

Instituto Español de Fisiología y Bioquímica  
Sección de Fisiología de Valencia  
(Prof. J. García-Blanco)

## **Ensayos sobre tinción diferencial de estructuras celulares y tejidos con tetrabromofenolsulfoftaleína (\*)**

por J. GARCIA-BLANCO

(Recibido para publicar el día 10 de Junio de 1947)

Dentro de la técnica histológica habitual ocupa lugar preponderante el empleo de aquellos tintes, como azul de metileno o eosina, que por su propio carácter básico o ácido, al propio tiempo que colorean una estructura celular dan información de su basicidad o acidez, si bien sólo en forma cualitativa. Habría de ser de gran utilidad cualquier progreso histoquímico que permitiera el logro de una tinción sencilla que denotase variaciones cuantitativas en el pH de diversas células o de las partes de una misma célula, según el color que adquirieran en presencia de un indicador de reacción que a su vez poseyera propiedades de tinte para los tejidos.

En el trabajo presente, con el carácter de nota previa, se exponen los primeros ensayos realizados en esta dirección y cuyos resultados detallados sobre sangre y medula ósea, mucosa vaginal y tejido nervioso aparecerán, junto con las ilustraciones policrómicas correspondientes, en una revista de carácter morfológico y con la cooperación de los colaboradores de esta Sección de Fisiología T. ALCOBER, J. AVIÑÓ y G. FORTEZA.

*Técnicas utilizadas.* — Entre los diversos indicadores policrómicos ensayados se ha manifestado la tetrabromofenolsulfoftaleína (TFS) como un posible colorante útil en el aspecto que estudiamos, pese al hecho de que su zona de viraje se halla entre los pH 3 y 4,6, notoriamente bajos para dar idea de la aci-

---

(\*) Nota previa.

dez del substrato celular teñido, a la luz de los conocimientos actuales sobre la reacción intracelular.

En primer término se ha operado con soluciones acuosas de TFS, con las que se bañaba la extensión de sangre o medula ósea, previamente desecadas y fijadas en metanol. Precaución fundamental para que el reactivo tiña las estructuras celulares que se disuelva en una solución tampón cuyo pH se encuentre hacia la mitad de la zona de viraje del indicador, esto es, 3,8. Se requiere además, para el tejido hemático o hemopoiético, que la solución tampón empleada carezca de efectos hemolíticos sobre las células eritroides fijadas.

En las extensiones de sangre de rana se han obtenido resultados muy alentadores con la solución tampón de Mc Ilvaine del citado pH 3,8, que se obtiene mezclando 71 c. c. de solución 0,2 molar de ortofosfato disódico con 129 c. c. de ácido cítrico 0,1 molar, disolviendo el TFS hasta la saturación en esta mezcla y obteniéndose después de filtrado un líquido de color carmín, con el que se baña durante 4 minutos la extensión de sangre de rana que, como se ha dicho, debe haber sido previamente fijada en metanol y desecada luego. Terminada la tinción, se arrastra el exceso de reactivo con alcohol etílico y se lava después con agua.

Al objeto de hacer el método más rápido y aplicable a cortes por congelación de tejidos, se ha estudiado también la tinción en un medio alcohólico: solución de tetrabromofenolsulfotaleína en metanol al 1 %. Las extensiones de sangre de rana, previamente fijadas en metanol se bañan durante un minuto con el líquido indicado, arrastrando luego el reactivo con alcohol absoluto y lavando finalmente con agua.

*Resultados obtenidos.* — Los resultados esenciales hasta ahora obtenidos con el procedimiento de la solución acuosa son:

Sangre de rana: en los hematíes, el citoplasma aparece teñido de color violeta azulado con matices que varían del anaranjado hasta el rojo azulado, según que el eritrocito en cuestión sea un normocito o una célula deforme; el núcleo de estos elementos rojos se muestra incoloro en su fondo, sobre el que resaltan acúmulos cromatínicos teñidos en violeta obscuro. En los leucocitos, el núcleo se tiñe de amarillo canario mientras que el citoplasma de los polinucleares lo hace en azul débil y las granulaciones eosinófilas en violeta intenso. Las plaque-

tas del batracio aparecen teñidas en amarillo intenso, salvo en su zona periférica que se tiñe de rojo oscuro.

Los ensayos de tinción de medula ósea de perro con el mismo procedimiento han proporcionado hasta ahora resultados deficientes, estando en estudio la modificación del reactivo para su adaptación a este preparado.

La aplicación de este tinte a los frotis vaginales, de rata o ratona, fijados también con metanol, proporciona preparaciones policrómicas muy brillantes: las células cornificadas características del estró (tejas o tempanos) toman vivo color azul mientras que los hematíes se tiñen en rojo, los leucocitos en amarillo y el moco en color naranja o violeta.

El empleo de la técnica cuyo solvente es el alcohol metílico proporciona colores celulares análogos a los antes descritos, aunque la diferenciación entre células vecinas es menos clara, por lo que evitaremos su descripción más en detalle.

### COMENTARIO

Como es sabido, en soluciones acuosas y dentro de ciertas condiciones, el TFS tiñe de amarillo el solvente si el pH es de 3 o inferior; de color azul, si es de 4,6 y de matices intermedios si se encuentra entre ambos extremos; además, comparando el color que ofrece una solución problema en presencia del TFS con el que produce este indicador adicionado a soluciones tampones de pH conocido puede determinarse la concentración de hidrogeniones de aquélla.

El caso de la tinción celular no es en modo alguno asimilable al precedente. Se opera de una parte con células desecadas y fijadas y en ellas, aun en presencia de agua, después del lavado alcohólico, el color de la estructura celular ha de provenir principalmente de la combinación de los prótidos simples y conjugados con el reactivo, al modo que éste se combina con el azul de metileno y otras sustancias. Que ello es así, puede probarse por tratamiento de proteínas diversas con el TFS en condiciones análogas a las indicadas para la tinción de los tejidos: la clara de huevo y la edestina toman color azul, la peptona, rojo y el ácido nucleico, amarillo.

Hasta que estudios ulteriores aclaren mejor el problema, debe admitirse que el TFS se fija sobre prótidos simples o con-

jugados y que el color de la formación celular del que corresponde a la combinación desecada del reactivo con uno de aquéllos o de una mezcla de aquéllos, dada la compleja constitución del citoplasma y núcleo celulares.

Desde el punto de vista práctico, resalta la formación de productos amarillos donde se encuentran sustancias de carácter ácido como el ácido nucleico, y de otros de color azul asientan prótidos de carácter básico o ácido muy débil. En ciertos casos, estos datos contribuirán a aclarar problemas de la Histoquímica que no pueden resolverse con el empleo de los colorantes corrientes de carácter ácido y básico.

### Resumen

Se propone la utilización de la tetrabromofenolsulfotaleína como tinte histológico diferencial de células y estructuras celulares. El reactivo debe utilizarse disuelto en una solución tampón de pH 3,8 de la mezcla fosfato disódico 0,2 molar y ácido cítrico 0,1 molar, aunque también proporcione resultados apreciables en solución metanólica. Los colores no pueden equipararse a los obtenidos por adición del reactivo a soluciones tampones puras, por deberse al parecer a la combinación de aquél con proteínas simples o conjugadas de la célula. En algunos casos se observa que partes celulares con punto isoelectrico inferior a 3 se colorean en amarillo mientras que otras en carácter básico o cercano a la neutralidad toman color azul. El empleo del reactivo puede contribuir a aclarar ciertos problemas de Histoquímica no abordables con los colorantes en uso.

### Summary

The use of tetrabromophenolsuphophthaicin is proposed as an histological differential stainer of cells and cellular structures. The reagent must be used dissolved in a buffer solution of 3,8 pH, obtained with the mixture of disodium phosphate 0,2 molar and citric acid 0,1 molar, although it furnishes appreciable results in a methanolic solution, too.

Those cellular components whose isoelectric point is below 3, are turned yellow by the reagent, and when above 4,6, blue.

The colours, However, must not be put on a par with those obtained by means of the reagent in different pure buffer solutions, owing to the great influence exerted on results by the reaction of the cellular proteins with the colouring stuff.