

Técnicas de tinción del calcio. Métodos de fon Kossa y Rojo Alizarin S. Estudio comparativo*

Por los Dres.:

ROBERTO WONG NAVARRO,⁽¹⁾ JOSÉ E. FERNÁNDEZ BRITO RODRÍGUEZ,^{^**)} PEDRO MOREAL ACOSTA (^{•••*}) Y PEDRO HOYO GARCÍA(^{*♦12})

Wong Navarro, R. et al. *Técnicas de tinción del calcio. Métodos de fon Kossa y Rojo Alizarin S. Estudio Comparativo*. Rev. Cub. Med. 11: 1, 1972.

Se presentan dos técnicas histoquímicas de identificación de calcio en los tejidos: las técnicas de Von Kossa y Rojo Alizarin S. Se señalan sus ventajas e inconvenientes. Se revisa la bibliografía y se señalan los principios químicos por los que actúan las mismas.

La microrradiografía de contacto y proyección ha sido, durante los últimos años, uno de los métodos de elección usado por los investigadores para el estudio de la mineralización tisular (*Harris W. 1962*). Con estos mismos objetivos solo han utilizado los estudios de depósitos fluorescentes de tetraciclina en el frente de calcificación del osteon del hueso nuevo recién formado o en formación (*Milch R. A. et al. 1957*) así como la técnica de autorradiografía usando Ca 45 y detectando su presencia en los distintos tejidos (*Harris W. 1962*)

Sin embargo, las técnicas histoquímicas para la localización del calcio en los tejidos siguen teniendo una amplia aplicación práctica y diaria en los laboratorios de histología y patología.

Son múltiples las patologías que, como una de sus manifestaciones, presentan depósitos de sales de calcio en distintos órganos, donde normalmente este mineral no se localiza. Dentro de estas patologías se destacan la calcinosis, la calcificación distrófica, la calcificación metastásica, lesiones de la glándula paratiroides, con aumento de secreción de la paratohormona, etc.

Se han usado diversos métodos histoquímicos en la determinación del calcio en los tejidos, entre ellos el de la sustitución metálica (Técnica de *Von Kossa*) y el de los colorantes de la antraquinona (Técnica del *Rojo Alizarin S*), que son los más usados actualmente (*Thom 1966, Liar 1967*).

El primero de ellos (*Técnica de Von Kossa*) es un método de sustitución metálica, donde el calcio es sustituido por la plata, formándose una sal metálica que por reducción toma color y permite su observación microscópica (*Casselman, W. G. B. 1959, McGee Russell 1958*).

El método de Rojo Alizarin S. es una técnica desarrollada más recientemente

(■) Trabajo presentado en la Sociedad Cubana de Anatomía Patológica en la Habana el 16 de julio de 1971 en sesión Extraordinaria.

([^]) Residente de segundo año de Anatomía Patológica del Hospital Militar Escuela "Dr. Carlos J. Finlay".

(^{*- !•}) Instructor J'Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital Militar Escuela "Dr. Carlos J. Finlay".

que la anterior y se basa en reacciones de lacas colorantes, que cubren los depósitos de calcio de un color rojo naranja birrefringente (*McGee Russell* 1958, *Dahl, L. K.* 1952).

MATERIAL Y METODO

Se utilizan cortes de tejido humano, fijados en formol al 10% e incluidos en parafina, de numerosos órganos como son: mucosa gástrica, riñón, corazón, timo, hueso fresco sin decalcificar, así como distintas variedades de arterias musculares y elásticas, con lesiones arterioscleróticas y calcificación.

Se le realizaron a las preparaciones las siguientes técnicas histológicas: Hematoxilina Eosina, Técnica de *Von Kossa* y la Técnica de *Rojo Alizarin S*,

En la Técnica de *Von Kossa* se utilizó como contraste la Hematoxilina-Eosina, la Hematoxilina de *TVeigert*, el Azul de Anilina y la Fuschina. Se le dio más tiempo de exposición a la luz, controlándolo microscópicamente.

En la Técnica de *Rojo Alizarin S* el tiempo de exposición del tejido al colorante se aplicó bajo control microscópico, no excediendo el período de contacto en ninguna de las variantes a los tres minutos.

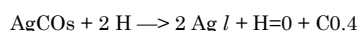
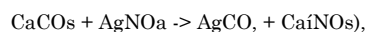
DISCUSION

Durante muchos años los depósitos de calcio tisulares se han localizado por el método de *Von Kossa*. Esta técnica se basa en la reducción fotoquímica del nitrato de plata, precipitado de los tejidos por los aniones de sales de calcio.

Los aniones de sales de calcio capaces de reaccionar con el nitrato de plata son: carbonatos, fosfatos, sulfatos, uratos, cloruros y sulfocianuros.

Tomando como ejemplo el carbonato de calcio, la reacción sería de la siguiente

manera (*Casselmann, W. G. R.* 1959, *McGee Russell.* 1958):



La localización de las sales de calcio es demostrada por el ennegrecimiento de la plata reducida.

Como los depósitos de calcio tisulares por lo general son fosfatos o carbonatos, la técnica de *Von Kossa* es capaz de sugerirnos la presencia de éstos. Sin embargo si algunos de eptosaniones no están en combinación con calcio es tal vez probable que alguno pueda reaccionar con la plata para formar una sal, no siendo posible su distinción.

Según *McGee Russell* (1958), los uratos y el ácido lórico son las únicas fuentes serias de error de este método, pero éstas se pueden distinguir por sus propiedades argentafines y su solubilidad en solución de carbonato de litio.

Remitid (1959) ha demostrado que los fijadores alcohólicos son superiores a la formalina neutra para la preservación de depósitos cálcicos en los tejidos.

Se han obtenido buenos resultados con este método en la demostración de depósitos de calcio en los tejidos estudiados. Hemos usado la fijación de Formalina neutra con buenos resultados.

El uso del método de *Von Kossa* debe dejarse para la identificación a grosso modo de las áreas de calcificación. Se plantea de que su valor es limitado para la localización precisa de los sitios de calcificación, ya que la precipitación provoca artefactos de desplazamiento y los gruesos gránulos formados impiden una buena visualización de los detalles celulares.

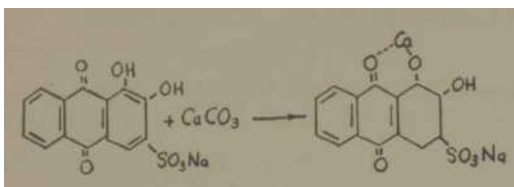
Se han obtenido pocos artefactos de desplazamiento pero a la vez no se ha

logrado una buena visualización de los detalles celulares.

El método de *Rojo Alizarin S* es una técnica mucho más nueva que la anterior, en que la especificidad del colorante por el calcio no está bien establecida, estimándose que el Sulfonato de Sodio Alizarin produce una reacción de laca colorante con carbonatos y fosfatos de calcio, depositándose sobre estas sales minerales, que toman una coloración rojo-naranja birrefringente.

Usando el carbonato de calcio como ejemplo, la reacción ocurre probablemente de la siguiente manera (Casselman, 1959, Conn, 1946) :

Las técnicas más refinadas y precisas, descritas por *fialil* (1952) y *McGee Russell* (1958), introdujeron mejoras de los métodos



más antiguos, pero no impiden los artefactos de difusión y enmascaramiento de las estructuras celulares.

Se han obtenido buenos resultados con la disminución del tiempo de exposición de los tejidos al colorante, como plantea *McGee Russell* (1958), controlándolo por observación microscópica. De todas formas, los resultados no han sido los mejores por los artefactos de difusión y el enmascaramiento de las estructuras.

Existen otros colorantes de antraquinona, que se han usado para la demostración de calcio en los tejidos, como son la Purpurina, el ácido purpurin 3 carboxilo, la Quinalizarina (Cassehnan, 1959, *McGee Russell*, 1958), así como el Rojo Calcio (*McGee Russell*, 1955). El procedimiento de coloración y los pro

bles modos de acción son semejantes a los del *Rojo Alizarin S*. Sin embargo, es más difícil el control del colorante, así como no se han obtenido buenos métodos de montaje permanente en estas otras coloraciones.

Más recientemente *Carr* y col. y *Eisenstein* y col. (1961) aplican la técnica del ácido cloranílico, originalmente usada en la búsqueda de calcio en análisis de suelos, para la identificación de este mineral en materiales biológicos. El ácido cloranílico forma sales insolubles con el Ca, Cu, Mn, Sr, Zn, Ag. Debido a la presencia sólo en trazas de estos metales en los tejidos se puede considerar este método de tinción como casi específico para el calcio. Esta técnica también produce artefactos de desplazamiento.

Kaujman (1957) describe la técnica de tinción con *Muroxide* y *Kashiva* (1963-1964) la técnica del Glioxal bis (2 hidroxilanil) o G.B.N.A. Ambos compuestos son agentes quelantes que se unen fuertemente a los metales iónicos para formar estructuras cíclicas estables.

CONCLUSIONES

1. La técnica de *Von Kossa* tiene el inconveniente de llevar más tiempo en su preparación, ser más reactivo y poseer un proceso más complicado. Como ventaja presenta la escasa presencia de artefactos en las preparaciones.
2. La técnica de *Rojo Alizarin S* es mucho más rápida y sencilla su realización, sin embargo, se han obtenido numerosos artefactos de difusión y el enmascaramiento de las estructuras dificulta su interpretación, por la no exacta precisión de los límites del área calcificada.
3. A pesar de los inconvenientes señalados, ambos métodos tienen gran utilidad en la identificación de depósitos

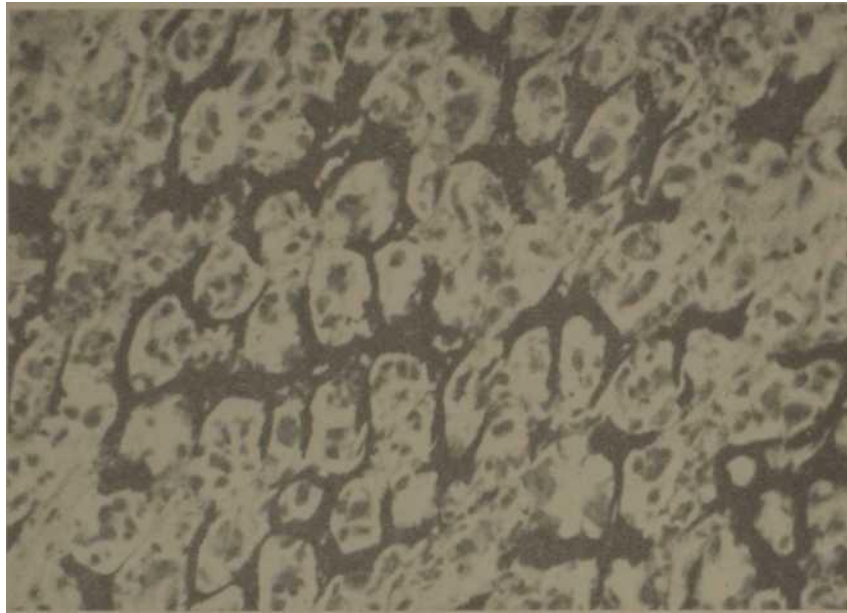


Fig. 1.—Observe depósitos de sales de calcio de color negro a nivel de la membrana basal de la mucosa gástrica. (Técnica de Von KossaJ (200X)

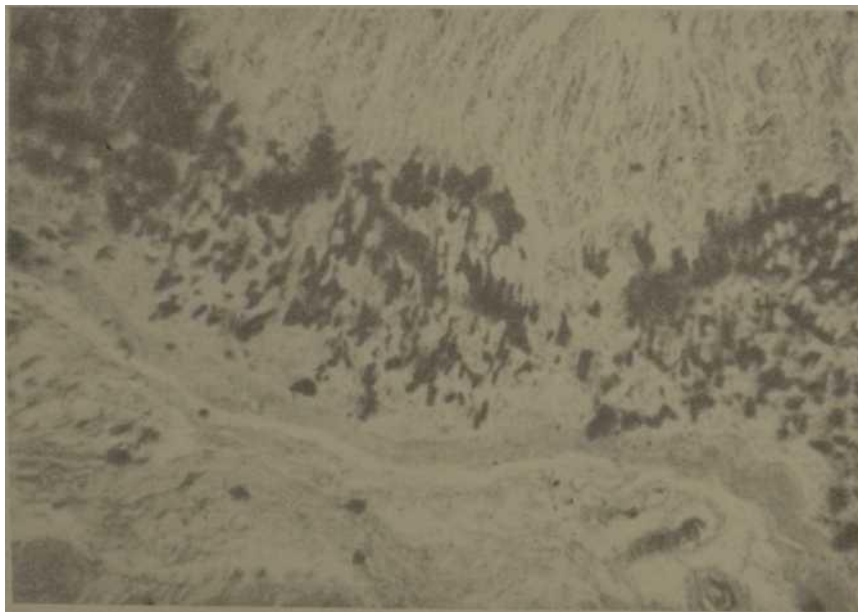


Fig. 2. Mucosa gástrica observándose depósitos de calcio de color negro (en colores de color rojo intenso). (Técnica de Rojo Alizarin Sj (100X)

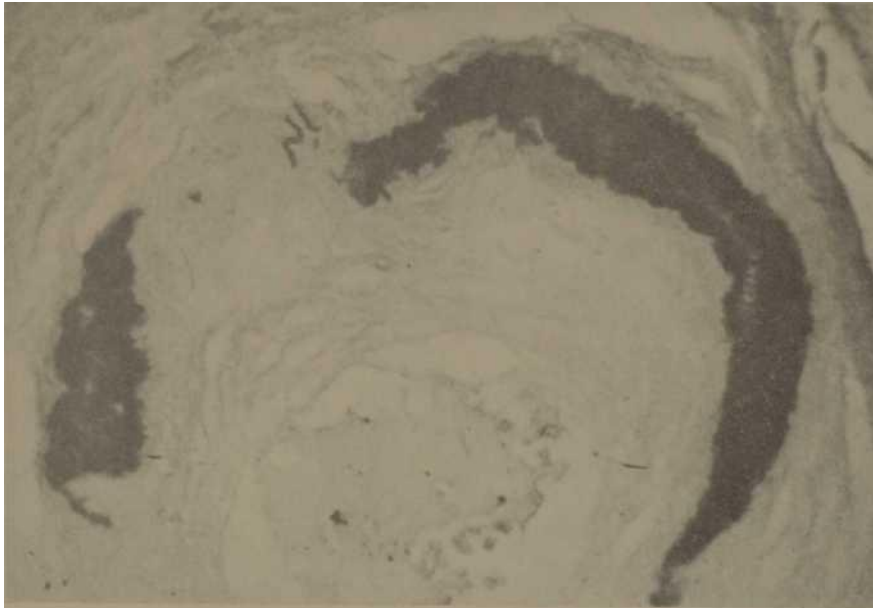


Fig. 3.—Técnica de Von Kossa. Se observa depósito de calcio en pared arterial de color negro. (200X)

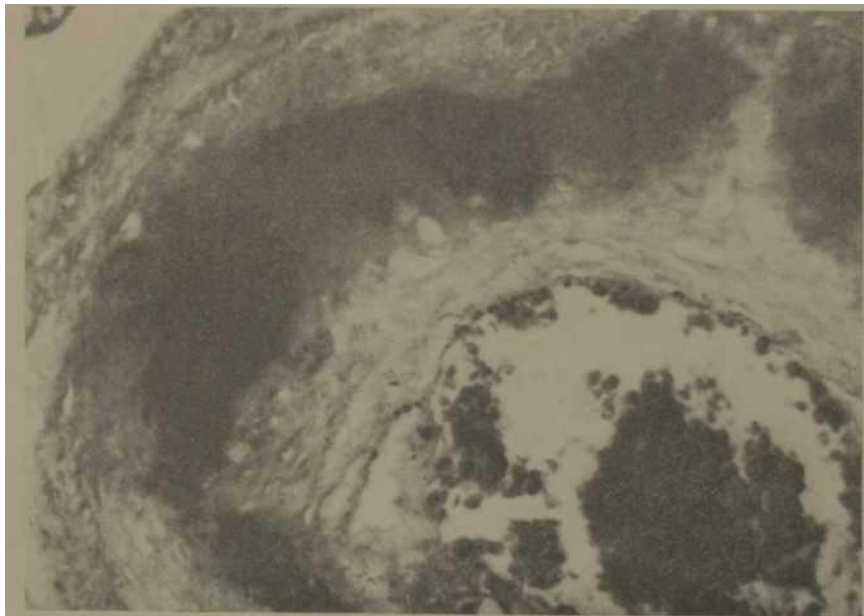
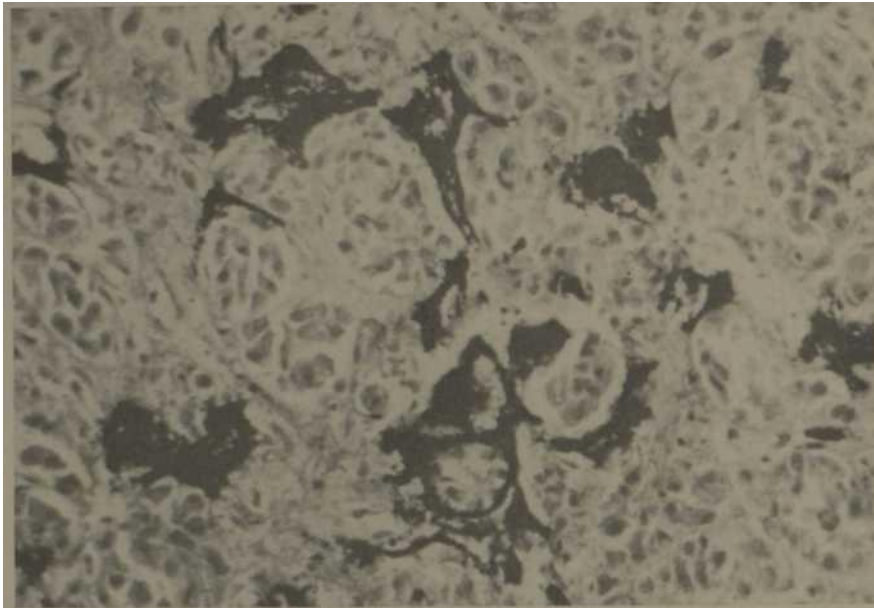
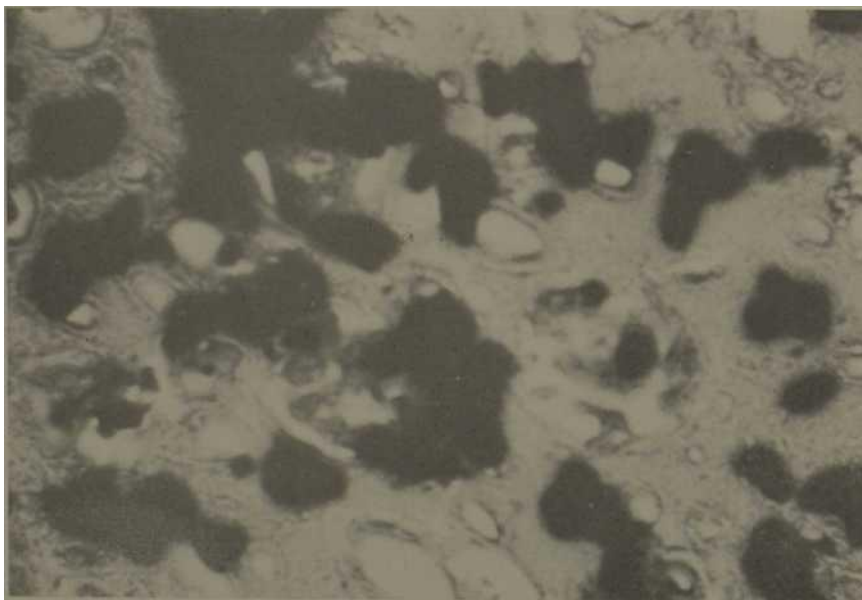


Fig. 4.—Se aprecian depósitos de sales de calcio en pared arterial de un color negro por técnica de Rojo Alizarín S. (en colores de color rojo intenso). (200X)



*Fig. 5.—Preparación de riñón en la que se aprecian sales de calcio de color negro.
(Técnica de Von Kossa) (200X)*



*Fig. 6.—Se observa en corte de riñón, depósitos de sales de calcio de color negro
(en colores de color rojo intenso). (Técnica de Rojo Alizarin S.) (200X)*

de calcio en los tejidos, siendo estas técnicas en general de fácil montaje y se

pueden utilizar en los servicios de Histología y Patología.

SUMMARY

Wonji Navarro, R., et al. *Calcium staining techniques. Von Kossa and Rojo Alizarin S. methods. A comparative study.* Rev. Cub. Med. 11: 1, 1972.

Two histochemical techniques for calcium identification in tissues are presented. Advantages and obstacles of Von Kossa and S. alizarin red techniques are pointed out, bibliography was reviewed and the chemical principles by which these techniques act are emphasized.

RESUME

Wong Navarro, R., et al. *Techniques pour teindre le calcium. Methodes de Von Kossa et Rojo Alizarin S. Etude comparative.* Rev. Cub. Med. 11: 1, 1972.

On présente deux techniques histochimiques pour identifier le calcium dans les tissus. On souligne les avantages et les inconvenances de Von Kossa et Rojo Alizarin S. On fait la révision de la bibliographie et on signale les principes chimiques qui les font agir.

PE3ME. BOHT HaBappo^P. .H jtp. MeTojm OKpacKH KajiBnjra.CnocoOH Von Kossa H Rojo Alizarin s.CpaBHHTejilHoe HCCjieBOBaHHe. Rev. Cub. Med. 11:1, 1972

ИпHBOjiaTCfl jtBa rncTOXHMmecKHx cнocoá n03H0BaHM KajiBmw b tkshhx : OTMe^aiOTCfl npemymecTBa O HejocTaTKH.JI,ejiaeTCH nepecMOTp JoiTepaTypH h yKa3HBAeTCH Ha xmiireeckjie npEHixnnH.cJiy.TOiuie ochoboé sthx cнoco- óob.

BIBLIOGRAFIA

1. *Barka, T. M. D. y Anderson, P. J. M. D.*: Histoquímica Atika S. A. *Vil*: 203-207. 1967.
2. —*Carr, L. B. Rumbo O. N. and Feichtmeir, T. V.*: A method of Demonstrating calcium in Tissue Section using chloranile acid. *J. Histochemcytochem.* 9: 415-417. 1961.
3. —*Casselmann, IV.G.B.* Histochemical Technique, New York, John Wiley and Soné Inc. PP 148-161, 1959.
4. *Conn. 11. J.*: Biological Stains, 5a. Ed. Geneva New York. Biotech Publications P. P. 80, 1946.
5. —*Eisenstein. R.; Werner.M.; Papatiamis, S.; Konotzki, W. and Laing, I.*: Chloranilic Acid as a histochemical reagent for calcium. *J. Histochem. Cytochem.* 9: 154- 156, 1961.
6. —*Harris. W. II. et al.* (1962) The in vivo Distribution of Tetracyclines in canine Bone. *J. Bone Joint Surg.* 44: A: 1308-20.
7. —*Kashiva, II. K. and Atkinson. W. I?.*: The applicability of a New Schiff base, Glioxal bis (2 hidroxyanil) for the Cytochemical localization of ionic calcium, *J. Histochem.* 11: 258-264, 1963.
8. *Kashiva. II. K. and House, C. M., Jr.*: The GLIOXAL BIS (2-Hidroxyanil) Method Modified for Localizing Insoluble Calcium salts, *Stain Tech.* 39: 359-367. 1964.
9. —*Kaufman, H. E. and Adams E. C.*: Muroxide, Another Approach to the Histochemical Staining of Calcium.
10. —*Me Gee Russell, S. M.*: A new Reagent for the histochemical and Chemical Detection of Calcium, *Nature*, 175: 301-302, 1955.
11. *Me Gee Russell. S. M.*: Histochemical Technique Methods for Calcium, *J. Histochem and Cytochem.* 6: 2242, 1958.
12. —*Milch, R. A. et al.*: Bone Localization of the Tetracyclines. *J. Nat. Cáncer Ins.* 19: 87-93, 1957.
13. —*Renaud, S.*: Superiority of Alcoholic over Aqueous Fixation in the histochemical Detection of Calcium. *Stain Technol.* 34: 267-271, 1959.
14. *Thompson, S. W. D. V. M. M. S.*: Selected Histochemical and Histopathological Methods. Charles C. Thomas Publisher. 9: 581-585. 1966.