

Revaloración de las técnicas de coloración histológicas: hematoxilina férrica de Heidenhain como herramienta de diagnóstico histopatológico

Drs. Claudia Blandenier de Suárez *, Francisco C Herrera **

Unidad de miocardiopatías” Dr. Juan José Puigbó”. Cátedra y Servicio de Cardiología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

e-mail: claudia1937@cantv.net o claudia1937@gmail.com.

“La técnica no vale nada, la manera como se aplica, es todo”

A Branca (1924)

El Dr. José Gregorio Hernández definió la técnica histológica o técnica microscópica, como la parte técnica de la histología que comprende el conjunto de operaciones e instrumentos que se necesitan para su estudio. Él mismo introdujo oficialmente esta disciplina en nuestro país a finales del siglo XIX y formó los primeros técnicos histólogos (histotecnólogos, HTs) venezolanos (1).

Como es bien conocido, una buena preparación de los cortes o secciones histológicas, constituye “la piedra angular” de la observación al microscopio de luz y por ende, es esencial para el conocimiento de los tejidos normales y patológicos. Actualmente, los adelantos científicos en el campo de técnica histológica, han llegado hasta la identificación de moléculas y átomos. La histoquímica, la inmunohistoquímica, el reordenamiento nuclear, las técnicas de hibridización *in situ* ya se están aplicando en la mayoría de los países industrializados y aun en los que están en vías del progreso integral. Sin embargo, en nuestro país, dada las condiciones socio-

económicas actuales, la aplicación de estos métodos se ha visto cada vez más difícil. La adquisición de reactivos es muy costosa, y depende de las políticas de estado relacionadas al control de intercambio.

Por otra parte, los métodos de coloraciones de tejidos tradicionales aún tienen una prioridad entre los procedimientos diagnósticos de rutina en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica del mundo.

Los primeros colorantes de tejidos humanos fueron naturales, se caracterizan por ser cuerpos coloreados que tienen el mismo cromóforo -radicales químicos responsables de la coloración como: carbonilo (>C=O), azoico (-NaN-), nitroso (-N=O), carbónico (>CN-) entre otros. El colorante más utilizado internacionalmente, es la hematoxilina (colorante catiónico, del griego haim(ato), sangre + xyl(o), madera +, in(a), materia o sustancia) que se obtiene de la extracción de la madera de una planta leguminosa indígena de América Central y México denominada “palo de Campeche” procedente de Campeche, localidad de la península de Yucatán (familia *fabaceae*, tribu *caesalpinaceae*, género *haematoxylum* y especie *Haematoxylum campechianum*. Químicamente, es una pirocatequina o pirocatecol unida a un pirogalol, Figura 1. La hematoxilina — cristales blancos o amarillos solubles en agua y alcohol — no es propiamente una sustancia colorante, requiere de un proceso denominado de “maduración”, es decir, de oxidación. En el proceso

* Profesor Titular. Unidad de miocardiopatías” Dr. Juan José Puigbó”. Cátedra y Servicio de Cardiología. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

** Investigador Titular Emérito. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Venezuela.

de oxidación, la hematoxilina pierde dos hidrógenos e introduce un átomo de oxígeno en su molécula de tal manera que se convierte en un compuesto con un núcleo quinónico que es el cromóforo responsable del color. La oxidación puede ser natural o química (exposición al aire libre o mediante sustancias químicas). La hematoxilina oxidada denominada hemateína, tiene propiedades colorantes aunque en forma indirecta. Igualmente, la hemateína solo colorea los tejidos cuando se une a un “mordiente” de allí que se considera un colorante indirecto.

De acuerdo con los mordientes utilizados, los procedimientos de coloración con hematoxilina, tomarán diversos nombres, o bien el nombre del investigador que propuso la fórmula (hematoxilina de Bohmer, de Harris, de Mayer entre otros) o bien, el nombre del mordiente (hematoxilina férrica). Las soluciones de hematoxilina son colorantes básicos y por ello se emplean en tinciones nucleares. Tiñen la cromatina de morado, negro o azul intenso. Sin embargo, las soluciones de hematoxilina con mordientes del tipo de alumbre de hierro,

permiten evidenciar elementos del citoplasma como mitocondrias, centrosomas y hasta las estriaciones transversales de las miofibrillas del músculo cardíaco y esquelético lo que es muy útil en casos de rhabdomiomas indiferenciados cuando no se dispone de marcadores inmunohistoquímicos específicos como la mioglobina y miogenina entre otros (2-4).

Todas las variaciones de hematoxilina férrica consisten en principio del uso de las sales férricas las cuales actúan previamente sobre los tejidos a teñir. Una de las más usadas es el alumbre de hierro —sulfato doble de amonio y sesquióxido de hierro— $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — empleado fundamentalmente en la hematoxilina férrica de Heidenhain. Las hematoxilinas férricas más conocidas son las de Weigert, Mallory y de Heidenhain (1891). Esta última es muy utilizada en citología, botánica y zoología (5). Es muy útil en el diagnóstico de las parasitosis humanas especialmente para el diagnóstico de amebiasis.

En este trabajo se propone un procedimiento

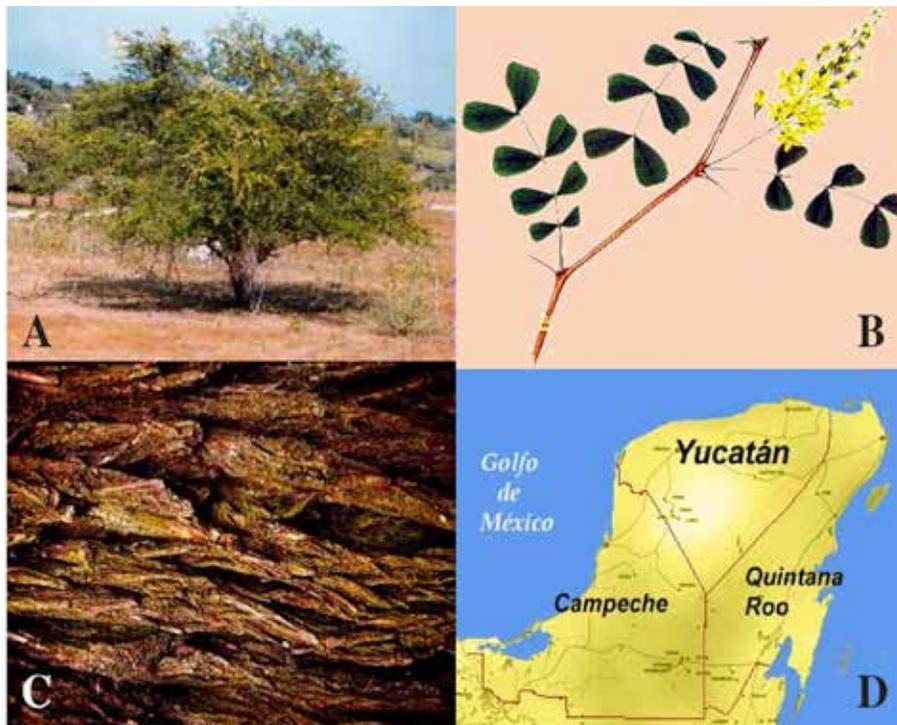


Figura 1. Fotografías del Palo de Campeche (*Haematoxylon campechianum* L). A y B: Arbusto y flores del palo de Campeche. C: Corteza del palo de Campeche de donde se obtiene la hematoxilina. D: Mapa de la península de Yucatán.

de la hematoxilina férrica de Heidenhain tal como es aplicado por uno de los autores para su empleo en las estructuras del músculo estriado, especialmente para los rhabdiosarcomas, protozoos y diversos organelos celulares. Igualmente, se hacen algunas consideraciones sobre esta técnica y sus procedimientos y variantes (6).

CONSTITUCIÓN Y PROCEDIMIENTOS.

Hematoxilina de Heidenhain (1891) modificada.

A. Reactivos o soluciones:

1. Solución del mordiente: alumbre de hierro al 2,5 %. (Sulfato doble de amonio y hierro, $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) Es una sal básica.

2,5 g de alumbre de hierro

100 mL agua destilada (solución preparada en frío)

Nota:

Los cristales del alumbre de hierro deben ser claros de color morado y no verdes. Si tienen un tinte amarillento deben desecharse. Los más adecuados son los cristales gruesos. La solución debe ser preparada en frío, en un mortero. El líquido obtenido es amarillento, transparente.

2. Solución colorante de hematoxilina:

250 mg (0,5 gm) de hematoxilina

5 mL (10 mL) de etanol a 95°

45 mL (90 mL) de agua destilada

Nota:

Disolver la hematoxilina en el alcohol y luego añadir el agua destilada.

Para la maduración instantánea de la hematoxilina, añadir como oxidante para su conversión en hemateína, 10 mg de yodato de sodio para 50 mL de solución.

Según Hance, si el agua destilada empleada en la preparación de la solución de hematoxilina es siquiera levemente ácida, las preparaciones tendrán un aspecto terroso. La adición de trazas de bicarbonato de sodio corregirá este defecto (7).

Gabe propone utilizar una solución madre de hematoxilina y otra de trabajo (8): Solución madre de hematoxilina alcohólica al 10,0 %. En alcohol a 96° madurada naturalmente durante meses y/o años o inmediatamente con oxidantes. Esta solución madre puede durar hasta 20 años.

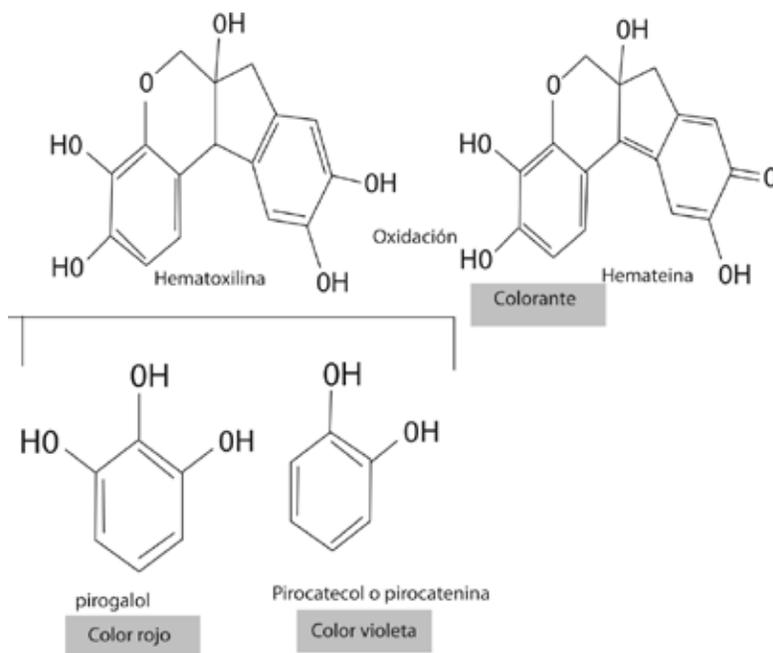


Figura 2. Fórmulas químicas de la hematoxilina y sus componentes. Fórmula química de la Hemateína (hematoxilina oxidada).

Solución de trabajo: Solución madre 5 mL disolver en agua destilada- 95 mL.

3. Solución saturada de ácido pícrico en agua destilada

4. Solución saturada de Orange G en etanol de 95,0 %

B. Procedimiento:

1. Desparafinar las secciones o cortes histológicos (3 micras o menos de 5 micras) en xilol.

Nota:

Si son pocas láminas se pueden usar un frasco gotero provisto de xilol y dejar caer gotas de xilol sobre los cortes ligeramente inclinados hacia abajo para que, de esta manera arrastrar la parafina. El xilol debe recogerse en un envase y luego ser desechado como de ordinario.

2. Eliminar el xilol con alcohol isopropílico al 100 %. (Se puede usar el mismo procedimiento con un frasco gotero provisto de alcohol isopropílico para arrastrar el xilol).
3. Lavar en agua destilada.
4. Colocar mordiente (alumbre férrico al 2,5 % en agua destilada) sobre los cortes o por inmersión durante varias horas (de 6 a 8 horas).

Nota:

Algunos autores proponen dejar actuar el mordiente durante 3 a 4 horas a temperatura ambiente o durante 30 a 45 minutos a 56 °C. Si se desea colorear el citoplasma, dejar los cortes más tiempo (12 horas). Para la coloración nuclear, se colorea por 30 minutos y el corte toma un color azul. Si se deja por 12 horas, el corte toma un color negro oscuro.

5. Lavar con agua destilada por 5 minutos (otros prefieren lavar rápidamente).
6. Colorear con solución de hematoxilina varias horas (igual o más que la duración de la inmersión en la solución mordiente de alumbre de hierro al 2,5 %) de 1 a 36 horas (a altas temperaturas es más rápido).
7. Enjuagar en agua destilada. (Enjuagar en agua corriente de chorro durante 5 minutos).
8. Decolorar (diferenciar) en la solución saturada de ácido pícrico (minutos). Controlar la coloración al microscopio antes del enjuague en agua destilada. En general los cortes se ven muy oscuros por el bajo índice de refracción del agua. Hay que tener

cuidado de no extraer demasiado la hematoxilina. Ensayar unos 15 a 30 minutos. Si la coloración es muy oscura, regresar a la solución de ácido pícrico.

Nota:

La diferenciación con ácido pícrico fue preconizada por Masson (1923) cuando la coloración regresiva a la hematoxilina férrica es practicada como primer tiempo,

9. Enjuagar en agua destilada.
10. Enjuagar en agua de chorro corriente durante 5 minutos.
11. Deshidratar con alcohol isopropílico al 100 %.
12. Contrastar con un colorante ácido el citoplasma, Solución saturada de Orange G en etanol (minutos). Este colorante no sobrecolorea y no requiere de diferenciación.
13. Deshidratar con alcohol isopropílico a 100 % (2 cambios)
14. Aclarar con xilol (dos baños)
15. Montar con medio sintético.

Resultados: Figura 3.

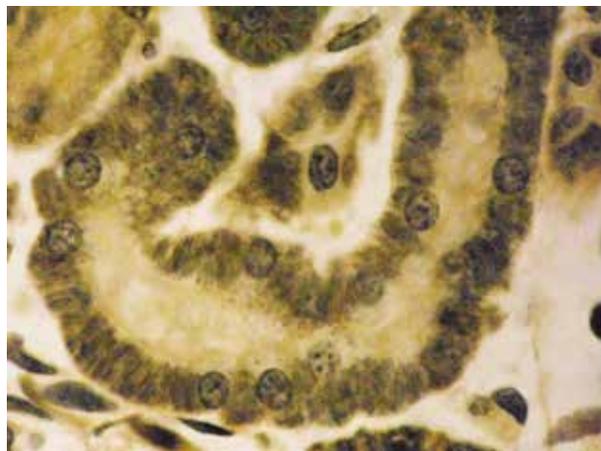


Figura 3. Mitocondrias en túbulos renales de *Bufo marinus*. Fijación: Helly. Coloración: Hematoxilina férrica de Heidenhain, Orange G. Fotografía: Dr. Herrera.

DISCUSIÓN

Desde que la anatomía patológica se organizó en nuestro país en forma definitiva a partir de 1932, en el Laboratorio y Departamento de Anatomía Patológica

del Hospital Vargas dirigido por el Dr. José Antonio O'Daly, secundado posteriormente por el Dr. Rudolf Jaffé, la técnica histológica comenzó a desarrollarse en forma rutinaria.

A comienzos del siglo XX, los trabajos de patología de los primeros microscopistas venezolanos como José Gregorio Hernández, Aníbal Santos Domínicí, Felipe Guevara y otros, contaron con estudios histológicos quizás elaborados por ellos mismos. En realidad, fue el Dr. José Gregorio Hernández quien había por primera vez implementado esta disciplina en la escuela de medicina e instruido a varios de sus preparadores entre ellos Rafael Rangel quien obtuvo preparaciones histológicas muy buenas.

Desde entonces, la técnica histológica se enseñó en forma empírica a partir de los conocimientos transmitidos por tradición. Varios anatomopatólogos discípulos de O'Daly ejercieron la técnica histológica y publicaron trabajos interesantes sobre esta materia como el propio O'Daly, Leandro Potenza y Luis Carbonell, entre otros (9).

A partir de 1940, la anatomía patológica como especialidad comenzó a expandirse con la llegada de varios anatomopatólogos alemanes quienes a su vez, trajeron sus propios técnicos histólogos, generalmente familiares. De tal manera que la técnica histológica se expandió en el interior del país en varias ciudades como Valencia, Maracaibo, San Cristóbal, Valera, Maracay, Mérida, Cumaná, entre otras. Posteriormente, en el Instituto Anatomopatológico "Dr. José Antonio O'Daly" se impulsó y desarrolló esta disciplina en los tres primeros posgrados de anatomía patológica por iniciativa de su director el Dr. O'Daly. Desde 1972 en que se dio el primer curso de técnica histopatológica hasta 1991, se trató de oficializar esta profesión lo cual fue imposible hasta el 2006 cuando se intentó nuevamente sin éxito. En los últimos años, en Valencia y Maracay se han graduado técnicos histólogos en instituciones oficiales y privadas respectivamente. A pesar de estas cohortes de técnicos, aún existe una demanda de ellos especialmente en los laboratorios privados.

Actualmente, es importante, revalorar las coloraciones especiales como herramientas de diagnóstico en varios tipos de patología.

En relación con la hematoxilina de Martín Heidenhain (1894) haremos algunas observaciones que hemos recogido de varios expertos en técnica histológica. En primer lugar puntualizaremos que la coloración de Heidenhain es regresiva e indirecta y por ello requiere de mordiente.

Se denomina "mordiente" a toda sustancia que refuerza las coloraciones y/o las hace posible. Los mordientes toman el nombre de alumbre cuando son sales dobles de aluminio y potasio u otro átomo como el sodio (sulfato doble de aluminio y sodio), hierro entre otros (sulfato doble de amonio y hierro) los cuales se combinan con los colorantes formando compuestos intensamente coloreados denominados "lacas". Las lacas se usan con gran frecuencia en la preparación de varios tipos de soluciones de hematoxilinas (10).

La primera técnica de coloración regresiva por una laca férrica de hematoxilina se debe a Benda (1886); sin embargo, el procedimiento preconizado por Martin Heidenhain es aún en la actualidad una de las técnicas más utilizada en citología, botánica y zoología. En este caso, el empleo del mordiente produce una fijación del hierro sobre los grupos ácidos de las estructuras tisulares especialmente sobre los radicales fosfóricos de los ácidos nucleicos y sobre los carboxilos de los aminoácidos.

Diferentes laboratorios preconizan varios métodos de aplicación del mordiente en lo que concierne las concentraciones del alumbre de hierro, la duración y la temperatura del procedimiento. De esta manera, recomiendan un período de exposición al mordiente de entre 3 y 12 horas; 36 horas o la permanencia de los cortes en el alumbre de hierro a 37° hasta 60°.

Según Bancroft y col. (11), el tiempo necesario en el mordiente y coloración puede variar de acuerdo a la solución fijadora utilizada. Por ej. los tejidos fijados en solución de bicromato requieren más tiempo. Estos autores ofrecen una simple guía en este sentido: tejidos fijados en solución de formol sublimado, de formol, Susa, Bouin y Carnoy requieren, una hora. Aquellos fijados en Helly, Zenker —3 horas—; en Flemming, sobre 24 horas.

La coloración de Heidenhain tiene variantes, pero el principio del método es simple. Cortes o secciones histológicas delgadas, menores de 5 micras de grosor, son preparadas con un mordiente de solución de alumbre férrico y luego tratadas con una solución acuosa de hematoxilina madurada, de manera de obtener una transformación parcial de la hematoxilina en hemateína mediante la pérdida de dos átomos de hidrógeno y la introducción de uno de oxígeno en la molécula de hematoxilina como se dijo anteriormente. La diferenciación se realiza con solución de alumbre férrico —bajo control microscópico— y la cual finaliza cuando las estructuras que se desean observar, se hacen evidentes y aparecen netamente sobre el fondo de la preparación.

Algunos autores como Sheehan y col. (12), aconsejan utilizar el exceso de la solución del mordiente que ha sobrado en el primer paso del procedimiento. El contraste o coloración del fondo puede hacerse con varias soluciones denominadas ácidas o citoplasmáticas como: solución acuosa de fucsina ácida al 0,1 %; solución de Verde luz (light Green); Solución de Van Gieson o solución acuosa de Orange G (13). Esta última es la que recomendamos ya que acentúa la cromatina nuclear demostrándose así los cromosomas y las mitocondrias. Una de las advertencias que hacen es que se debe tomar la precaución de colocar las láminas —portadoras de las secciones histológicas—, verticalmente en los envases para impedir que se depositen precipitados producto de las soluciones. Como se puede comprobar en esta coloración, las soluciones del mordiente y del colorante, están separadas. Con el alumbre de aluminio y amonio, la hematoxilina tiñe los núcleos de azul brillante y el alumbre de hierro, de azul oscuro o negro. Según estos autores, cualquier fijador puede ser utilizado y el tejido embebido en parafina o celoidina.

Gabe hace varias observaciones útiles sobre los procedimientos de esta coloración (8). En primer lugar opina que la preparación de los reactivos exige ciertas precauciones. La solución de alumbre de hierro utilizada como mordiente se altera fácilmente: debe prepararse en el momento o en el mismo día de su uso a partir del alumbre de hierro y amonio químicamente puros. Actualmente el polvo es blanco o un poco violáceo. Deben descartarse los cristales que tengan un color amarillento y todo material que no se disuelva enteramente al 5,0 % en el agua destilada a la temperatura ambiental. El colorante de hemateína se prepara a partir de una solución madre al 10,0 % en alcohol a 96° madurada durante meses o años o inmediatamente con diversos oxidantes. Pero la maduración inmediata no puede hacerse para las lacas cúpricas ni para ciertas técnicas neurológicas. La solución alcohólica de hematoxilina se conserva hasta 10 o 20 años siempre y cuando los envases de vidrio sean adecuados, no sometidos a la luz solar directa. La solución colorante de Heidenhain se prepara mezclando 5 mL de la solución madre (descrita) y 95 mL de agua destilada. Esta última también puede durar años siempre y cuando se filtre de vez en cuando.

Según este autor, el lavado con agua destilada entre la exposición al mordiente y la coloración, es importante ya que condiciona o facilita la diferenciación y la selectividad de la coloración.

Existe una relación entre la abundancia de las proteínas tisulares de los grupos ácidos y el grado de siderofilia de los tejidos. No menos importante es el lavado con agua corriente o del chorro. El lavado prolongado de las preparaciones cuando la diferenciación terminó, es también, un tiempo esencial ya que durante ese tiempo las estructuras coloreadas toman los tintes definitivos y se eliminan los últimos restos de alumbre de hierro.

Como se puede comprobar en las observaciones expuestas en este trabajo, los procedimientos para realizar unas excelentes tinciones, requieren de un trabajo minucioso, no solo relacionado con los pasos a dar durante la coloración de las secciones histológicas sino también con todo lo que se relaciona con los reactivos, su vigencia, almacenamiento y uso adecuado. Consideramos que las coloraciones utilizadas de rutina en todos los laboratorios como primer paso para el diagnóstico histológico pueden en un momento dado también ser importantes para destacar elementos tisulares o celulares puntuales para un diagnóstico en especial, pero no suficientes en algunos casos. Las coloraciones denominadas como “especiales” han caído en desuso y han sido reemplazadas por las inmunotinciones en muchos laboratorios. Sin embargo, como se dijo anteriormente, deben ser revaloradas en caso de no disponer de los reactivos para la inmunohistoquímica.

REFERENCIAS

1. Espinel L. El Doctor José Gregorio Hernández. Figura paradigmática y médico del pueblo. *Gac Méd Caracas*. 1974;LXXXII(5-6):239-244.
2. Jong SH, van Vark N, Albus-Lutter E, van Raamsdonk W, Voute PA. Myosin and myoglobin as tumor markers in the diagnosis of rhabdomyosarcoma. A comparative study. *Am J Surg Pathol*. 1984;8:521-525.
3. Cessna M, Zhou H, Perkins SL, Tripa SR, Layfield L, Daines C, et al. Are myogenin and MyoD1 expression specific for rhabdomyosarcoma? *Am J Surg Pathol*. 2001;25:1150-1157.
4. Suárez C, Ochoa R J, Hamana L, Moreno O, Finol H, Gómez C. Rbdomiosarcoma cardíaco: estudio clínico patológico, inmunohistoquímico y ultraestructural de un caso. *Avances Cardiol*. 2004;24:70-84.
5. Suárez C, Montenegro E. Compendio de Coloraciones Histológicas. Ed BOD, Banco Universal. Publ Monfort, C.A. Caracas. 2004:48.
6. Herrera F. Iniciación a la investigación científica en nuestro país. *Rev Soc Ven Hist Med*. 2011;60:29-46.

7. Michael F. Guyer. Animal micrology. Fifth revised edition. The University of Chicago Press. Chicago Illinois, 1953.
8. Gabe M. Techniques histologiques. Masson & Cie Paris. 1968:689.
9. Suárez B C. Notas sobre el origen de la técnica histológica en Venezuela: con especial referencia a su desarrollo en el Instituto Anatomopatológico "Dr. José Antonio O'Daly". Colección Razetti. Academia Nacional de Medicina, Venezuela. Tomo VII;2009.p.433.
10. Langeron M. Précis de microscopie. Technique-experimentation-diagnostic. En: Masson & cie, editores. Libraires de L'Academie de Médecine. 120. Saint –Germain, Paris VI; 1949.p.566.
11. Bancroft JD, Stevens A, Dawson IMP. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone. Edingurgh London and New York. 1977.
12. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. The C.V. Mosby Co. Saint Luis; 1973.p.74.
13. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology. 2ª edición. Battelle press. Columbus. Richland EE.UU; 1980.p.147.

Gac Méd Caracas 2014;122(3):252-255

Un anillo con dos piedras

Drs. Mauricio Goihman Yahr*, José Pereira

*Miembro Correspondiente Nacional

Esta presentación se ocupará de algunas características fundamentales de las enfermedades ampollares autoinmunes de la piel. Luego, dentro de este ambiente conceptual, se expondrá un cuento escrito por el primer autor y publicado en inglés en Dermanities hace un par de años.

La relación entre esas dos narraciones se hará evidente en pocos minutos.

El escenario

La piel es un órgano complejo, estratificado, con células entrelazadas estrechamente, el cual funciona usualmente de forma admirable.

Cuando se rompe la estabilidad de la unión dentro de un estrato o entre un estrato y otro, se forman cavidades que se llenan de líquido. Si el mecanismo original de la inestabilidad y formación de ampollas es autoinmune, nos encontramos con las enfermedades que nos ocupan.

Entre ellas nos ocuparemos fundamentalmente de tres: el pénfigo, el penfigoide ampollar y la dermatitis herpetiforme (enfermedad de Dühring).

Evolución del conocimiento

Luego de las descripciones clínicas (que son antiguas), el primer avance fundamental estuvo en los estudios histopatológicos que fraguaron en las décadas de los 50 y 60. Las ampollas podían ser intraepidérmicas (pénfigo) o subepidérmicas (en las otras dos). Además, en el pénfigo existía la acantolisis. Esto es, el daño y ruptura de los puentes intercelulares entre los queratinocitos. Estos aparecen como ladrillos sueltos o como parte de una pared que se disgrega, alrededor o en el interior de las ampollas.

De esta misma época data el uso de los glucocorticoides sistémicos, la primera terapéutica efectiva para este grupo de afecciones. Los esteroides forman todavía la base del tratamiento del pénfigo y del penfigoide (1-3).

Debemos acotar, que como ha sucedido muchas veces, la razón del uso inicial de los esteroides no era la correcta. Esto, no ha impedido su éxito terapéutico.

El paso siguiente fue la identificación por inmunofluorescencia directa o indirecta de