

**COLORANTES ANARANJADOS Y AMARILLOS.** — En este grupo pueden incluirse las siguientes substancias: *vesubina* ó *pardo Bismarck*, *naranja G.*, *tropeolina*, *sudán III*, etc., á las que habría que añadir el ácido pícrico y el yodo ya estudiados entre otros reactivos.

*Vesubina.* — Es soluble en el alcohol y agua. Es un buen colorante nuclear, pero generalmente se emplea como colorante de fondo.

*Naranja G.* — La disolución acuosa de esta substancia posee reacción ácida; tiñe la cromatina nuclear, empleándose ordinariamente en unión de otros colorantes ácidos para la obtención de coloraciones policrómicas.

*Sudán III.* — Es una substancia modernamente introducida en la técnica histológica. Se disuelve bien en el alcohol absoluto. Es un colorante electivo de las grasas á las que comunica un tinte naranja intenso.

**COLORANTES VERDES.** — En este grupo pueden incluirse, entre otros principales, el *verde de metilo*, soluble en el agua y en el alcohol y colorante nuclear; el *verde al yodo*, cuyo empleo se ha restringido mucho en estos tiempos; el *verde malaquita*, soluble en agua y empleado como colorante de fondo; el *verde luz F.S.*, soluble en agua y alcohol, que es una substancia tintórea, plasmática, muy ácida y que se emplea casi siempre en dobles coloraciones, y, finalmente, la *dinitrorresorcina* ó *echtgrün* de los alemanes, poco soluble en agua y más en alcohol, y que como el anterior es un buen colorante plasmático.

**COLORANTES AZULES.** — A la cabeza de este grupo debe figurar por sus múltiples aplicaciones y por el buen éxito que de ellas se obtiene el *azul de metileno*. Merecen citarse también, entre los colorantes azules, el *carmin de índigo*, el *azul Victoria*, el de *Lión*, el de *toluidina* y el de *quinoleína* ó *cinina*.

*Azul de metileno.* — Es una substancia soluble en el agua y en el alcohol y cuya importancia en técnica ha crecido de día en día, tanto que hoy en los laboratorios figura al lado del carmín y de la hematoxilina. Aparte de que es un buen colorante nuclear tiene la propiedad de teñir electivamente el tejido nervioso é impregnar muchos elementos en vivo. Como quiera que las fórmulas que se emplean son especiales para la tinción en vida y la del tejido nervioso, de ellas nos ocuparemos cuando tratemos en la técnica especial de los métodos correspondientes.

*Carmin de índigo.* — Es una substancia que se extrae de una leguminosa y que en el comercio se presenta en forma pulverulenta, constituyendo la sal sódica ó potásica del ácido sulfoindigótico. Es un colorante plasmático, no empleándose solo, sino en combinación con otros colorantes como materia tintórea de contraste, unas veces solo y otras mezclada con el ácido pícrico. Solo, se usa en la siguiente fórmula debida á WOODWARD:

Disolución acuosa saturada de carmín de	
índigo. . . . .	II gotas
Alcohol de 95° . . . . .	30 cent. cúb.

Filtrese antes de usarlo.

Unido con el ácido pícrico se emplea en la siguiente mezcla ideada por CAJAL y que da muy buenos resultados en los métodos tricrómicos de coloración:

Carmín de índigo . . . . .	25 centigr.
Disolución acuosa saturada de ácido pícrico.	100 cent. cúb.

COLORANTES VIOLETAS.—El principal de este grupo es la *hematoxilina*, y á su lado deben figurar la *tionina*, el *violeta de metilo*, el de *genciana*, el de *dalia* y el de *anilina*.

*Hematoxilina*. — Es una substancia cristalizada que se extrae del palo de campeche, poco soluble en agua, más en alcohol y muy soluble en las disoluciones de alumbre y otras sales alcalinas. Se ha demostrado que su poder tintóreo no se presentaba hasta pasado cierto tiempo de haberse disuelto ó después de la adición de ciertas substancias, debido este fenómeno á la formación de un cuerpo llamado *hematenia amoniaca*, cuyo cuerpo se encuentra hoy ya en el comercio, pudiéndose emplear directamente en disolución. La hematoxilina tiñe con gran intensidad la cromatina nuclear, y se emplea, bien en substancia, bien en forma de hemateína, en las siguientes fórmulas:

1.º Hemateína aluminosa de MAYER.

Hemateína . . . . .	1 gramo
Alcohol de 90º caliente . . . . .	50 cent. cúb.

Disuélvase y agréguese:

Alumbre . . . . .	50 gramos
Agua destilada . . . . .	1000 cent. cúb.

Déjese enfriar y fíltrese.

2.º Hematoxilina de BÖEHMER. Se preparan dos disoluciones.

I. Hematoxilina . . . . .	1 gramo
Alcohol absoluto . . . . .	12 gramos
II. Alumbre . . . . .	1 gramo
Agua destilada . . . . .	240 gramos

Para emplear esta fórmula se usa en el momento, empleando en un vidrio de reloj ó en un pocillo de porcelana II gotas de la disolución I que se agregan á 5 centímetros cúbicos de la II.

3.º Fórmula de DELAFIELD.

Hematoxilina . . . . .	4 gramos
Alcohol de 70º . . . . .	25 cent. cúb.
Disolución saturada de alumbre de amoníaco . . . . .	400 —

Déjese al aire y á la luz por espacio de tres ó cuatro días y agréguese:

Glicerina . . . . .	100 cent. cúb.
Alcohol metílico . . . . .	100 —

Déjese en reposo para que madure por espacio de seis á ocho semanas, fíltrese y guárdese en un frasco bien tapado.

## 4.º Hematoxilina ácida de EHRlich.

Hematoxilina . . . . .	2 gramos
Acido acético cristalizable . . . . .	10 cent. cúb.
Disolución saturada de alumbre . . . . .	100 —
Alcohol absoluto . . . . .	100 —
Glicerina . . . . .	100 —

Déjese todo al aire hasta que la mezcla adquiera un color rojo obscuro, fíltrese y consérvese en frascos bien tapados.

## 5.º Fórmula de HANSEN. Se preparan tres disoluciones.

A.—Hematoxilina . . . . .	1 gramo
Alcohol absoluto . . . . .	10 cent. cúb.
B —Alumbre . . . . .	20 gramos
Agua destilada . . . . .	200 cent. cúb.

Fíltrese y guárdense estas disoluciones en frascos bien tapados durante veinticuatro horas, al cabo de las cuales se mezclan y se añaden 3 centímetros cúbicos de una disolución de permanganato de potasa (1 gramo de permanganato en 16 centímetros cúbicos de agua destilada); se calienta la mezcla hasta la ebullición que debe durar un minuto, se enfría rápidamente, para lo cual se hace flotar la vasija donde se haya preparado la fórmula en agua fría, se filtra y se conserva en frascos bien tapados. Esta fórmula tiene la inmensa ventaja de que puede emplearse inmediatamente después de preparada.

*Tionina.* — Es una materia colorante que se emplea actualmente con brillantes resultados por la propiedad que posee de desdoblarse en contacto de ciertas substancias produciendo dobles coloraciones, pues mientras que unas partes quedan teñidas en violeta, otras lo son en un rojo purpúreo intenso. Se usa en disoluciones concentradas acuosas ó alcalinas, pudiendo también aplicarse en técnica histológica la fórmula propuesta por NICOLLE para la tinción de las bacterias:

Tionina. . . . .	5 centigr.
Acido fénico . . . . .	2 gramos
Alcohol absoluto . . . . .	10 cent. cúb.
Agua destilada . . . . .	100 —

Las demás substancias de este grupo tienen más aplicaciones en bacteriología que en histología, por lo que no nos detendremos en hacer su estudio; sin embargo, hace algún tiempo se usaba el azul de quinoleína ó cianina como colorante electivo de las grasas, habiéndose abandonado actualmente por tratarse de una substancia que tiñe difusamente y no ofrece ninguna ventaja.

Para terminar con el grupo de los colorantes añadiremos que existen algunas substancias como la *nigrosina*, las *indulinas* y el *kernschwarz*, solubles en agua y alcohol, cuyas disoluciones tiñen en negro más ó menos azulado los elementos y tejidos.

**Materias diversas.** — En este grupo incluimos ciertas substancias, tales como el bálsamo del Canadá, la resina de DAMMAR, la gelatina, la celoidina

y la parafina, que en realidad no tienen colocación en ninguno de los grupos anteriores.

*Bálsamo del Canadá.* — Es una resina que se presenta en el comercio en estado líquido y sólido. El bálsamo del Canadá sólido se disuelve en xilol, éter, cloroformo, esencia de trementina y bencina. La más empleada como substancia conservadora de las preparaciones histológicas y cementadora á la par es la disolución en xilol. Algunas veces se usa el bálsamo sólido derretido por el calor para conservar ciertas preparaciones cuya coloración podría alterarse con los disolventes de esta substancia.

*Resina Dammar.* — Se usa lo mismo que el bálsamo del Canadá y se disuelve en los mismos medios, teniendo, sin embargo, la ventaja de que sus disoluciones son casi incoloras, lo cual permite apreciar detalles mucho más finos en las preparaciones histológicas.

*Betún de Judea.* — Materia sólida, de color negro, que se emplea en disoluciones concentradas en la esencia de trementina como cemento para cerrar las preparaciones conservadas en medios líquidos.

*Lacre.* — Lo mismo que el anterior en cuanto á sus usos, empleándose como disolvente el alcohol.

*Gelatina.* — El único empleo práctico que tiene en la técnica histológica, es para la preparación de las masas de inyección, disuelta en agua caliente.

*Celoidina.* — Es una substancia sólida que se emplea disuelta en éter y alcohol absoluto para inclusión. Cuando tratemos de los métodos generales nos ocuparemos con más detención de esta substancia, así como de la *parafina* y de la *goma* que se usan también con el mismo objeto.

---

## CAPITULO IV

### MÉTODOS HISTOLÓGICOS GENERALES

La aplicación sistemática de los instrumentos de preparación y de los reactivos á los elementos y á los tejidos para colocarlos en condiciones de ser observados con provecho en el microscopio, constituyen los métodos histológicos. Ahora bien, como ya indicamos con anterioridad, estos métodos pueden ser de aplicación general á todos ó á un gran grupo de tejidos, ó de aplicación especial á un tejido ó á un corto número de ellos. De aquí se deduce la división de los métodos en generales y especiales. Los primeros, que son de los que nos hemos de ocupar en esta parte, que se consagra al estudio de la técnica general, pueden subdividirse en tres grandes grupos: métodos para el examen de los elementos vivos, métodos analíticos ó de disociación y métodos sintéticos ó de los cortes.

Los métodos para el examen de los elementos vivos tienen como fina-

lidad colocar en las mismas condiciones, si no iguales, por lo menos aproximadas, á las células y tejidos que aquellas en que se encuentran en los organismos vivientes.

Los métodos analíticos ó de disociación se emplean cuando el histólogo necesita aislar unos elementos de otros, y estudiarlos en su forma y estructura individual sin detenerse en considerar las relaciones mutuas de tales elementos, su topografía en cada uno de los tejidos y las modificaciones que el sitio donde se encuentran imprimen en la característica específica de cada uno de ellos.

Por el contrario, los métodos sintéticos tienen por objeto el estudio de las células y de las materias intercelulares en la misma situación que se encuentran en el organismo, con sus relaciones mutuas y con los caracteres especiales de sitio, forma, color, etc., etc.

Dejando aparte el examen de los elementos vivos, debemos indicar que en los dos últimos grupos de métodos (analíticos y sintéticos) hay algunos de ellos comunes á ambos, por ejemplo, la fijación. Pero con objeto de no complicar este estudio incluiremos dentro del grupo de los métodos sintéticos todos los procedimientos preliminares que han de conducir hasta la práctica de los cortes, dejando para los analíticos única y exclusivamente la disociación.

Como complemento necesario de los métodos tanto analíticos como sintéticos estudiaremos á guisa de apéndice los procedimientos de conservación de las preparaciones histológicas.

Para que sirva á modo de programa y como resumen de cuanto llevamos expuesto, condensamos en el adjunto cuadro sinóptico las divisiones y subdivisiones de los métodos generales.

MÉTODOS HISTOLÓGICOS GENERALES . . .	}	Examen en vida.	
		Analíticos (Disociación) . . . . .	{ Mecánica. Química. Mixta (Inyecciones).
		Sintéticos . . . . .	{ Fijación. { Por medios físicos. { Por medios químicos. Decalcificación. Induración. Inclusión. Sección. Coloración.
		De conservación . . . . .	{ Conservación propiamente dicha. Cementación.

#### EXAMEN DE LOS ELEMENTOS Y TEJIDOS VIVOS

El estudio de los elementos y tejidos vivos puede realizarse en las células sueltas que por sí solas constituyen un organismo, como ocurre en los protozoarios y protofitos, ó en las células que forman parte de los tejidos de los animales y vegetales superiores. Cuando se trata de examinar un ser vivo monocelular con el microscopio, basta depositar en un portaobjetos

una gota de agua, y de esta manera pueden observarse las funciones de una multitud de infusorios, bacterias, algas, etc., etc. Cuando se trata de estudiar los elementos que forman parte de un organismo pluricelular, es necesario colocarlos en las mismas ó parecidas condiciones de medio que aquellas en que se encuentran en el organismo á que pertenecen. De aquí se deduce que los elementos pertenecientes á los tejidos de animales de sangre caliente deberán ser observados en medios que, aparte de su composición química igual ó parecida á los naturales, posean una temperatura apropiada.

Trátense de elementos procedentes de los animales de sangre caliente ó de los que se obtengan de los de sangre fría, una de las primeras condiciones que deben tenerse en cuenta en toda observación microscópica, es la preparación del medio químico en el cual han de ser observados estos elementos. Los principales medios químicos que se usan para la observación de elementos vivos son los que se conocen con el nombre de reactivos indiferentes ó inofensivos y que pueden dividirse en sueros naturales y sueros artificiales.

**Sueros naturales.** — Entre ellos se encuentran: el suero sanguíneo, el líquido amniótico y el humor acuoso.

*Suero sanguíneo.* — Se puede obtener por la coagulación de una pequeña cantidad de sangre recogida en una vasija, la cual una vez coagulada deja escapar el suero por retracción del coágulo, siendo luego fácil recoger aquél.

*Líquido amniótico.* — Puede recogerse del amnios en los fetos de vaca en los mataderos. Para usarlo conviene siempre filtrar y emplearlo inmediatamente. Tiene el inconveniente de alterarse con rapidez, por lo cual algunos autores aconsejan la adición de algunos cristales de yodo, pero en este caso tiene la desventaja de alterar los elementos.

*Humor acuoso.* — Es un excelente medio inofensivo por su transparencia, por su composición química y por la facilidad de su obtención, pues basta picar con un tubo capilar la córnea de un animal (rana, conejo, etc.), para obtener unas cuantas gotas de líquido que depositadas ulteriormente en un portaobjetos, pueden servir para la observación en vida durante algún tiempo de una porción de elementos.

**Sueros artificiales.** — Tienen el inconveniente de que las substancias de que se componen alteran más ó menos profundamente la estructura de ciertos elementos; pero, en cambio, tienen la ventaja de ser mucho más estables que los naturales. A continuación insertamos algunas de las fórmulas más corrientes de sueros artificiales:

1.º Disolución fisiológica de sal:

Cloruro de sodio . . . . .	75 centígr.
Agua destilada . . . . .	100 gramos

2.º Suero artificial de KRONECKER:

Cloruro de sodio . . . . .	6 gramos
Sosa cáustica . . . . .	6 miligr.
Agua destilada . . . . .	1000 gramos

## 3.º Suero artificial de FREY:

Clara de huevo . . . . .	30 gramos
Cloruro de sodio . . . . .	4 centigr.
Agua destilada . . . . .	270 gramos

A este líquido pueden agregarse 6 gramos de yodo con objeto de que se conserve casi indefinidamente.

El estudio de los elementos y tejidos vivos puede realizarse con el microscopio empleando los anteriores medios y usando los siguientes procedimientos: examen inmediato, cortes, raspado, disociación, extensión, examen en la platina caliente y coloración. Todas las observaciones que se practiquen para el estudio de los elementos vivos deben verificarse en la cámara húmeda, excepto las que se verifiquen en los elementos que necesitan una temperatura constante que se realizarán en la platina caliente.

*Examen inmediato.* — Algunos tejidos y elementos pueden estudiarse sin la adición de ningún medio químico, sobre todo cuando se trata de tejidos de substancia fundamental líquida, como la sangre y la linfa, ó de humores que llevan en suspensión células vivas como el esperma, en cuyo caso basta depositar una gota en la cámara húmeda para que pueda ser directamente observada en el microscopio.

*Cortes.* — Hay algunos tejidos, como, por ejemplo, el cartilaginoso, que pueden seccionarse en fresco sin previa induración, pues su consistencia es la suficiente para que puedan obtenerse cortes muy finos y que directamente pueden observarse en el microscopio. Para practicar estos cortes se usa una navaja ordinaria y las secciones obtenidas se observan en una gota de suero artificial ó natural cubriéndola con una laminilla; en estas condiciones los elementos permanecen sin alterarse durante algún tiempo.

*Raspado.* — Es un procedimiento de disociación en vivo, y se usa para observar los elementos sueltos de ciertos tejidos cuyas células se hallan unidas entre sí. Para realizar un raspado, se pasa el borde cortante de un escalpelo colocado perpendicularmente á la superficie del órgano del que se quieran obtener los elementos aislados, cuidando de comprimir muy poco, y después de haberlo pasado en una extensión mayor ó menor se deposita el producto obtenido sobre un portaobjetos, diluyéndolo en una gota de suero y así pueden observarse elementos aislados, tales como las células epiteliales de la boca, lengua, esófago, tráquea, los elementos linfáticos del bazo, ganglios linfáticos, etc.

*Disociación.* — Este procedimiento de disociación no se diferencia en nada del que se realiza con los tejidos muertos, y por lo tanto en el capítulo siguiente nos ocuparemos de él con más detención.

*Extensión.* — Se emplea en los tejidos membranosos, tales como el tejido conjuntivo. Para realizarlo, con unas pinzas y unas tijeras curvas se desprende una pequeña porción de la membrana que se coloca en una gota de suero sobre un portaobjetos. Después con las agujas se estira ligeramente la membrana y se completa la extensión realizando pequeñas tracciones con los pulpejos de los pulgares, acabando por desecarse los bordes y quedar adheridos al portaobjetos.

*Examen en la platina caliente.* — Las observaciones de los elementos

vivos, siguiendo los procedimientos antes indicados, pueden realizarse en un portaobjetos ordinario ó en la cámara húmeda de observación de RANVIER, cuando se trate de elementos pertenecientes á animales de sangre fría. Pero cuando las observaciones se realicen con células ó tejidos de animales de sangre caliente es necesario recurrir al empleo de la platina de temperatura constante ya descrita entre los instrumentos de preparación.

Para obviar los inconvenientes que presentan estos instrumentos, BLANC ha ideado el siguiente procedimiento: se cubre la platina del microscopio con una hoja de papel chupón grueso que se horada en su centro con un orificio redondo de un centímetro de diámetro; las preparaciones se hacen en portaobjetos gruesos (de 2 milímetros de espesor); estos portaobjetos deben ser colocados previamente en una placa metálica, la cual se habrá calentado en un baño de maría á una temperatura de 40°; trasladadas estas preparaciones á la platina del microscopio pueden observarse durante algunos instantes.

*Coloración de los elementos vivos.* — Hay algunas sustancias colorantes que tiñen las células sin matarlas, por ejemplo, el pardo Bismark, que colorea el protoplasma de color moreno claro y el núcleo más intensamente en disoluciones al 1 por 100. El azul de metileno, que en disoluciones al 1 por 1000 en suero fisiológico, tiñe intensamente los núcleos de algunos animales monocelulares y de los elementos de muchos tejidos de los animales superiores. La alizarina sulfoconjugada violeta puede emplearse con éxito para demostrar la existencia de los jugos digestivos ácidos en los protoplasmas de ciertas células, puesto que dicha sustancia colorante tiene la propiedad de teñir en violeta el núcleo y virar al rojo en contacto con los referidos jugos.

Para teñir los elementos vivos basta mezclar en el portaobjetos una gota de la sustancia colorante con otra de suero en el que se encuentren en suspensión las células que se deseen colorear.

---

## CAPITULO V

### DISOCIACIÓN

La disociación tiene por objeto aislar los elementos anatómicos con el fin de estudiar su forma. La disociación puede realizarse de tres maneras: mecánicamente, químicamente y por medio de inyecciones con masas solidificables. Este último procedimiento no es en realidad un método de disociación en el estricto sentido de la palabra, sino un procedimiento

de diferenciación mediante el cual se pone de manifiesto el sistema vascular, gracias á la penetración en él de una substancia solidificable, que siendo coloreada permite diferenciarle del resto de los tejidos; así, pues, como complemento de los métodos de disociación, estudiaremos los de inyección.

**DISOCIACIÓN MECÁNICA.** — Puede realizarse, siguiendo distintos procedimientos, entre los que deben estudiarse la disociación con las agujas, el raspado, la pincelación y las inyecciones intersticiales.

*Disociación con las agujas.* — Se aplica de preferencia para aislar los elementos de los tejidos constituidos por fibras. En términos generales, la disociación se realiza con las agujas enmangadas ayudadas por las pinzas. El objeto que se ha de disociar se coloca en una vasija llena de agua destilada ó en un portaobjetos. Si el objeto es pequeño, la preparación que se ha de disociar se coloca en la platina del microscopio simple; si es de tamaño regular puede situarse el portaobjetos sobre el *fotóforo* de RANVIER (que no es más que una caja con un espejo inclinado en un ángulo de 45° y sobre el que se halla una lámina de vidrio horizontal) ó sobre un pocillo de porcelana, cuyo fondo blanco y brillante refleja suficientemente la luz: cuando el objeto es muy blanco conviene verificar la disociación sobre fondo negro. La operación de disociar se lleva á cabo cogiendo una aguja en cada mano á modo de pluma de escribir, reuniendo las dos puntas, aplicándolas juntas en un sitio determinado de la preparación y apartándolas después con un movimiento regular. Esta operación se repite varias veces hasta que las porciones aisladas sean casi invisibles á simple vista. Para obtener una buena disociación con las agujas, es necesario tener presente las siguientes reglas: 1.º el movimiento de las agujas debe ser muy regular á fin de evitar desgarros en el tejido; 2.º el operador debe hallarse cómodamente colocado, para que sus movimientos no sean bruscos, apoyando todo el antebrazo y el borde cubital de la mano sobre la mesa de trabajo con el fin de que sean únicamente los dedos los que se muevan; y 3.º las agujas deben tener unas puntas muy finas, no debiéndose emplear las que sean muy blandas ó estén despuntadas.

*Raspado.* — Es el mismo procedimiento indicado al tratar del examen de los elementos vivos, por lo cual no insistimos en su descripción.

*Pincelación.* — Es un procedimiento que se usa para aislar en los cortes ciertos elementos que se hallan incluidos en las mallas de un tejido reticular, como, por ejemplo, las células linfáticas que se hallan en el tejido cavernoso de los ganglios. Para realizar esta operación, los cortes ó las membranas se colocan en una vasija con un poco de agua destilada, alcoholizada ó ligeramente salada, se extienden bien procurando que floten y con un pincel de pelo de marta muy fino se golpean verticalmente hasta que el corte ó la membrana tome el aspecto de un encaje muy delicado. En el líquido donde se ha realizado la pincelación se hallan los elementos sueltos, mientras que el corte membrana ó queda reducido á su estroma reticular.

*Inyecciones intersticiales.* — Se emplean para aislar los elementos contenidos en algunos tejidos que poseen cavidades ó intersticios dilatables mediante la introducción de líquidos. Más que un procedimiento de diso-

ciación es un método de apartamiento de las células, puesto que con las inyecciones intersticiales nunca se las aísla en absoluto, únicamente se alejan unas de otras. Para practicar una inyección intersticial se puede usar una jeringuilla de PRAVAZ, empleando como líquido de inyección el agua destilada, el suero ó diversas sustancias colorantes.

**DISOCIACIÓN QUÍMICA.** — Es la que se obtiene mediante la acción de los reactivos. Obran éstos disolviendo las materias intercelulares ó reblaneciéndolas de tal modo que es mucho más fácil terminar la disociación iniciada por las sustancias químicas con los medios mecánicos ya descritos. Para la aplicación de los disociadores químicos basta introducir un trozo de tejido en el reactivo apropiado, en el cual deberá permanecer un tiempo variable según la naturaleza del reactivo y la composición del tejido. Debe tenerse presente, como regla general, que la cantidad de líquido disociador ha de ser en la generalidad de los casos mucho más grande que el volumen del tejido que se ha de disociar.

Los principales reactivos que se usan como disociadores son: el alcohol al tercio, el suero yodado, los ácidos crómico, nítrico y sulfúrico y la potasa y la sosa.

*Alcohol al tercio.* — Ideado por RANVIER, es un excelente reactivo disociador para los elementos epiteliales, las células glandulares y las fibras musculares estriadas. Su aplicación es muy sencilla: los fragmentos de tejidos ú órganos frescos se colocan en veinte ó treinta veces su volumen de alcohol al tercio, donde se les deja permanecer de veinticuatro á cuarenta y ocho horas, al cabo de las que, después de lavados en agua, se acaba la disociación con las agujas ó, según recomienda VIALLETÓN, se recurre al procedimiento de BOVIER-LAPIERRE, que consiste en pegar á una de las ramas de un diapasón que dé cien vibraciones por segundo y que se ponga en movimiento con un electroimán un pequeño tubito de ensayo donde se coloca el tejido y el líquido disociador.

*Suero yodado.* — Fué muy empleado hace algún tiempo y puede prepararse añadiendo yodo al líquido amniótico ó á cualquiera de los sueros artificiales. Para emplearlo se coloca un fragmento de tejido que no llegue á 1 centímetro cúbico de volumen en 4 ó 5 de suero en un frasco bien tapado hasta que se encuentre completamente macerado, teniendo cuidado de agregar unas cuantas gotas de suero yodado sin usar, siempre que se vea que el líquido empleado se decolora. Se termina la disociación sobre el portaobjetos con las agujas ó mediante raspado.

*Ácido crómico.* — En disoluciones muy tenues da buenos resultados como disociador, sobre todo para los elementos del sistema nervioso central, empleándolo en la concentración de 2 á 3 por 10000. Se termina la separación de los elementos con las agujas teniendo cuidado de lavar los tejidos, después de la acción del reactivo, en agua abundante.

*Ácido nítrico y sulfúrico.* — El primero se usa como disociador en disoluciones al 20 por 100, y el segundo se emplea mezclado con agua destilada en la proporción de una gota por cada centímetro cúbico. Tienen ambos el grave inconveniente de ser muy enérgicos, alterar la estructura de los elementos disociados y dificultar las ulteriores coloraciones, por lo que casi no se usan más que para la disociación de las células córneas de los

pelos, de las uñas y para las fibras del cristalino. Algunos autores, sin embargo, recomiendan el ácido nítrico diluído para aislar las fibras musculares lisas. Inútil nos parece indicar que los elementos disociados con estos ácidos deben ser lavados con agua abundante.

*Potasa y sosa.* — Ambas se emplean en disoluciones al 40 por 100 que tienen la propiedad de disolver los cementos intercelulares, respetando en cierto modo la forma y estructura de los elementos. Con estos reactivos en la mayoría de los casos no hace falta completar la disociación con los medios mecánicos, pues después de la permanencia de los tejidos en estos líquidos por espacio de corto tiempo, basta recoger con una pipeta un poco del líquido disociador y depositar una gota en el portaobjetos para observar los elementos completamente sueltos.

*Inyecciones.* — Consiste este procedimiento en la introducción, en el aparato vascular, de una masa coloreada y solidificable, que rellena las arterias, venas y capilares, los hace visibles, destacando sobre el fondo general de los tejidos. Como se comprenderá por esta definición, las inyecciones son procedimientos de disociación por diferenciación óptica, ya que no se aíslan los vasos del resto de los tejidos, sino que mediante una masa coloreada se les hace resaltar de los demás componentes de un órgano que permanecen incoloros ó se tiñen ulteriormente con otras sustancias que forman contraste con la masa de inyección.

Hemos de ocuparnos, al estudiar las inyecciones, de los diversos instrumentos para realizarlas, de las masas de inyección y del manual operatorio. No insistiremos sobre los instrumentos, ya que de ellos hemos tratado en anteriores capítulos.

*Masas de inyección.* — Las que ordinariamente se emplean son: la masa con azul de Prusia y la masa con carmín.

Para preparar la primera, es preciso obtener ante todo lo que se conoce con el nombre de *azul de Prusia soluble*, para lo cual la materia que con esta designación proporciona el comercio, se coloca en un embudo encima de un papel filtro; se vierte agua destilada sobre la substancia hasta que el líquido salga coloreado en azul, señal de que se ha transformado en soluble el azul de Prusia; se recoge todo, se mezcla con agua, se concentra por evaporación hasta la consistencia de una pasta y se conserva en frascos bien tapados. Una vez solubilizado el azul de Prusia, se prepara la masa de inyección de la siguiente manera: para obtener 200 centímetros cúbicos de masa, se pesan 8 gramos de gelatina pura, que se colocan en agua destilada durante media ó una hora; al cabo de este tiempo se retira y se escurre la gelatina y se la coloca en un vaso cilíndrico en baño de maría á 40° hasta que se funda en el agua que ha absorbido; cuando se ha conseguido la completa fusión, se agrega la disolución de azul de Prusia en cantidad de 200 centímetros cúbicos, cuidando de mover constantemente con un agitador y de que la disolución se encuentre á la misma temperatura de la gelatina: se termina la preparación filtrando á través de franela ó algodón la masa líquida y recogiénola en vasijas á propósito. Con esto la masa de inyección se encuentra en condiciones de ser inmediatamente empleada.

La preparación de la masa al carmín es mucho más complicada que la del azul de Prusia. Seguiremos á VIALLETÓN en la descripción que hace,

siguiendo las indicaciones de RANVIER, para obtener en buenas condiciones esta masa de inyección:

«Se coloca un poco de carmín en un frasco de boca ancha, y se le humedece con agua destilada hasta obtener una pasta espesa. Al día siguiente se agrega amoníaco, únicamente en la cantidad precisa para disolver el carmín. Se coloca entonces la gelatina en agua destilada, siguiendo el mismo procedimiento antes indicado, se funde en el baño de maría y se agrega la cantidad suficiente de disolución amoniaca de carmín para obtener una coloración muy fuerte. De este modo se tiene una masa fuertemente amoniaca, que si se inyectase en tal estado, difundiría el carmín fuera de los vasos y teñiría los tejidos, ensuciando la preparación. Para evitar esta difusión, es preciso neutralizar el exceso de amoníaco con el ácido acético; para ello se hace una mezcla de dos partes de agua destilada y una de ácido acético cristallizable que se vierte gota á gota en la masa, cuidando de remover constantemente. Es necesario tener sumo cuidado en no llegar á la neutralización completa, puesto que el carmín precipitaría y daría una masa opaca completamente inutilizable. Para evitar este inconveniente, es preciso tomar grandes precauciones para el momento en que la operación toque á su fin, agregando lentamente el ácido é investigando de tiempo en tiempo, bien por medio del olfato, ó bien con el papel de tornasol sensibilizado, el momento en el que deja de desprenderse amoníaco. En tal período se deja de agregar ácido, se filtra la masa á través de franela y se recoge en vasijas apropiadas, estando ya en disposición de ser inmediatamente empleada.»

*Manual operatorio.*—Las masas de inyección antes descritas, al ser empleadas, deben fundirse é inyectarse en órganos, cuya temperatura sea al menos igual al punto de fusión de la masa: de aquí se deduce que los órganos ó los animales al ser inyectados deben calentarse en agua, á no ser que se trate de animales de sangre caliente recientemente sacrificados, en cuyo caso no es necesario tomar esta precaución. Las inyecciones pueden ser totales ó parciales. Las primeras no deben emplearse más que en animales pequeños como la rata, el conejillo de Indias, el conejo ordinario, etc. Suponiendo que se trata de hacer una inyección total á un conejo, es necesario disponer de una cantidad de masa de inyección equivalente á 250 ó 300 centímetros cúbicos y una jeringa de capacidad suficiente para que la inyección se realice de una sola vez. Anestesiado el animal con el cloroformo, se pone al descubierto una de las carótidas por debajo de la cual una vez aislada se pasan 2 hilos distantes uno de otro un centímetro aproximadamente: se secciona dicha arteria y se deja sangrar al animal. Una vez realizado esto, se introduce en el cabo central de la arteria la cánula de la jeringa, se ata fuertemente á esta cánula dicho cabo arterial con uno de los hilos y se enchufa la jeringa previamente cargada con la masa de inyección. Se empuja lentamente el émbolo, deteniéndose siempre que se note alguna resistencia, y una vez acabada la inyección, cuya terminación se marca por la coloración que van adquiriendo los órganos, se liga el cabo periférico de la arteria y el cabo central por debajo de la cánula y se introduce el animal entero en agua fría, con objeto de solidificar rápidamente la materia inyectada.

Las inyecciones parciales se limitan á un órgano ó á un miembro, y en este caso, la masa de inyección se introduce por la arteria principal, siguiendo por lo demás las indicaciones expuestas para la técnica de las inyecciones totales.

Los órganos inyectados deben conservarse en el alcohol de 90° cuando la inyección se haya hecho con la masa de carmín, y en el líquido de MULLER cuando se haya realizado con la masa al azul de Prusia; con estos órganos pueden obtenerse cortes finos del mismo modo que los que se obtienen de los tejidos sin inyectar.

## CAPITULO VI

### FIJACIÓN

La fijación es un procedimiento mediante el cual se matan los elementos que componen los tejidos casi instantáneamente, con objeto de sorprenderlos en su forma y estructura, del mismo modo que si estuvieran vivos. Por lo que precede, se comprende que la fijación tiene por objeto impedir la serie de alteraciones que la aplicación de otros métodos produciría en los elementos y tejidos.

Los reactivos fijadores, que pueden ser de dos distintas naturalezas, físicos y químicos, obran de tres modos diferentes: unos, como el calor, alcohol, ácidos minerales, etc., producen la rápida coagulación de los albuminoides protoplasmáticos; otros, tales como el ácido crómico y los cromatos, se combinan con los albuminoides de los tejidos, dando origen á cuerpos bastante estables, poco solubles y en general casi imputrescibles; y finalmente, otros, como la mayoría de las sales metálicas (bicloruro de mercurio), obran como fijadores porque depositan el metal reducido y finamente dividido en torno de ciertos elementos, creándoles así una especie de coraza que impide la penetración de los agentes que pueden alterar los elementos fijados.

Han adquirido hoy tal importancia y se han perfeccionado tanto los métodos de fijación, que puede asegurarse que el éxito de un procedimiento de coloración, y por tanto, la percepción de detalles estructurales en los tejidos, dependen en gran parte de la acertada elección y metódica aplicación del reactivo fijador. Tanto es así, que los modernos descubrimientos en la fina estructura de las células se deben, en parte no despreciable, al uso de nuevos fijadores.

**Fijación con agentes físicos.**—Los agentes físicos que se emplean como fijadores, son: el calor y la desecación lenta.

*Calor.*—La aplicación del calor por sí solo se usa muy poco; en cam-

bio el empleo de este agente, en cuanto es capaz de producir una brusca desecación, se usa con éxito en la preparación de los tejidos líquidos tales como la sangre y la linfa; el procedimiento más sencillo consiste en colocar una gota del producto que se haya de observar en un cubre-objetos y extenderla con una aguja ó con un tubo capilar en capa muy delgada, ó bien colocar encima de dicha gota otro cubre-objetos perfectamente limpio, comprimir ligeramente ambas laminillas, deslizar una sobre otra y con un movimiento de rotación separarlas rápidamente, con lo cual se habrá conseguido que la capa de substancia sea muy delgada y de espesor uniforme. Una vez hecho esto, se coloca la cara de la laminilla que lleva la substancia hacia arriba, y, cogiéndola con unas pinzas, se pasa varias veces por la llama de una lámpara de alcohol ó de un mechero Bunsen, cuidando de que estos pases se hagan con relativa rapidez hasta la desecación completa de la substancia que se prepara, y evitando á todo trance la carbonización de los elementos.

La desecación brusca puede obtenerse también sin el empleo del calor, proyectando sobre la substancia extendida en el cubre-objetos una fuerte corriente de aire.

*Desecación lenta.* — Es un medio que puede usarse para la fijación de algunos tejidos como el muscular, el elástico, etc. Para realizar este procedimiento basta colocar los tejidos que deban fijarse en una estufa á una temperatura de 37° hasta que presenten una consistencia coriácea.

*Fijación con substancias químicas.* — No pueden dictarse reglas generales con respecto á la aplicación de los fijadores químicos puesto que cada uno de ellos debe usarse de distinta manera; sin embargo, debe tenerse presente que la cantidad de reactivo fijador debe ser siempre mucho mayor que el volumen del tejido que se ha de fijar; que una vez transcurrido el tiempo de fijación, distinto para cada reactivo, deben lavarse los objetos fijados en agua abundante con objeto de arrastrar el exceso de reactivo, cuya permanencia en los tejidos impediría la acción de las substancias colorantes.

Pasaremos revista á algunos de los fijadores más usados, indicando el procedimiento que debe seguirse en la aplicación de cada uno de ellos.

*Alcohol.* — Como fijador se emplea el alcohol de 90° de preferencia al alcohol absoluto, puesto que éste tiene el inconveniente de producir una deshidratación demasiado brusca de las partes superficiales y, en cambio, fija mal las porciones centrales. Así, pues, se aconseja que los tejidos que se hayan de fijar en alcohol se coloquen primero en el de 90 ó 95°, suspendidos de un hilo con objeto de evitar que lleguen al fondo del frasco, donde se depositan por su mayor densidad las porciones de alcohol más hidratadas, y se dejan permanecer en contacto con este reactivo durante veinticuatro horas, al cabo de las cuales y para completar la fijación se trasladan al alcohol absoluto. Debe tenerse presente que la cantidad de alcohol absoluto ha de hallarse en una cantidad equivalente á veinte veces aproximadamente al volumen de la pieza que se ha de fijar.

*Formol.* — La fijación con el formol se ha generalizado ahora mucho en técnica histológica, pues aunque son algunos sus inconvenientes, tiene en cambio indudables ventajas. Se emplea como fijador para toda clase de

órganos en disoluciones que varían del 3 al 10 por 100. GEROTA ha propuesto el empleo de las disoluciones alcohólicas usando la siguiente fórmula:

Formol . . . . .	3 cent. cub.
Alcohol de 85° . . . . .	100 —

Las piezas que han de ser fijadas con este reactivo pueden ser bastante voluminosas, puesto que es muy penetrante; pero debe tenerse en cuenta que cuando los objetos sean muy grandes, la cantidad de líquido ha de ser considerable y renovada con cierta frecuencia. Además, debe colocarse en el fondo del frasco donde se contenga el fijador una pequeña cantidad de algodón hidrófilo á fin de que los objetos no toquen al fondo de la vasija.

La fijación se obtiene al cabo de veinticuatro horas, pero como este reactivo es también indurante pueden permanecer en él los tejidos durante más tiempo, y en este caso debe renovarse el líquido cada dos ó tres días, por espacio de dos semanas. El grave inconveniente que presenta el formol es que dificulta extraordinariamente ciertas coloraciones, á no ser que los tejidos se laven durante mucho tiempo y con gran cantidad de alcohol de 70°, con objeto de arrastrar toda traza de formol.

*Ácido ósmico.* — Es un fijador muy enérgico, rápido en su acción, pero que tiene el inconveniente de ser muy poco penetrante, por lo cual los trozos de tejido deben ser de pequeño tamaño.

Se emplea en dos formas: en disolución ó en vapores. Para emplearlo en disolución se sumergen las piezas suspendidas de un hilo, teniendo cuidado que su volumen no sea mayor de medio centímetro cúbico y se dejan permanecer en contacto del reactivo durante cuatro ó cinco horas, al cabo de las cuales se las lava cuidadosamente en agua destilada y se las traslada al alcohol de 90°. VIALLETÓN aconseja indurar las piezas fijadas en el ácido ósmico en el líquido de MÜLLER.

Para emplear el ácido ósmico en vapores, se coloca la disolución al 1 por 100 en el fondo de un frasco de boca ancha y se suspende de un hilo el objeto que se quiere fijar sin que llegue á tocar la superficie del líquido. Esta forma de aplicación del ácido ósmico se emplea con mayor ventaja para la fijación de los elementos que flotan en un líquido: en este caso se coloca una gota en un portaobjetos, el cual se invierte y se coloca encima de la boca del frasco donde se contenga el ácido ósmico. El tiempo de fijación varía de diez minutos á una hora. Cuando se emplea el ácido ósmico en disolución, tiene el inconveniente de dificultar las coloraciones con el carmín y la hematoxilina, pero en cambio, empleándolo en vapores, no presenta estos inconvenientes.

*Sublimado corrosivo.* — Se usa como fijador en disoluciones saturadas empleando cualquiera de las fórmulas ya indicadas en el capítulo destinado al estudio de los reactivos y á las cuales podemos agregar la siguiente usada por VIALLETÓN:

Bicloruro de mercurio. . . . .	7 gramos
Cloruro de sodio . . . . .	0 gr. 5
Agua destilada. . . . .	100 cent. cub.
Acido nítrico . . . . .	1 gota

El tamaño de los objetos que han de ser fijados con el sublimado, no debe pasar de unos 2 centímetros cúbicos, puesto que este reactivo es muy poco penetrante. Los objetos quedan fijados al cabo de las dos á veinticuatro horas y se marca la terminación de la fijación por el color blanco mate uniforme y la opacidad especial que adquieren los tejidos. Como el bicloruro de mercurio se deposita en las tramas orgánicas en forma de agujas cristalinas que dificultan las coloraciones y alteran la estructura de los elementos, conviene siempre disolver el exceso de fijador al realizar la induración en el alcohol de 70°, renovando éste con frecuencia, ó bien usando el alcohol yodado que disuelve con mayor rapidez la sal mercúrica y que debe renovarse también hasta que dicho alcohol deje de decolorarse en contacto con los tejidos fijados (1).

El ácido crómico, los bicromatos y el ácido pícrico se emplean menos como fijadores y su aplicación no necesita reglas especiales, tanto más cuanto que en realidad, más que fijar lo que hacen estas substancias es indurar con lentitud los tejidos.

Los fijadores compuestos, tales como los líquidos de FLEMMING, GILSON, CARNOY, FOL, KLEINENBERG, tampoco necesitan indicaciones especiales para su manejo, puesto que se reducen á un caso particular de los antes expuestos, ya que lo que da carácter á la acción fijadora de cada uno de ellos es la presencia del ácido ósmico en unos (líquidos de FLEMMING y FOL), la del sublimado en otros (líquidos de GILSON y CARNOY), y la del ácido pícrico en otros (líquido de KLEINENBERG).

#### REBLANDECIMIENTO Ó DECALCIFICACIÓN

Hay tejidos cuya consistencia es tan grande que no pueden ser seccionados con la navaja directamente y menos aún sometidos á los procedimientos de inclusión. Para practicar los cortes en estos tejidos hay que recurrir á uno de estos dos métodos: reblandecerlos previamente mediante la acción de reactivos apropiados para que luego después puedan ser incluidos y seccionados con la navaja, ó sin disminuir su consistencia, desgastarlos pacientemente hasta que queden reducidos á láminas muy finas y transparentes. Como este segundo procedimiento es de aplicación especial á los tejidos óseo y dentario, de él nos ocuparemos al tratar de la técnica especial de preparación de estos tejidos.

Para reblandecer los objetos calcificados se usan reactivos cuya acción es la de disolver las sales calcáreas sin alterar la estructura fundamental del tejido.

Los decalcificantes más rápidos de uso más frecuente son los ácidos minerales diluídos y entre los cuales y á la cabeza debe figurar el ácido nítrico. Este ácido se emplea en disoluciones del 1 al 10 por 100: se colocan los trozos de tejido durante tres días en el alcohol de 95° con objeto de fijar previamente los elementos, precaución que debe tomarse con los demás decalcificantes; se trasladan después al ácido nítrico, cuidando de

(1) El alcohol yodado se prepara agregando unas cuantas gotas de tintura de yodo al alcohol de 70°, de modo que tenga un color semejante al del vino de Oporto.

renovar el reactivo cada veinticuatro horas durante ocho ó diez días, al cabo de los cuales se lavan los tejidos durante una hora en agua corriente y se les traslada al alcohol de 90° para indurarlos uniformemente y poder practicar de este modo las secciones con ó sin inclusión.

Además de los ácidos minerales pueden emplearse como decalcificantes algunas otras sustancias, tales como el ácido pícrico, el ácido crómico y la floroglucina.

El *ácido pícrico* se emplea en disolución acuosa saturada que obra muy lentamente, puesto que la decalcificación completa no se alcanza más que hasta el cabo de dos ó tres semanas, siendo necesario que los fragmentos de tejido sean muy delgados y que el reactivo se renueve con frecuencia.

El *ácido crómico* se usa en disolución acuosa al 1 por 500. Los fragmentos que se hayan de decalcificar, deben ser muy pequeños, consiguiéndose la decalcificación completa al cabo de dos ó tres semanas.

La *floroglucina* es en realidad, más que una sustancia decalcificante, un reactivo moderador de la acción disolvente, quizá demasiado enérgica de los ácidos minerales. Esta propiedad hace que puedan emplearse dichos ácidos en disoluciones mucho más concentradas que si se usasen solos y que pueda abreviarse el tiempo necesario para la decalcificación completa sin temor á que se altere la estructura del tejido. Una de las fórmulas en las que entra esta sustancia y que da mejores resultados es la siguiente:

Floroglucina. . . . .	1 gramo
Acido nítrico . . . . .	5 cent. cúb.
Alcohol de 70°. . . . .	70 —
Agua destilada . . . . .	30 —

Conviene vigilar la decalcificación extrayendo los tejidos del reactivo en cuanto se haya obtenido un reblandecimiento completo, el cual puede alcanzarse en el término de una á cuatro horas según el tamaño de los objetos. Los tejidos reblandecidos deben lavarse en agua, después en alcohol y pueden ser seccionados directamente con la navaja ó después de incluídos.

## CAPITULO VII

### INDURACIÓN

Para que puedan ser seccionados los tejidos con la navaja, necesitan poseer una consistencia determinada. Casi todos ellos son demasiado blandos, excepto el tejido óseo, el dentario y el cartilaginoso, por lo cual hay necesidad de indurarlos, es decir, de aumentar su consistencia, para poder obtener los cortes finos que han de ser observados con el microscopio. Este aumento de consistencia se consigue por medios físicos ó con ciertos reac-

tivos químicos. Es la induración un procedimiento complementario de la fijación, de tal modo que en algunos casos se consiguen ambas con un solo medio ó reactivo; en efecto, el alcohol, el calor, la desecación, etc., al propio tiempo que fijan los tejidos, aumentan su consistencia.

Entre los medios físicos que se pueden usar como induradores se hallan el calor, la congelación y la desecación. El calor puede aplicarse mediante la cocción de los tejidos en agua, pero como desde luego se comprenderá, es un mal procedimiento, pues si bien aumenta la consistencia de algunos tejidos porque se coagulan los albuminoides, tiene, en cambio, el máximo inconveniente de alterar profundamente las estructuras. Casi lo mismo podría decirse de la congelación, la cual se obtiene con el éter pulverizado, con un aparato á propósito, ó con el cloruro de metilo, cuyas substancias producen un descenso tan grande de temperatura, que congelando el agua que empapa los tejidos, producen en éstos un aumento de consistencia tan notable, que puede compararse á la del tejido cartilaginoso: este procedimiento ha caído ya en desuso completo, pues aparte de que la congelación del agua destroza brutalmente muchos elementos y altera por tanto la estructura de los tejidos, hoy desde que se han descubierto otros métodos mejores ni siquiera tiene la ventaja de la rapidez. La desecación, que debe ser lenta, no se emplea hoy tampoco, pues lo mismo que los procedimientos anteriores altera profundamente la estructura de los tejidos.

El reactivo químico indurante por excelencia es el alcohol, pues si bien se puede conseguir el aumento de consistencia de los tejidos con otros reactivos, como el ácido crómico, los bicromatos, el formol, etc., ha de terminarse con éstos por la aplicación del alcohol, ya que para indurar los objetos se necesita, no tan sólo aumentar su consistencia, sino que también sustraer toda el agua que los empapa, es decir, deshidratarlos. Para conseguir la induración completa con el alcohol se usa el de 90 ó 95° y el absoluto, pero generalmente conviene empezar por la inmersión del tejido en el de 85 ó 90° por espacio de doce horas, para trasladarlo después al absoluto, que se deberá renovar una vez por lo menos para obtener una buena consistencia. Debe siempre tenerse presente que el tamaño de los objetos ha de hallarse en relación con el volumen del líquido empleado, pues los objetos demasiado grandes no se induran más que superficialmente, quedando las porciones centrales demasiado blandas. Además, conviene que los trozos de tejido no se depositen en el fondo del frasco, pues el alcohol de menor graduación y por tanto el menos indurante ocupa siempre las capas más inferiores: por lo que se aconseja, ó bien suspender los objetos en el centro de la masa líquida colgándolos de un hilo, ó bien colocar en el fondo de la vasija una cantidad determinada de algodón hidrófilo. El tiempo que debe durar la permanencia de los tejidos en el alcohol, varía para cada clase de tejido, no pudiendo dictarse reglas generales para este caso.

El ácido crómico se usa como indurante en disolución acuosa del 1 por 200 al 1 por 1000. Es un buen indurante, quizá superior al alcohol por la mayor consistencia que presta á los tejidos, en especial al nervioso, pero tiene en cambio el grave inconveniente de ser de acción muy lenta y dificultar en grado máximo las coloraciones ulteriores.

Los bicromatos se emplean también como indurantes, usándose de preferencia en la fórmula de MÜLLER. Su acción es mucho más lenta que la del ácido crómico, de tal modo que para conseguir una induración completa se necesitan uno ó varios meses.

El formol indura con rapidez, pero no es muy penetrante, y además presenta el inconveniente de dificultar la coloración con el carmín y la hematoxilina.

Tanto el alcohol, como los bicromatos, como el formol, se pueden usar como conservadores de los tejidos, pues la permanencia de éstos en tales reactivos, se puede prolongar, en términos generales, por tiempo indefinido.

### INCLUSIÓN

Aun después de perfectamente indurados los tejidos siguiendo los procedimientos antes descritos, en la mayor parte de los casos nunca se llega á alcanzar la necesaria unidad de consistencia que permita, en primer lugar, la práctica de cortes muy finos, y en segundo, la igualdad del espesor en cada uno de los referidos cortes. Por esto se ha tratado de uniformar dicha consistencia mediante la introducción en los resquicios que dejan entre sí los elementos anatómicos en los tejidos, de sustancias que, penetrando en estado líquido, puedan solidificarse ulteriormente y hagan adquirir al objeto que ha de ser seccionado una completa igualdad de consistencia en todos los puntos de su masa.

Muy diversas en naturaleza y modo de aplicación han sido las sustancias que se han usado para conseguir el fin antes expuesto, y entre ellas pueden citarse la goma, la celoidina, la parafina, el jabón, la gelatina, la albúmina, etc. De todas ellas las más importantes, más empleadas y cuyo manejo es relativamente más fácil, son las tres primeras, y de los procedimientos que se usan para aplicarlas nos ocupamos á continuación.

**Inclusión con goma.** — Tiene este procedimiento de inclusión la ventaja de no exigir la previa deshidratación de los tejidos, de penetrar profundamente en ellos la materia de inclusión y de poderse llevar á cabo en un tiempo relativamente corto; pero tiene en cambio el grave inconveniente de alterar profundamente la estructura de los tejidos cuyos elementos se encuentran flojamente unidos entre sí.

Para aplicar este método de inclusión se prepara de antemano una disolución de goma arábica, cuya concentración no debe ser ni muy clara ni muy espesa, pues en el primer caso los objetos quedan poco duros al solidificarse la goma, y en el segundo penetra mal. Los objetos que han de ser incluidos en esta sustancia pueden ser sumergidos directamente en ella al salir de los fijadores, siempre que éstos tengan como disolvente el agua; pero cuando se ha usado como fijador ó indurante el alcohol, entonces es conveniente volverlos á hidratar colocándolos por espacio de una ó dos horas en el agua destilada. La permanencia en las disoluciones de goma de los objetos que se han de incluir debe durar unas veinticuatro horas. Algunos autores aconsejan emplear las disoluciones de goma colocándolas en una estufa á 37° con objeto de que por evaporación se vayan

concentrando gradualmente. ALQUIER y LEFÁS recomiendan la inmersión de los objetos en agua destilada y la adición paulatina de trozos de goma seca hasta que se obtenga un líquido de consistencia siruposa.

Al cabo de las veinticuatro ó cuarenta y ocho horas de permanencia de los objetos en las disoluciones de goma, se colocan éstos sobre un trozo de corcho ó de madera, se vierte encima de ellos otra disolución de goma mucho más espesa que la que ha servido para realizar la inclusión y se sumergen rápidamente en el alcohol de 90°, donde la goma se cuaja y el objeto queda indurado de tal modo que puede ser trasladado inmediatamente á la pinza del micrótopo para obtener los cortes, que suelen ser de una gran finura.

Conviene agregar á las disoluciones de goma, con objeto de evitar su enmohecimiento, unos cristales de timol, algunas gotas de una disolución saturada de ácido pícrico ó unos cuantos centímetros cúbicos de agua fenicada.

**Inclusión con celoidina.** — La inclusión con celoidina fué introducida en la técnica histológica por M. DUVAL. La substancia empleada para esta inclusión es sólida; se presenta en el comercio en forma de tabletas de color blanco amarillento, opacas y solubles aunque muy lentamente en el alcohol absoluto, en el éter y en la mezcla de partes iguales de estos disolventes. Como quiera que la celoidina es una forma especial de preparación del algodón-pólvora ó fotoxilina, se ha propuesto para reemplazarla con algunas ventajas el uso de ésta y el del colodión. Como quiera que los disolventes son los mismos y la técnica de inclusión igual, huelga que hagamos una descripción detallada de cada una de estas materias, limitándonos por tanto á describir el método de inclusión con la celoidina, con lo cual habremos descrito el procedimiento para la inclusión con colodión y con fotoxilina.

Para ser incluídos los tejidos con celoidina deberán deshidratarse previamente en alcohol; así, pues, previa induración de los objetos se trasladan durante veinticuatro horas á una mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y éter con objeto de completar la induración y la deshidratación, y al propio tiempo facilitar la penetración de la celoidina.

Una vez realizada la operación precedente se procede á la inclusión propiamente dicha, para lo cual se preparan dos disoluciones de celoidina: una clara, y otra espesa de consistencia de jarabe. Es imposible dar una fórmula exacta para la preparación de estas dos disoluciones, pues únicamente la práctica es la que enseñará las proporciones necesarias para obtener el fin deseado; sin embargo, LEE y HENNEGUY indican las siguientes proporciones para la preparación de estas dos disoluciones:

Disolución clara:

Celoidina . . . . .	1 parte
Mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y éter . . . . .	15 partes

Disolución espesa:

Celoidina . . . . .	1 parte
Mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y éter . . . . .	10 partes

Los tejidos extraídos del alcohol-éter se sumergen durante veinticuatro horas en la disolución débil de celoidina, al cabo de las cuales se trasladan por espacio de veinticuatro á cuarenta y ocho horas á la disolución fuerte.

Terminado este tiempo se toma un tapón de corcho ó un pedazo cilíndrico de madera, una de cuyas extremidades se rodea con una tira de papel. Se vierte en el hueco formado por la porción de papel que sobresale de la superficie de la madera ó del corcho cierta cantidad de la disolución espesa de celoidina y se coloca el tejido, que se halla de este modo situado en el seno de la masa de la celoidina que queda adherida al bloque de corcho ó madera. Ahora es preciso solidificar la masa de inclusión, para lo cual el mejor procedimiento es el de colocar el bloque debajo de una campana y exponerle durante unas horas á los vapores de cloroformo, donde adquiere la materia de inclusión un aspecto opaco: una vez conseguido esto se traslada el bloque al alcohol de 70°, donde se termina la induración de la masa de inclusión al cabo de veinticuatro horas y donde dicha masa se transparenta. Es muy importante someter la masa de inclusión á los vapores de cloroformo, pues así se evita la producción de burbujas de gas que se desprenden abundantemente, cuando se sumergen las piezas incluidas directamente en el alcohol. En estas condiciones el tejido incluido se halla ya en disposición de ser colocado en la pinza del micrótopo para practicar los cortes.

**Inclusión en parafina.** — La inclusión en parafina se realiza con esta substancia derretida por el calor, pero hay que tener en cuenta que existen en el comercio diversas parafinas cuyos puntos de fusión son distintos y por tanto conviene elegir la parafina cuyo punto de fusión se halle en relación con la temperatura del medio ambiente. En los climas templados conviene emplear en invierno la parafina fusible entre 40 y 45°, y en verano la que se liquida entre los 50 y 55°.

Los tejidos previamente deshidratados después de teñidos en masa, se trasladan durante veinticuatro horas al alcohol absoluto, de donde se les extrae para colocarlos en una mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y uno de los disolventes de la parafina, que pueden ser el cloroformo, el tolueno, el éter, el xilol ó el aceite de cedro. Damos la preferencia al cloroformo, pues es una substancia que aparte de penetrar bien en los tejidos, ni altera las substancias colorantes empleadas, ni la estructura de los elementos.

Con objeto de simplificar el conocimiento de la serie de operaciones que son necesarias para realizar una inclusión en la parafina clorofórmica, exponemos á continuación por tiempos esta serie de operaciones:

1.º Los tejidos extraídos del alcohol absoluto se colocan en una mezcla de partes iguales de este reactivo y cloroformo, cuidando de que no se mezclen los dos líquidos, dejando permanecer la pieza que al principio flotará en la línea de separación de las dos substancias hasta que descienda al fondo de la vasija;

2.º Se trasladan los tejidos á una disolución saturada de parafina en cloroformo, donde deberán permanecer, según su tamaño, de veinticuatro horas á tres días;

3.º Al cabo de este tiempo se colocan las piezas en la parafina derre-

tida y se llevan en vasijas á propósito á la estufa que debe estar á la temperatura un poco superior al punto de fusión de la parafina, y allí permanecerán por espacio de una cuantas horas, tiempo que debe variarse según el volumen del tejido que se ha de incluir.

4.º En un cajoncito de cartón ó de papel se vierte un poco de parafina derretida, se coloca la pieza incluida procurando orientarla con una aguja y se espera á que en la capa superficial de la masa de inclusión se forme una tenue película, y entonces se sumerge todo rápidamente en agua fría, donde se solidifica la materia de inclusión que se halla ya en condiciones de ser trasladada á la pinza del micrótopo, para practicar las cortes.

### SECCIÓN

Una vez terminadas las operaciones de induración é inclusión se puede proceder á la práctica de los cortes para teñirlos ulteriormente ó para montarlos definitivamente si es que los tejidos han sido coloreados en masa. Varía el procedimiento para la obtención de cortes finos según que los tejidos hayan sido únicamente indurados, ó se hayan incluido en goma celoidina ó parafina.

La sección en los tejidos únicamente indurados con el alcohol sin inclusión en cualquiera de las materias antes indicadas, puede realizarse con los micrótopos de mano como el de RANVIER; pero como nunca el objeto tiene las dimensiones del tubo del micrótopo, conviene rodear el tejido con médula de saúco para rellenar el espacio que queda entre el objeto y las paredes del tubo del micrótopo. Es necesario al realizar cada corte humedecer constantemente la navaja con alcohol y recoger el corte obtenido en un cristizador que contenga agua destilada si es que se ha de teñir y montar la preparación inmediatamente, ó en agua ligeramente alcoholizada ó salada si es que se ha de tardar algún tiempo en la terminación de la preparación.

Cuando los tejidos han sido incluidos en goma, pueden practicarse los cortes también con el micrótopo de mano siguiendo el mismo procedimiento que se acaba de indicar ó puede emplearse un micrótopo mecánico, pero en este caso es necesario pegar los bloques con la misma goma, con gelatina ó colodión en pequeños trozos de corcho ó madera, para que puedan cogerse con la pinza del micrótopo, teniendo además en cuenta que la navaja debe estar constantemente bañada con alcohol, con el objeto: 1.º de que los cortes no se desequen y 2.º evitar la disolución de la goma, para lo cual es preciso el uso del alcohol de alta graduación. Para los objetos incluidos en celoidina deben emplearse siempre de preferencia los micrótopos automáticos colocando la navaja de modo que su filo forme un ángulo lo más agudo posible con el plano del objeto paralelo al canal de deslizamiento de dicha navaja, pues con esto se consigue utilizar la mayor extensión posible del filo del instrumento cortante. Conviene bañar constantemente la navaja con alcohol de 70º. El movimiento de la navaja debe hacerse con gran regularidad con objeto de evitar la desigualdad en el espesor de las cortes. Estos deberán recogerse en agua con objeto de que se extiendan y puedan ser teñidos con los colorantes en disolución acuosa.

Los tejidos incluidos en parafina se seccionan en micrótomos especiales, colocando el filo de la navaja paralelo á una de las caras del prisma, que debe haberse tallado previamente antes de ser colocado en la pinza del micrótomó. Para tallar este prisma conviene tener presente que las caras de él han de ser perfectamente paralelas entre sí, pero procurando que una de ellas resulte ligeramente oblicua y de este modo se obtenga un prisma triangular truncado. Una vez preparado el bloque de parafina en esta forma se sujeta á la platina de los micrótomos especiales con unas cuantas gotas de parafina derretida que se enfría bruscamente. Los cortes se practican en seco, es decir, sin humedecer la navaja con ninguna clase de líquido, pudiendo obtenerse de esta suerte, si el prisma está bien tallado, series de cortes que forman cintas de longitud variable, pues el borde más próximo al filo de la navaja de cada nuevo corte se suelda con el borde más lejano del corte anterior. Algunas veces los cortes se arrugan, lo cual significa que la parafina es demasiado blanda, y en este caso conviene endurecerla sumergiendo en agua fresca el bloque para enfriarlo; otras veces los cortes se arrollan, indicando con esto que, ó son demasiado gruesos, ó la parafina demasiado dura, inconveniente que puede salvarse aumentando la temperatura del bloque, para lo cual basta proyectar el aliento sobre éste. De preferencia deben emplearse los tejidos teñidos en masa, con lo cual se abrevian las operaciones y se evitan una porción de inconvenientes que presenta la coloración de los cortes incluidos en parafina, como son: su fragilidad, la dificultad de su manejo por su excesiva finura, etc. Cuando los tejidos han sido teñidos en masa, las cintas de cortes se trasladan sobre un portaobjetos, el cual ha sido previamente embadurnado con una substancia que pegue dichos cortes á la lámina de cristal con objeto de que al disolver la parafina aquéllos no se marchen ni se desordenen. Una vez fijadas las cintas se calienta ligeramente el portaobjetos, y colocando éste oblicuamente sobre un cristizador, se vierten unas cuantas gotas de uno de los disolventes de la parafina, debiendo dar la preferencia entre ellos al xilol ó al tolueno, y escurriendo el exceso de tal disolvente se termina la preparación colocando la substancia conservadora y encima el cubreobjetos, siguiendo para ello un procedimiento que indicaremos más adelante. Entre las diversas substancias que pueden emplearse para pegar los cortes en el portaobjetos la preferible es la mezcla ideada por SCHALLIBAUM, cuya fórmula es la siguiente:

Colodión normal . . . . .	1 parte
Esencia de clavo . . . . .	3 partes

## CAPITULO VIII

## COLORACIÓN

Para teñir los tejidos pueden seguirse dos procedimientos distintos ó colorearlos en masa antes de realizar la inclusión, ó una vez obtenida ésta y practicados los cortes, teñir por separado cada uno de ellos.

**Coloración en masa.** — La coloración en masa de los tejidos debe realizarse inmediatamente después de su fijación y antes de ser indurados. El procedimiento en términos generales es muy sencillo, pues basta colocar el objeto que ha de ser teñido por espacio de veinticuatro horas dentro de la substancia colorante, y al cabo de este tiempo lavarlo en agua destilada por espacio de una hora para proceder luego á la induración, inclusión y práctica de los cortes. En los teñidos en masa no se usan más que las coloraciones simples, es decir, empleando disoluciones de una sola substancia colorante y entre ellas las más aplicadas son: el ácido carmínico, el carmín, la hemateína y la hematoxilina. La cantidad de substancia colorante debe hallarse siempre en relación con el volumen del objeto que se ha de teñir: por regla general, puede decirse que el volumen del líquido tintóreo debe ser veinte veces mayor que el del objeto que se ha de colorear.

**Coloración de los cortes.** — Los procedimientos de coloración de los cortes pueden dividirse en dos grandes grupos: *por selección* y *por impregnación*. En los primeros la substancia ó substancias empleadas se fijan en unas partes de los elementos anatómicos de preferencia á otros sin descomponerse. En los segundos los reactivos tintóreos al hallarse en contacto de los tejidos se descomponen y depositan en el interior ó en torno de ciertos elementos una materia que ordinariamente suele ser un metal reducido. Entre los métodos de coloración por impregnación, no nos ocuparemos más que del método de tinción con el nitrato de plata, pues los demás son de aplicación especial á ciertos tejidos y por tanto deben estudiarse en la técnica especial.

## MÉTODOS DE COLORACIÓN POR SELECCIÓN

Los reactivos colorantes selectivos se emplean para teñir los tejidos de dos maneras: ó bien se usa una sola substancia colorante (*coloraciones simples*) ó bien se emplean varias (*coloraciones combinadas*). Al describir cada uno de los métodos de coloración resumiremos las operaciones dando cuenta de los tiempos en que se usan hasta llegar al montaje de los cortes y su conservación definitiva.

**Coloraciones simples.** — *Coloración con el carmín.* — Entre las diversas fórmulas que pueden usarse de carmín, describiremos como fundamentales

el carmín aluminoso de GRENACHER, el litinado de ORTH y el ácido carmínico.

### I. Carmín aluminoso.

- 1.º Los cortes se colocan en pocillos de porcelana, donde exista la disolución aluminosa del carmín por espacio de doce á veinticuatro horas;
- 2.º Lavado en gran cantidad de agua destilada para arrastrar el exceso de substancia colorante;
- 3.º Lavado en alcohol absoluto para deshidratar;
- 4.º Aclaramiento en esencia de bergamota, en la de clavo ó en la creosota hasta obtener suficiente transparencia en los cortes;
- 5.º Lavado en xilol (puede prescindirse de este tiempo si se ha empleado la esencia de bergamota para aclarar, bastando en este caso extraer el exceso de esencia colocando los cortes sobre el portaobjetos y pasando por encima de ellos comprimiendo ligeramente un papel de filtro limpio, ó mejor aún un papel de fumar sin cola);
- 6.º Colocación de los cortes en el portaobjetos mediante una espátula y una aguja enmangada y montaje en bálsamo del Canadá ó resina Dammar.

### II. Carmín litinado.

- 1.º Coloración de los cortes por espacio de cinco á diez minutos en la fórmula ideada por ORTH;
- 2.º Lavado rápido en la fórmula siguiente, con objeto de diferenciar la coloración haciendo que el carmín se fije y se insolubilice en la cromatina nuclear:

Acido clorhídrico . . . . .	1 cent. cúb.
Alcohol de 70°. . . . .	100 —

- 3.º Deshidratación en el alcohol absoluto;
- 4.º Aclaramiento en las esencias y montaje.

### III. Acido carmínico.

- 1.º Coloración de los cortes por espacio de una á dos horas en el ácido carmínico aluminoso de MAYER ó en el paracarmín del mismo autor;
- 2.º Lavado en agua abundante;
- 3.º Deshidratación en el alcohol;
- 4.º Aclaramiento y montaje. En substitución del carmín aluminoso puede usarse la cochinilla siguiendo las mismas reglas que para aquél, y en el del carmín litinado el borácico empleado también del mismo modo.

*Coloración con la hematoxilina.* — Para realizar las coloraciones con la hematoxilina es necesario tener presentes los siguientes preceptos generales: 1.º cuando se usa la hematoxilina en substancia, hay que tener mucho cuidado en no sobrepasar el tiempo de coloración, pues de permanecer demasiado tiempo en el colorante los cortes, el tejido sufre graves quebrantos en su estructura, quedando las células como abrasadas por el reactivo; de consiguiente, es necesario que el tiempo de permanencia de dichos cortes en la substancia colorante sea corto; 2.º el empleo de la hemateína es

preferible al de la hematoxilina porque nunca sobrecolora los tejidos y sus disoluciones están maduras y prontas á usarse desde que se preparan; 3.º las disoluciones de hematoxilina necesitan estar maduras para que puedan ser aplicadas con provecho, pero es preciso siempre filtrarlas para evitar que ciertos precipitados se agarren á los cortes y ensucien la preparación.

Las fórmulas de hematoxilina ó hemateína más usadas son las de EHRlich, DELAFIELD, BÖHMER, HANSEN y la hemateína aluminosa de MAYER.

### I. Hematoxilina:

1.º Se colocan los cortes en cualquiera de las fórmulas de hematoxilina antes indicadas, por espacio de cinco á quince minutos, cuidando con esmero de que dichos cortes no se arruguen ni se doblen, pues si tal ocurre el colorante tiñe más intensamente las arrugas y dobleces que el resto del corte;

2.º Lavado en agua abundantísima con objeto de que el exceso de colorante no siga actuando sobre el corte para evitar los riesgos que antes hemos indicado;

3.º Deshidratación en alcohol;

4.º Aclaramiento y montaje.

### II. Hemateína aluminosa:

1.º Coloración de los cortes por espacio de una ó más horas, teniendo en cuenta que con esta fórmula no hay temor ni á la sobrecoloración, ni á la alteración estructural del tejido;

2.º Lavado en agua;

3.º Deshidratación en alcohol;

4.º Aclaramiento y montaje.

*Coloración con las sustancias derivadas de la anilina.*— Los procedimientos de coloración con estas sustancias pueden exponerse en conjunto, ya que la mayor parte de ellas obran de la misma manera y se emplean en las mismas disoluciones (acuosas, acuoso-alcohólicas, en agua fenicada y de anilina). En general, con estas sustancias se sigue un método de coloración llamado *regresivo*, que consiste en sobrecolorar intensamente los tejidos para luego decolorarlos paulatinamente, empleando para ello el disolvente de cada una de estas sustancias hasta obtener la tonalidad cromática conveniente.

Las reglas generales que pueden aplicarse á este grupo de colorantes, se refieren casi exclusivamente á los que tiñen la cromatina nuclear, tales como el azul de metilo, la safranina, la vesubina, la fucsina, el verde de metilo, etc., puesto que los colorantes plasmáticos se usan en las coloraciones combinadas y de ellos nos ocuparemos al tratar de éstas.

Así, pues, para teñir un corte de un tejido cualquiera con una de estas materias puede seguirse el siguiente procedimiento:

1.º Inmersión del corte en la sustancia colorante durante varios minutos teniendo en cuenta que el tiempo de permanencia del tejido dentro del reactivo no debe ser muy largo, puesto que estas materias colorantes tiñen con extraordinaria rapidez;

2.º Lavado rápido en agua con objeto de decolorar unas veces ó con el de arrastrar impurezas, otras;

3.º Decoloración en alcohol ó aceite de anilina, hasta obtener el tono deseado, ó hasta que la substancia decolorante deje de arrastrar materia tintórea;

4.º Aclaramiento en las esencias, teniendo en cuenta que no debe usarse ni la esencia de clavo, ni ninguna de las materias aclaradoras que disuelvan los productos derivados de la anilina para evitar la decoloración completa del tejido, debiendo darse por tanto la preferencia á la esencia de bergamota, al xilol ó á la creosota;

5.º Montaje en bálsamo del Canadá.

La deshidratación en este método se obtiene al mismo tiempo que la decoloración, tanto si se usa el alcohol como si se emplea el aceite de anilina.

**Coloraciones combinadas.** — Actualmente son las que más se emplean en técnica histológica, pues desde que se ha podido precisar las reacciones químicas de los diversos elementos y las de los diversos componentes de la célula, el empleo de colorantes diversos se hace más científicamente, pudiéndose de esta suerte aplicar varias substancias tintóreas á la vez con objeto de que destaquen y se diferencien los núcleos, los protoplasmas, las substancias intercelulares, las células transformadas, etc. Ahora bien, la aplicación de los colorantes combinados, puede hacerse usando las diversas materias mezcladas en un solo líquido ó empleándolas separadamente.

*Coloraciones combinadas que tienen por base el carmín*

I. Coloración con el picrocarmín. Puede emplearse la fórmula de RANVIER ó bien separadamente el carmín y el ácido pícrico. Cuando se usa el picrocarminato es preciso colorear los cortes durante veinticuatro horas en el reactivo, deshidratarlos luego, aclararlos y montarlos en bálsamo.

Cuando se usan separadamente el carmín y el ácido pícrico puede echarse mano del carmín litinado procediendo de la siguiente manera:

1.º Coloración de los cortes por espacio de cinco á diez minutos en el carmín de ORTH;

2.º Lavado rápido en alcohol clorhídrico;

3.º Inmersión de los cortes en el ácido pícrico á saturación;

4.º Rápido lavado en agua;

5.º Deshidratación en el alcohol que contenga un cristal de ácido pícrico, con objeto de que no se disuelva éste y sea totalmente arrastrado del corte;

6.º Aclaramiento y montaje en bálsamo.

II. Coloración con el carmín litinado y el picrocarmín de índigo:

1.º Inmersión de los cortes durante cinco á diez minutos en el carmín de ORTH;

2.º Lavado rápido en el alcohol clorhídrico, teniendo cuidado de que

los cortes adquieran una tinta rosa pálida con objeto de que no queden teñidos más que los núcleos celulares;

- 3.º Lavado en agua abundante para arrastrar el exceso de ácido clorhídrico;
- 4.º Coloración durante cinco á diez minutos en la siguiente fórmula:

Carmín de índigo . . . . .	0 gr. 25
Agua saturada de ácido pícrico . . . . .	100 cent. cúb.

- 5.º Lavado rápido de los cortes en un líquido compuesto de:

Acido acético . . . . .	V ó VI gotas
Agua . . . . .	10 cent. cúb.

El lavado con el agua acética tiene por objeto fijar el carmín de índigo y evitar que se disuelva con los repetidos lavados.

- 6.º Lavado en agua para arrastrar el exceso de ácido acético;
- 7.º Deshidratación en alcohol absoluto durante algún tiempo;
- 8.º Aclaramiento y montaje.

*Coloraciones combinadas que tienen por base la hematoxilina.* — Puede usarse como colorante fundamental la hematoxilina ó la hemateína, pero teniendo presente que cuando se emplea esta última, los cortes deben permanecer en el colorante mayor tiempo (de una á varias horas).

#### I. Coloración con la hematoxilina y la eosina.

- 1.º Coloración de los cortes por espacio de dos á cinco minutos en la hematoxilina de HANSEN, EHRLICH, DELAFIELD, etc., ó durante una hora en la hemateína de MAYER, cuidando de que no se arruguen ni se doblen;
- 2.º Lavado cuidadoso en agua;
- 3.º Coloración por espacio de diez á quince minutos en la disolución de eosina al 1 por 100;
- 4.º Lavado rápido en agua;
- 5.º Deshidratación en alcohol absoluto;
- 6.º Aclaramiento y montaje.

#### II. Método de VAN GIESON:

- 1.º Coloración en la hematoxilina siguiendo las reglas expuestas anteriormente;
- 2.º Lavado en agua;
- 3.º Coloración por espacio de diez á veinte minutos en la siguiente fórmula:

Disolución saturada de fucsina ácida . . . . .	3 cent. cúb.
— — — — — de ácido pícrico . . . . .	100 —

- 4.º Lavado en agua abundante;
- 5.º Deshidratación en alcohol absoluto;
- 6.º Aclaramiento y montaje.

### III. Hemáttoxilina ferruginosa de HEIDENHEIN, modificación de CAJAL:

1.º Inmersión de los cortes por espacio de cinco minutos en el siguiente líquido:

Alumbre de hierro . . . . .	2 gramos
Agua destilada. . . . .	100 cent. cúb.

2.º Coloración de los cortes extraídos del líquido anterior en una disolución acuosa al 1 por 100 de hematoxilina. En este reactivo se produce al penetrar los cortes un abundante precipitado de color negro violáceo, por lo cual conviene cambiar dos ó tres veces el líquido colorante en el espacio de diez á quince minutos;

3.º Traslado de los cortes nuevamente al alumbre de hierro, donde se disuelve parte de la laca formada por la hematoxilina y el hierro. En este líquido deben permanecer hasta que los cortes queden de un color violeta claro y sean transparentes. La acción, pues, del alumbre de hierro es decolorante después de la de la hematoxilina. Debe renovarse el decolorante varias veces;

4.º Lavado en agua abundante con objeto de arrastrar todo el alumbre y que no siga decolorándose el corte;

5.º Coloración de contraste con la picrofucsina, cuya fórmula se ha expuesto antes, durante uno ó dos minutos, cuidando de no prolongar más tiempo la acción de este reactivo, puesto que siendo una substancia muy ácida disolvería por completo la laca hematoxilica;

6.º Lavado en agua;

7.º Deshidratación en alcohol absoluto;

8.º Aclaramiento y montaje.

*Coloraciones combinadas que tienen por base las substancias derivadas de la anilina.* — Puede decirse que son numerosísimas estas coloraciones y que en términos generales la mayor parte de ellas se emplean de la misma manera ó sea por el método general de las coloraciones regresivas, dándose siempre la preferencia, cuando las coloraciones son dobles, á un colorante nuclear y á otro plasmático, y cuando son triples á uno nuclear, otro plasmático y otro que tiñe las substancias intercelulares. Siguiendo el método regresivo debe usarse después del empleo de cada una de las materias tintóreas el alcohol absoluto como substancia decolorante y en algunos casos el aceite de anilina. A continuación y como ejemplo exponemos algunos de los métodos de coloración combinada con estas substancias.

#### I. Coloración con el azul polícromo de UNNA.

Es un reactivo colorante, líquido cuya fórmula es desconocida y se usa de la siguiente manera:

1.º Coloración de los cortes en el reactivo previamente filtrado por espacio de un cuarto á media hora;

2.º Lavado en agua destilada;

3.º Decoloración en el siguiente líquido hasta que se obtenga, exami-

nando de cuando en cuando en el microscopio los cortes, la diferenciación deseada:

Mezcla de glicerina y éter (GLÜBLER). . . . .	V gotas
Agua destilada . . . . .	20 cent. cúb.

- 4.º Nuevo lavado en agua abundante;
- 5.º Rápida deshidratación en el alcohol;
- 6.º Aclaramiento, dando la preferencia á la esencia de bergamota, y montaje en bálsamo.

## II. Método de BENDA:

1.º Coloración de los cortes durante veinticuatro horas en el siguiente líquido que debe ser preparado en el momento de usarse:

Disolución de safranina en alcohol absoluto	
al 1 por 100 . . . . .	10 cent. cúb.
Agua destilada . . . . .	10 —
— saturada de aceite de anilina . . . . .	10 —

- 2.º Lavado hasta conveniente decoloración en alcohol de 90º;
- 3.º Coloración de fondo durante medio minuto escaso en el siguiente líquido:

Verde luz . . . . .	2 gr. 5
Agua destilada . . . . .	100 cent. cúb.
Alcohol de 90 . . . . .	100 —

Es preciso proceder rápidamente en este tiempo, pues como el verde luz es una substancia muy ácida, de actuar durante largo rato sobre los cortes, destruiría la coloración nuclear debida á la safranina;

- 4.º Nuevo lavado en alcohol absoluto;
- 5.º Aclaramiento en esencia de bergamota y montaje en bálsamo.

## III. Método de CAJAL con el rojo Magenta:

- 1.º Coloración de los cortes durante cinco á diez minutos en una disolución acuosa saturada de rojo Magenta ó fucsina alcalina;
- 2.º Lavado en agua abundante;
- 3.º Coloración durante uno ó dos minutos con el picrocarmín de índigo, cuya fórmula se ha indicado antes;
- 4.º Lavado en agua acética y después en agua destilada;
- 5.º Deshidratación rápida en alcohol absoluto;
- 6.º Aclaramiento en esencia de bergamota y montaje en bálsamo.

## IV. Método de CAJAL con el azul de metileno y la picrofucsina:

- 1.º Coloración de los cortes durante cinco á diez minutos en una disolución acuosa al 1 por 100 de azul de metilo;
- 2.º Lavado en agua abundante durante largo tiempo, para evitar la formación de precipitados irregulares;
- 3.º Coloración con la picrofucsina, cuya fórmula se ha indicado con anterioridad durante cinco á diez minutos;

- 4.º Lavado y deshidratación rápida en alcohol absoluto;
- 5.º Aclaramiento en esencia de bergamota y montaje en bálsamo.

COLORACIONES POR IMPREGNACIÓN. — Como ya hemos indicado, aquí no nos ocuparemos más que de las impregnaciones que se obtienen con las sales de plata, puesto que son las de aplicación más general, ya que las que se obtienen con los compuestos de oro y de mercurio se aplican á corto número de tejidos y deben por tanto estudiarse en la técnica especial.

Las sales que se utilizan para obtener la impregnación argéntica son: el nitrato, el citrato y el lactato de plata, usándose de preferencia el primero en disoluciones acuosas al 1 por 200, 300, 500 ó 1000.

Para impregnar un tejido cualquiera (elegiremos como ejemplo el mesenterio) se procede de la siguiente manera: se abre con rapidez la cavidad abdominal de un animal recién sacrificado, se coge con unas pinzas un trozo de la membrana serosa que se sujeta mediante alfileres á una rodaja de corcho, cuidando de que la membrana se halle bien extendida, pero sin verificar tracciones demasiado violentas para que no se desgarran los endotelios. Inmediatamente se hace caer suavemente en la superficie de la membrana un chorrito de agua destilada, con una pipeta con objeto de arrastrar los glóbulos rojos y blancos y el líquido albuminoso que se encuentran sobre la serosa. Sin pérdida de tiempo se vierte gota á gota sobre la membrana la disolución de nitrato de plata, usando por ejemplo la del 1 por 500. Al cabo de uno ó dos minutos se deja de verter la disolución argéntica sobre la membrana, se lava con cuidado con un nuevo chorrito de agua destilada, se la sumerge en alcohol de 90º durante breves instantes, se la cubre con una gota ó varias de glicerina y se la expone á la luz durante unos instantes hasta que la reducción de la plata sea completa. No hace falta más para terminar la preparación que cortar un trozo de la serosa y montarlo en glicerina, ó bien lavar nuevamente con alcohol para deshidratar, aclarar con una esencia dando preferencia á la de clavos, lavar nuevamente en xilol y montar en el bálsamo.

## CAPITULO IX

### MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Los cortes una vez teñidos, deshidratados y aclarados pueden observarse directamente al microscopio, pero al cabo de poco tiempo se alteran y es necesario al colocarlos entre el porta y el cubreobjetos, incluirlos en una substancia que, no alterando ni el tejido ni las substancias colorantes

empleadas, permita observar la preparación en cualquier tiempo. Tiene por objeto, pues, la conservación de las preparaciones, colocar los tejidos en condiciones para que las causas ordinarias de destrucción no actúen sobre ellos y dar á los cortes la transparencia necesaria á fin de poderlos estudiar con el microscopio.

Para montar definitivamente una preparación, es necesario tener siempre en cuenta las siguientes reglas: 1.º los objetos preparados deben colocarse en un medio de una refringencia apropiada á su grado de transparencia; 2.º este medio debe mojar los cortes penetrando por tanto en toda su masa; 3.º debe además mantener los objetos en el estado en que se encuentran al ser montados, oponiéndose por consiguiente á la putrefacción ó cualquiera otra clase de modificación física ó química.

Para montar las preparaciones una vez extraídos los cortes del agua donde han sido lavados ó de las sustancias aclaradoras se recogen con una espátula ayudándose de la aguja enmangada, se trasladan al portaobjetos, cuidando de que ni se arruguen ni se doblen y se termina la preparación depositando una gota sobre el corte, de la sustancia conservadora y se termina colocando encima el cubreobjetos, cuidando de que no queden burbujas de aire incluídas en la masa líquida.

Las sustancias que se emplean para montar y conservar las preparaciones, pueden clasificarse en dos grupos: sustancias resinosas, entre las cuales figura como principal el bálsamo del Canadá y sustancias acuosas como la glicerina; es distinto el procedimiento que debe usarse para montar las preparaciones según se usen las materias comprendidas en uno ó en otro de estos grupos.

*Montaje en las resinas.* — Condiciones necesarias é imprescindibles para montar las preparaciones en las resinas, son la previa deshidratación y el aclaramiento, operaciones de las que ya nos hemos ocupado al tratar de los métodos de coloración.

«Cuando la esencia ha penetrado perfectamente en los cortes se quita el exceso dejándola escurrir sobre el portaobjetos convenientemente inclinado. Si se quiere detener la acción decolorante de algunas esencias antes de montar la preparación, se vierten sobre los cortes algunas gotas de xilol el cual substituye á aquélla, no siendo, por regla general, necesaria esta operación, pues de ordinario puede ser substituída la sustancia aclaradora por una ó dos gotas de la disolución resinosa elegida.

»Una vez hecho esto, se seca perfectamente con un trapo de hilo fino un cubreobjetos de dimensiones apropiadas á la preparación que ha de recubrir. Se coge dicho cubreobjetos con la mano izquierda cuidando de sujetarlo por sus bordes á fin de no tocar con el pulpejo de los dedos la superficie de sus dos caras y se deposita una gota de la resina en una de ellas, y cogiendo entonces la laminilla con la mano derecha se vuelve hacia abajo el lado sobre el cual se ha depositado la resina y se aproxima al portaobjetos hasta que las dos gotas se confunden y van extendiéndose paulatinamente entre las dos láminas.

»La resina colocada entre el cubre y portaobjetos, se seca poco á poco, llegando á solidificarse y manteniendo unidos el cubre y el porta no haciendo, pues, necesaria la cementación como es preciso realizar cuando se



montan las preparaciones en medios acuosos tales como la glicerina. Conviene vigilar las preparaciones en las que se han colocado cortes gruesos, durante algunos días, puesto que la resina al secarse se retrae y deja penetrar burbujas de aire. Para remediar este inconveniente se deposita una gota de la resina en el borde de la laminilla y en la vecindad de la burbuja de aire. La resina penetra por capilaridad y rellena por completo el espacio vacío» (VIALLETÓN).

*Montaje en la glicerina.* — Los cortes que han de montarse en la glicerina no necesitan ni la previa deshidratación ni el aclaramiento, así que una vez lavados después de la acción del colorante se trasladan al portaobjetos y sobre ellos se coloca una gota de glicerina, y se cubre con una laminilla, siguiendo para esta operación las mismas reglas que se han indicado al tratar del montaje en las resinas.

Es preciso que la glicerina no sobresalga nada de los bordes del cubreobjetos, para lo cual con un trapo de hilo fino se secan cuidadosamente estos bordes. Pero como la glicerina es una substancia que no se solidifica, es necesario por una parte impedir su evaporación y por otra evitar la movilidad del cubreobjetos sobre el portaobjetos, recurriendo á la operación complementaria que se conoce con el nombre de *cementación*.

Esta operación consiste en recubrir los bordes de la laminilla con una substancia solidificable que una el cubre al portaobjetos y encierre entre ellos al líquido conservador. La substancia que se usa de preferencia como cementadora es la parafina. Para aplicarla se procede de la siguiente manera: perfectamente limpios los bordes del cubreobjetos para evitar que la glicerina desbordante impida la adherencia de la parafina, se calienta un alambre grueso de cobre, acodado, en la llama de una lamparilla de alcohol ó de un mechero Bunsen y se sumerge en un trozo de parafina sólida, se tocan con la punta del alambre los cuatro ángulos del cubreobjetos, y nuevamente calentado dicho alambre y sumergido otra vez en la parafina se pasa sucesivamente por cada uno de los cuatro lados del cubreobjetos, quedando con esto terminada la cementación con la parafina. Para dar mayor estabilidad y que resulte más estética la preparación, es conveniente pasar por encima de la parafina solidificada un pincel empapado en una disolución muy espesa de lacre en alcohol. Esta disolución una vez evaporado el alcohol protege á la parafina, creando una costra sólida y bastante resistente.

---

## APÉNDICE Á LOS MÉTODOS GENERALES

### PROCEDIMIENTO DE FIJACIÓN, INDURACIÓN É INCLUSIÓN CON LA ACETONA

La generalidad de los métodos expuestos para la inclusión con parafina tienen el grave inconveniente del largo tiempo que se necesita para realizarlos, por lo cual recientemente HENKE y ZELLER recomendaron la

acetona como medio sencillísimo de hacer inclusiones en parafina, puesto que esta substancia fija, deshidrata y prepara el objeto para ser incluido.

BRUNS ha notado que á veces no penetra bien la parafina en los tejidos deshidratados por la acetona, principalmente si la deshidratación no es completa, pero se empapan rápidamente en xilol, aunque no estén completamente deshidratados, haciendo posible la inclusión en la parafina y cortes desde 5 hasta 10  $\mu$ . Modifica el procedimiento de HENKE y ZELLER del siguiente modo:

Pedacitos del tejido se colocan en un frasco con acetona que tenga en su fondo sulfato de cobre calcinado, cubierto con un papel filtro. Se dejan allí de veinte á cincuenta minutos, según su tamaño y riqueza en agua. Para conocer poco más ó menos si la deshidratación es completa se aprieta ligeramente el objeto entre los pulpejos de los dedos para cerciorarse de que no está más blando por dentro que por fuera. De la acetona se pasan al xilol donde á los cinco ó diez minutos se vuelven translúcidos por igual, y entonces se colocan en la parafina fundida en la estufa por espacio de quince á veinte minutos, al cabo de los cuales se puede obtener el bloque.

Hemos ensayado repetidas veces y siempre con éxito este procedimiento, que creemos está llamado á generalizarse por su comodidad y rapidez.

Procedemos de la siguiente manera, modificando ligeramente el procedimiento antes indicado:

- 1.º Fijación de los tejidos por espacio de una á dos horas en el sublimado á saturación;
  - 2.º Lavado de los objetos en agua corriente durante media hora;
  - 3.º Coloración en masa con ácido carmínico ó hematefna durante veinticuatro horas;
  - 4.º Lavado en agua hasta que los tejidos dejen de soltar color;
  - 5.º Inmersión en la acetona con el sulfato de cobre calcinado por espacio de treinta á cincuenta minutos;
  - 6.º Traslado de los tejidos al xilol durante diez á quince minutos;
  - 7.º Inclusión en parafina en la estufa por espacio de media á una hora;
  - 8.º Obtención del bloque, práctica de los cortes y montaje de los mismos.
-