles flexuosos, abiertos en forma de abanico o condensados en una parte de la célula. Tanto marginalmente, en el ectoplasma, como en torno del núcleo, puede espesarse el retículo y aparecer diferenciaciones fibrosas. En suma, las variables dimensiones y forma de las células deciduales y las relaciones que tienen unas con otras hacen cambiar hasta el infinito los aspectos, todos bellísimos, del espongioplasma reticular, más o menos diferenciado en fibras.

He aquí, en resumen, las principales estructuras observadas a favor de la técnica descrita, cuyas aplicaciones podrán, sin duda alguna, ampliarse.

Laboratorio de Histología normal y patológica
de la Junta para Ampliación de Estudios.