

Apuntes de Técnica Histológica

extractados de las conferencias del doctor Camilo Trefogli

MICROSCOPIO

Los elementos que constituyen a los seres organizados son tan pequeños, que no se pueden examinar a simple vista en la mayoría de los casos. Para ello es necesario hacer uso de ciertos medios que imprimirán en nuestros sentidos una imagen agrandada de estos elementos.

Se sabe desde hace mucho tiempo que las lentes, es decir, los sólidos transparentes limitados por superficies esféricas, pueden, en ciertas condiciones, reproducir, agrandadas, las imágenes que se examinan por su intermedio.

Antiguamente se usaban lentes formadas por cristales más o menos costosos; hoy día no se usan sino muy raramente, lo más a menudo se hace uso de lentes construidas con vidrio artificial, de una composición química determinada.

Se ha demostrado, en efecto, que las propiedades del vidrio, y en particular su poder dispersivo e índice de refracción, dependen en gran parte de su constitución química.

Se llama *crown-glass* un vidrio de débil poder dispersivo y de un gran índice de refracción; mientras que el *flint-glass* es un vidrio de un gran poder dispersivo. El *flint-glass* encierra en su constitución química elevada proporción de óxido de plomo, de arsénico, de manganeso y, sobre todo, de anhídrido silícico. El *crown-glass* encierra en su constitución química, además de una fuerte proporción de anhídrido silícico, metales alcalinos, alcalino terrosos y anhídrido bórico; de donde se deduce que el *flint-glass*, por su riqueza en plomo, es, en general, más pesado que el *crown-glass*.

El poder dispersivo del *flint* crece con el aumento de la cantidad de óxido de plomo que entra en su composición.

Las lentes se dividen, según su forma, en dos grupos principales: las unas,

más espesas en su centro que en los bordes, se llaman lentes positivas o convergentes, y las otras, menos espesas en el centro que en los bordes, se llaman negativas o divergentes.

Entre las lentes positivas se conocen : las lentes biconvexas, las planoconvexas y las meniscos convergentes.

Todos los rayos paralelos al eje que caen sobre una lente positiva, convergen hacia un punto del eje óptico situado del otro lado de la lente: el *foco*; la distancia que media entre el foco y el centro de la lente es la *distancia focal*.

Los rayos luminosos que caen paralelamente al eje de una lente negativa son dispersados de tal manera que parecen provenir de un punto luminoso situado del otro lado de la lente; aquí el foco es virtual y la distancia focal negativa. Entre las lentes negativas, que son siempre más delgadas en el centro que en los bordes, se distinguen : las lentes bicóncavas, las plano-cóncavas y las meniscos divergentes.

Según las leyes de óptica bien conocidas, una lente biconvexa dará una imagen real e invertida siempre que el objeto esté situado más allá del foco.

A medida que el objeto se acerca al foco, la imagen se aleja de la lente y su tamaño aumenta; cuando el objeto se encuentra en el foco, la imagen se hace infinitamente grande. Si el objeto se sitúa entre el foco y la lente, se obtiene una imagen derecha, virtual, mayor que el objeto y situada del mismo lado de la lente.

A medida que el objeto se acerca a la lente, la imagen continúa siendo derecha, virtual, mayor que el objeto, aunque el tamaño de la misma va disminuyendo a medida que el objeto se acerca a la lente.

Si se tratara de una lente bicóncava, el caso es mucho más simple. Ellas dan de todos los objetos imágenes derechas, más pequeñas que el objeto, y cuyo tamaño aumenta a medida que el objeto se acerca a la lente. Cuando el objeto se coloca junto a la lente, la imagen es del mismo tamaño que el objeto.

Si se quiere observar netamente la imagen dada por una lente, el ojo debe estar situado a una distancia del objeto más o menos de 250 milímetros y es a esa distancia del ojo del observador al objeto que se llama *distancia de la visión distinta*.

Con el nombre de *aberración de esfericidad* se designa la particularidad de las superficies esféricas refringentes, por la cual, de los rayos incidentes paralelos al eje, sólo los más vecinos al eje óptico convergen al foco, mientras que los rayos incidentes marginales, más alejados del eje óptico, convergen siempre en un punto situado más cerca de la lente que el foco.

Los rayos rojos son refractados más débilmente que los azules; convergen, pues, hacia un punto situado a mayor distancia de la lente que los azules. Este fenómeno constituye la *aberración de cromaticidad* o *aberración cromática*.

La aberración de esfericidad se corrige simplemente, haciendo uso de un diafragma, o sino, combinando lentes cuyos radios de curvatura sean diferentes.

La aberración cromática se corrige combinando lentes de un poder dispersivo diferente; verbigracia, combinando una lente biconvexa de *flint-glass* con una lente planocóncava de *crown-glass*.

Hechas estas explicaciones preliminares, abordaremos la descripción detallada del microscopio.

El sistema óptico de un microscopio reposa sobre la llamada parte mecánica del mismo, la cual se compone a su vez de diferentes elementos, que pasaremos en revista detalladamente.

La parte mecánica consta del *pie* en forma de herradura, que se prolonga hacia arriba por una *columna*. La mayor parte de las veces se encuentra en la parte media de esta última, y un poco por encima del pie, una articulación que permite inclinar el instrumento y facilita, por lo tanto, la observación en posición sentada. Un poco por encima de esta articulación se encuentra la *platina*, cuadrangular o circular, sólidamente unida a la columna, y presentando en su parte media una abertura circular, la *apertura del objetivo*. Sobre la platina se encuentra la preparación a observar, mantenida si es necesario, por dos ganchos o pinzas. La platina separa, al mismo tiempo, la parte superior del microscopio de la parte inferior del mismo.

En la cara inferior de la platina se encuentra una corredera destinada a soportar el *aparato de condensación*, que no es más que un sistema de lentes engarzado en un armazón metálico. Por medio de un tornillo situado al lado de la corredora, se puede movilizar el aparato de condensación haciéndolo acercar o alejar de la superficie de la platina. Si se da vueltas al tornillo hacia la derecha el aparato se acerca a la platina, y su lente superior penetra en la abertura objetiva hasta que se halle situada en el mismo plano que la platina. Si se da vuelta hacia la izquierda, el aparato de condensación se alejará de la platina y, finalmente, se excentrizará hacia la izquierda.

Sobre el borde inferior del aparato de condensación se ven dos botones; uno sirve para abrir o cerrar la abertura del diafragma iris, el otro está fijado a un anillo que se puede excentrar, y sobre el cual se pueden colo-

car vidrios coloreados, verbigracia, azules, que se usan con frecuencia cuando se trabaja con luz artificial.

Debajo del aparato de condensación se encuentra el *espejo*. Es un espejo doble, plateado, una de cuyas caras es plana y la otra cóncava. Está ligado a la columna por medio de un brazo articulado y fijado a un semi-anillo metálico, móvil de tal manera que se le pueden dar todas las posiciones imaginables.

Por encima de la platina, el prolongamiento de la columna forma un prisma metálico triangular, sólo visible en la extensión de pocos milímetros, porque se halla contenido en un cilindro hueco, metálico, llamado *portatubo*.

El calibre del porta-tubo corresponde exactamente al espesor del prisma, lo mismo que la longitud de su cavidad. La extremidad superior del portatubo está cubierta por la cabeza de un tornillo, el tornillo micrométrico. El portatubo se prolonga hacia adelante por un brazo que lo une al tubo del microscopio. El tubo es un cilindro hueco, de latón, por cuya extremidad superior penetra un tubo más estrecho, provisto de una escala dividida, que es el *tubo de tiraje*.

La unión del tubo y del portatubo se realiza por medio de una cremallera redondeada situada detrás del tubo. Ella se ajusta exactamente a la serie de agujeros correspondientes del portatubo, y sus dientes penetran en un pequeño tambor en las extremidades del cual se encuentra colocada una rueda plana. Si se da vuelta a esa rueda, el tubo se mueve hacia arriba o hacia abajo, y se acerca o se aleja, por lo tanto, de la platina.

En la extremidad inferior del tubo existe fijado un *revólver*, es decir, un dispositivo para cambiar los *objetivos*. Este aparato se compone de una lámina cóncava y de una pieza metálica móvil sobre la precedente, cuyos tres brazos llevan un anillo metálico provisto de un paso de tuerca. La rotación de esta pieza metálica sobre la lámina se hace alrededor de uno de sus ejes. La lámina misma no posee sino un paso de tornillo, por medio del cual está fijada a la extremidad del tubo. Si este tornillo está bien fijado, sólo podrá moverse la pieza de los tres anillos, de manera que las tres aberturas anulares correspondan exactamente a la extremidad inferior del tubo. En la parte superior del tubo de tiraje se halla colocado el *ocular*.

Estudiaremos ahora, con más detalle, algunas de las partes más importantes del microscopio, a saber: los objetivos, los oculares, el aparato de iluminación y el tornillo micrométrico.

Los objetivos. — Siguiendo en un todo las leyes de óptica, el objetivo

dará una imagen del objeto, real, invertida y agrandada. Para que esta última imagen pueda ser todavía agrandada por el ocular, es necesario que esté exenta en lo posible de defectos y, en particular, la aberración de esfericidad y la aberración cromática deben ser corregidas con esmero.

Para reunir las condiciones enunciadas el objetivo no debe, en realidad, estar compuesto de una sola lente, como lo suponíamos antes, sino de varias que están situadas las unas detrás de las otras en una vaina metálica común, de manera de estar exactamente centradas, es decir, encontrarse todas colocadas exactamente sobre el mismo eje óptico.

En general, cada lente es más grande que la que la precede, de manera que la primera, llamada *lente frontal*, es la más pequeña. La lente frontal produce sola o casi sola el aumento. Las otras lentes están destinadas a corregir los defectos de la imagen dada por la lente frontal; son las *lentes de corrección*.

La talla de una lente frontal nos indicará, pues, el poder de aumento de un objetivo ordinario, de modo que cuanto más grande es la lente frontal tanto menor es el aumento. Los objetivos débiles poseen una distancia focal mayor que los objetivos fuertes.

En los objetivos débiles la lente frontal está formada por la reunión de varias lentes simples. En los objetivos fuertes, por el contrario, está formada por una sola lente simple, planoconvexa o hemisférica, cuya superficie plana está dirigida hacia el objeto.

Los diferentes sistemas de lentes que componen los objetivos están constituidos por variedades de vidrios que poseen un poder de refracción y de dispersión diferente. Se ha llegado a construir lentes talladas en un mineral: el espato o fluorita. La fluorita no posee un poder de refracción superior al *crown-glass*, pero su poder dispersivo es mucho mayor que cualquiera de los vidrios que se construyen actualmente. Los objetivos en la constitución de los cuales entran vidrios artificiales, se conocen con el nombre de *acromáticos*, y aquéllos cuyas lentes son de fluorita, se llaman *apocromáticos*; sólo diremos de estos últimos que son de un precio muy costoso, sin presentar grandes ventajas sobre los objetivos corrientes, siempre que se trate de trabajos microscópicos comunes.

Nos queda por tratar un punto importante. Hasta ahora hemos admitido que los rayos luminosos emitidos por el objeto, llegaban directamente a la lente frontal a través del aire. En realidad, esta suposición no es exacta, pues en la mayoría de los casos los objetos están recubiertos de una delgada lámina de vidrio, el cubreobjeto; los rayos luminosos deben, pues, atravesar el cubreobjeto y luego una capa de aire antes de llegar a la lente frontal.

Ahora bien, al llegar a la capa de aire el rayo luminoso, como pasa de un medio más denso a uno menos denso, se desviará, sucediendo entonces que al objetivo llegarán muchos menos rayos luminosos de lo que habíamos supuesto. Esta pérdida de una gran cantidad de rayos luminosos tiene importancia cuando se trabaja con objetivos poderosos que necesitan de la mayor cantidad de rayos luminosos para reproducir imágenes nítidas; para ello se llena el espacio entre el cubreobjeto y el objetivo con una substancia especial, cuyo índice de refracción es parecido al del vidrio, y éste es el aceite de cedro. Se llama a estos objetivos, de *inmersión homogénea*, distinguiéndolos así de otros objetivos, en la inmersión de los cuales se utilizan otros líquidos como medio intermediario.

Hay, por ejemplo, sistemas de inmersión donde se emplea el agua, medio de poder de refracción menor que el aceite, o bien la monobromonaftalina, que es más refringente que el aceite. La monobromonaftalina se usa para aquellos objetivos cuya lente frontal está formada por un *flint-glass* fuertemente refringente. En resumen, un buen objetivo debe reunir las siguientes condiciones:

1ª Ser acromático, es decir, reunir completamente los rayos luminosos azules y los rojos;

2ª Reproducir las imágenes tan planas como sea posible;

3ª Poseer un buen poder definidor, es decir, reunir todos los rayos emanados de un punto del objetivo en un mismo punto de la imagen, de tal manera que ésta sea neta y no borrosa;

4ª Poseer un buen poder de resolución, es decir, revelar los más finos detalles de estructura de las preparaciones. El acromatismo de un objetivo se consigue por el empleo conveniente de lentes de poder dispersivo diferente. El poder definidor de un objetivo depende de la perfecta corrección de la aberración de esfericidad.

En fin, el poder de resolución de un objetivo depende exclusivamente de la apertura, y crece en proporción directa con ella.

Los objetivos son designados por sus constructores, por medio de cifras, árabes o romanas, o por medio de letras. Los objetivos más fuertes llevan cifras más elevadas o letras más alejadas de la A que los débiles. Los objetivos a inmersión y los apocromáticos, son designados por su distancia focal, expresada para los primeros en pulgadas inglesas, y para los segundos en milímetros. Un objetivo 1/12, significa que se trata de un objetivo que posee una distancia focal de 1/12 de pulgada inglesa, es decir, de dos milímetros.

Oculares. — El ocular se compone de un tubo metálico más o menos largo, que se adapta exactamente al tubo de tiraje, y en el cual se hallan

colocadas las lentes. Está terminado en su parte superior por un anillo metálico que sobrepasa sus bordes de tal manera, que impide al ocular caer al interior del tubo de tiraje.

Se distinguen varias especies de oculares: el de Huyghens, el de Ramsden y el ocular compensador.

Estudiaremos sólo el primero. Se compone de dos lentes planoconvexas, de las cuales una, la *ocular*, está situada en la parte superior, y la otra, el *vidrio del campo*, está en la extremidad inferior. Las dos lentes tienen su cara convexa dirigida hacia el objetivo y entre las dos, en el interior mismo del objetivo, se encuentra un diafragma. Los fabricantes designan a los oculares con cifras árabes o romanas.

Aparato de iluminación. — Hemos admitido hasta ahora que el objeto emitía por sí mismo rayos luminosos, lo que no corresponde a la realidad, y es por eso que buscamos con la iluminación artificial enviar sobre el objeto la mayor cantidad de rayos luminosos. Si se trata de una preparación opaca, puede iluminarse por la parte superior (luz incidente), mientras que las preparaciones transparentes son iluminadas por debajo, a través de la apertura de la platina (luz transmitida), por medio del espejo móvil que posee una cara plana y otra cóncava.

Si empleamos el espejo plano y tomamos como fuente de luz la del día, proyectaremos sobre el objeto un haz de rayos paralelos. Entonces cada punto de este objeto envía al objetivo un haz luminoso ligeramente divergente, cada uno de los cuales debe llenar completamente el ángulo de la apertura del objetivo, si queremos obtener un campo visual uniformemente aclarado en todos sus puntos. Este espejo sólo se usará con objetivos de pequeño ángulo, o sea con objetivos de pequeño aumento.

Con objetivos más poderosos emplearemos haces luminosos más divergentes que sólo el espejo cóncavo puede darnos. Este espejo cóncavo que hace convergente la luz paralela, está construido de tal manera que el punto de convergencia de los rayos cae sobre el objeto.

Cuando se trabaja con grandes aumentos emplearemos haces todavía más divergentes, para la producción de los cuales debe interponerse entre el espejo y el objeto un sistema particular de lentes designados habitualmente con el nombre de aparato de iluminación de Abbé o condensador de Abbé.

Este aparato consta de dos lentes empotradas en una vaina metálica. La cara inferior de la lente superior es algo mayor que un hemisferio, mientras que la lente inferior es biconvexa; las dos lentes forman en conjunto un poderoso sistema convergente, de tal manera que los rayos que provienen del espejo plano divergen fuertemente más allá del foco. Este

Ahora bien, al llegar a la capa de aire el rayo luminoso, como pasa de un medio más denso a uno menos denso, se desviará, sucediendo entonces que al objetivo llegarán muchos menos rayos luminosos de lo que habíamos supuesto. Esta pérdida de una gran cantidad de rayos luminosos tiene importancia cuando se trabaja con objetivos poderosos que necesitan de la mayor cantidad de rayos luminosos para reproducir imágenes nítidas; para ello se llena el espacio entre el cubreobjeto y el objetivo con una substancia especial, cuyo índice de refracción es parecido al del vidrio, y éste es el aceite de cedro. Se llama a estos objetivos, de *inmersión homogénea*, distinguiéndolos así de otros objetivos, en la inmersión de los cuales se utilizan otros líquidos como medio intermediario.

Hay, por ejemplo, sistemas de inmersión donde se emplea el agua, medio de poder de refracción menor que el aceite, o bien la monobromonaftalina, que es más refringente que el aceite. La monobromonaftalina se usa para aquellos objetivos cuya lente frontal está formada por un *flint-glass* fuertemente refringente. En resumen, un buen objetivo debe reunir las siguientes condiciones:

1ª Ser acromático, es decir, reunir completamente los rayos luminosos azules y los rojos;

2ª Reproducir las imágenes tan planas como sea posible;

3ª Poseer un buen poder definidor, es decir, reunir todos los rayos emanados de un punto del objetivo en un mismo punto de la imagen, de tal manera que ésta sea neta y no borrosa;

4ª Poseer un buen poder de resolución, es decir, revelar los más finos detalles de estructura de las preparaciones. El acromatismo de un objetivo se consigue por el empleo conveniente de lentes de poder dispersivo diferente. El poder definidor de un objetivo depende de la perfecta corrección de la aberración de esfericidad.

En fin, el poder de resolución de un objetivo depende exclusivamente de la apertura, y crece en proporción directa con ella.

Los objetivos son designados por sus constructores, por medio de cifras, árabes o romanas, o por medio de letras. Los objetivos más fuertes llevan cifras más elevadas o letras más alejadas de la A que los débiles. Los objetivos a inmersión y los apocromáticos, son designados por su distancia focal, expresada para los primeros en pulgadas inglesas, y para los segundos en milímetros. Un objetivo 1/12, significa que se trata de un objetivo que posee una distancia focal de 1/12 de pulgada inglesa, es decir, de dos milímetros.

Oculares. — El ocular se compone de un tubo metálico más o menos largo, que se adapta exactamente al tubo de tiraje, y en el cual se hallan

colocadas las lentes. Está terminado en su parte superior por un anillo metálico que sobrepasa sus bordes de tal manera, que impide al ocular caer al interior del tubo de tiraje.

Se distinguen varias especies de oculares: el de Huyghens, el de Ramsden y el ocular compensador.

Estudiaremos sólo el primero. Se compone de dos lentes planoconvexas, de las cuales una, la *ocular*, está situada en la parte superior, y la otra, el *vidrio del campo*, está en la extremidad inferior. Las dos lentes tienen su cara convexa dirigida hacia el objetivo y entre las dos, en el interior mismo del objetivo, se encuentra un diafragma. Los fabricantes designan a los oculares con cifras árabes o romanas.

Aparato de iluminación. — Hemos admitido hasta ahora que el objeto emitía por sí mismo rayos luminosos, lo que no corresponde a la realidad, y es por eso que buscamos con la iluminación artificial enviar sobre el objeto la mayor cantidad de rayos luminosos. Si se trata de una preparación opaca, puede iluminarse por la parte superior (luz incidente), mientras que las preparaciones transparentes son iluminadas por debajo, a través de la apertura de la platina (luz transmitida), por medio del espejo móvil que posee una cara plana y otra cóncava.

Si empleamos el espejo plano y tomamos como fuente de luz la del día, proyectaremos sobre el objeto un haz de rayos paralelos. Entonces cada punto de este objeto envía al objetivo un haz luminoso ligeramente divergente, cada uno de los cuales debe llenar completamente el ángulo de la apertura del objetivo, si queremos obtener un campo visual uniformemente aclarado en todos sus puntos. Este espejo sólo se usará con objetivos de pequeño ángulo, o sea con objetivos de pequeño aumento.

Con objetivos más poderosos emplearemos haces luminosos más divergentes que sólo el espejo cóncavo puede darnos. Este espejo cóncavo que hace convergente la luz paralela, está construido de tal manera que el punto de convergencia de los rayos cae sobre el objeto.

Cuando se trabaja con grandes aumentos emplearemos haces todavía más divergentes, para la producción de los cuales debe interponerse entre el espejo y el objeto un sistema particular de lentes designados habitualmente con el nombre de aparato de iluminación de Abbé o condensador de Abbé.

Este aparato consta de dos lentes empotradas en una vaina metálica. La cara inferior de la lente superior es algo mayor que un hemisferio, mientras que la lente inferior es biconvexa; las dos lentes forman en conjunto un poderoso sistema convergente, de tal manera que los rayos que provienen del espejo plano divergen fuertemente más allá del foco. Este

condensador posee una apertura de 1,20 y suministra rayos luminosos que divergen 104 grados. Si se quiere utilizar completamente esta apertura, es decir, evitar el desperdicio de los rayos que atraviesan el aire que separa el condensador del portaobjeto, se debe reunir la cara superior del condensador con la cara inferior del portaobjeto por medio de una gota de aceite (inmersión).

Muchas veces sucede que no se desea utilizar todo el cono de rayos dado por el aparato de iluminación, sino una parte; es entonces que se debe estrechar dicho cono por medio de dispositivos que se designan con el nombre de diafragma. Los diafragmas están intercalados sobre el trayecto de los rayos entre el espejo y el condensador, y pueden reducir el cono luminoso a un mínimun.

En nuestro estativo el diafragma es un *diafragma iris*, fijado al aparato que contiene el condensador debajo del sistema de lentes.

Un diafragma iris se compone de un gran número de delgadas laminillas metálicas (12 a 18) cuya forma es la de una lúnula. Estas laminillas están colocadas en un tambor metálico, de manera que se recubren completamente.

Un anillo móvil mueve estas laminillas, las cuales se van recubriendo para circunscribir en el centro un polígono curvilíneo, casi circular, a través del cual pasará el haz luminoso. Nosotros podemos, pues, gracias a este aparato, ensanchar o estrechar a voluntad el cono luminoso.

En particular, puede ser ventajoso suprimir completamente el aparato de iluminación para los pequeños aumentos, y en este caso pondremos en lugar del aparato, un diafragma cilíndrico, cuya apertura superior puede ser cerrada por medio de láminas metálicas, en cuyo centro se encuentran agujeros de pequeño diámetro.

La mejor fuente de iluminación para el microscopio es la luz del día, v. gr. la de una nube blanca, puesto que la luz cenital y la luz solar, deben ser formalmente proscritas. Entre las fuentes de iluminación artificial, la mejor y la más empleada es la de gas, poniendo detrás de la fuente luminosa una pantalla o un reflector.

El tornillo micrométrico. — Nos queda por dar una descripción precisa del tornillo micrométrico, que constituye la parte mecánica más importante del microscopio, y que exige una descripción detallada. Como hemos dicho antes, la columna del microscopio se continúa por encima de la platina, bajo la forma de un prisma que se halla metido dentro de la cavidad del portatubo. El prisma termina en una extremidad cilindrocónica que sobrepasa la extremidad del portatubo, la cual posee un tornillo que la atraviesa, y que al girar ejerce su presión sobre un resorte de acero encerrado.

dentro del portatubo. Estando el resorte en contacto directo con el prisma, se comprende fácilmente que la mayor o menor presión ejercida por el tornillo tendrá por resultado el ascenso o descenso de la columna y por consiguiente del portatubo.

Debemos, sin embargo, hacer presente, que los tornillos micrométricos de las diferentes casas constructoras, si bien están basados en el mismo principio, pueden presentar diferencias esenciales.

Reglas para el uso del microscopio. — La mayor parte de las casas constructoras de microscopios proveen al comercio, desde hace algunos años, de instrumentos de igual valor. No es necesario insistir de nuevo sobre los cuidados asiduos que necesita un microscopio para su conservación. Ante todo debe preservarse del polvo, poniéndolo siempre en su caja después de su uso, o cubriéndolo con una campana de vidrio.

Cuando se transporta un microscopio de un lugar a otro, se debe tomar por su base y no por el portatubo, como se hace a menudo. Los objetivos deben ser manejados delicadamente, limpiándolos de cualquier suciedad por medio de un paño suave o de un pañuelo, aunque es preferible limpiarlos con una gamuza. Si aun con estos elementos no se consiguiera una perfecta transparencia, se pueden poner los objetivos en una solución débil de alcohol.

Si la lente frontal se halla en perfectas condiciones y no obtenemos una imagen clara, lo mejor es devolver el objetivo al fabricante y nunca desarmarlo para efectuar una limpieza que redundará en perjuicio del lente mismo.

No debe dejarse nunca el microscopio desprovisto de oculares ni de objetivos.

Un punto merece todavía algunas aclaraciones, y es la instalación de la preparación, que ofrece a menudo dificultades al debutante. Si usamos objetivos fuertes sucederá a menudo que la lente frontal llegue a estar en contacto con el cubreobjeto; un exceso de presión de parte del observador puede tener como resultado la ruptura del cubreobjeto, cuando no pase otra cosa peor, como ser el posible deterioro de la lente, accidente grave e irremediable, sobre todo si se trata de objetivos de inmersión.

Debe ser regla absoluta para los principiantes, examinar primero cada preparación con un pequeño aumento, pasando luego a un aumento mayor, dando vuelta al revólver portaobjetivo y enfocando la preparación por medio del tornillo micrométrico.

Si se quiere emplear para el examen un objetivo de inmersión, luego de haber buscado con un objetivo de pequeño aumento el sitio deseado, se coloca una gotita de aceite de cedro sobre el medio del cubreobjeto, y se acerca la lente hasta que llegue a contacto del aceite. Una vez terminada la

operación, se limpiará el objetivo frotándolo delicadamente con un paño embebido en xilol o en alcohol fuerte. Mientras se observe un preparado, deberá enfocarse continuamente, para lo cual nos serviremos del tornillo micrométrico, mediante cuyo movimiento obtendremos siempre una imagen nítida.

Tales son, en pocas palabras, los elementos necesarios para el conocimiento y uso de los instrumentos más necesarios al histólogo y a todo el que use o efectúe trabajos microscópicos.

GENERALIDADES SOBRE TÉCNICA HISTOLÓGICA MÉTODOS DE CONSERVACIÓN. MÉTODOS DE FIJACIÓN

La técnica histológica es el conjunto de métodos utilizados para la confección de las preparaciones microscópicas.

La técnica está basada en parte sobre las propiedades del instrumento de investigación, el microscopio, y en parte, sobre las del objeto que se quiere estudiar. Un ejemplo concreto fijará mejor las ideas al respecto que largas disertaciones teóricas.

Supongamos que se trata de hacer una preparación microscópica de un riñón por ejemplo.

La primera tarea será la de reducir este órgano voluminoso a dimensiones, convenientes y además tratar de obtener una preparación que pueda ser examinada por transparencia. Dividiremos, pues, el órgano, por medio de un instrumento apropiado, en cortes tan finos como sea posible, o bien, una vez extraído un pedazo con una tijera, lo disociaremos por medio de agujas.

Esto hecho, recubriremos el objeto ya colocado sobre una lámina de vidrio (el portaobjeto), con una laminilla más pequeña (el cubre objeto).

Si deseamos practicar el examen de la preparación por medio de un objetivo fuerte, el espesor del objeto no debe ser mayor de una fracción de milímetro, a causa de la pequeñez de la distancia focal.

Todas estas manipulaciones necesitan tiempo, a menudo mucho tiempo, pasados en preparativos, durante los cuales el objeto experimentará modificaciones puesto que todo organismo sufre después de la muerte profundas alteraciones que cambian su estructura original, alteraciones que son, en general, tanto más rápidas cuanto más pequeño es el objeto. Debemos, pues, o bien retardar estas modificaciones, o hacerlas imposibles realizando una preparación inalterable. Además, si nosotros cortamos un riñón (del ejemplo) en cortes tan finos como sea posible, y lo conservamos inalterable en su estructura habitual, surge otra dificultad.

Los diferentes tejidos que constituyen nuestro objeto poseen propiedades ópticas tan parecidas que su diferenciación e identificación se hacen difíciles y aun imposibles a los observadores no iniciados. Para facilitar el diagnóstico convendrá, pues, tratar las preparaciones de diversas maneras por medio de las materias colorantes, vale decir, colorearlas.

Los medios microtécnicos pueden dividirse fácilmente en tres grupos, a saber: 1° los métodos de conservación; 2° los métodos de división; 3° los métodos de coloración.

Gracias a los progresos realizados hace cincuenta años, poseemos un verdadero arsenal de instrumentos más o menos complicados, y una cantidad de productos químicos, reactivos y materias colorantes que utilizamos en microtécnica. Estudiaremos, pues, estos diferentes agentes y su uso en histología.

MÉTODOS DE CONSERVACIÓN

Las condiciones en las cuales se examina un objeto no son siempre tan desfavorables como en el ejemplo del riñón. Si descendemos a examinar seres inferiores de la escala zoológica, nos encontraremos con millares de organismos tan pequeños y tan transparentes, como para poder ser observados y conservados vivos durante algunas horas y a veces hasta durante algunos días. Aun en animales superiores y en el hombre, pueden observarse y conservarse algún tiempo con vida, ciertos elementos de pequeña talla. Es relativamente fácil, por ejemplo, estudiar al microscopio y al estado fresco, sangre o espermatozoides.

Las características de estas observaciones en el vivo, es el poder examinar un objeto en condiciones vecinas a las normales. Así, para examinar infusorios provenientes de un acuario, los examinaremos en el agua de este mismo acuario. Pero si examinamos, por ejemplo, córpusculos sanguíneos, no los colocaríamos en agua, donde sucumbirían instantáneamente, sino en un medio como el suero sanguíneo, o en un líquido isotónico. Si elegimos un líquido hipotónico, como el agua destilada, este líquido penetra por ósmosis en los hematíes y los hincha; si inversamente usamos una solución hipertónica de una sal, aunque sea inofensiva, los hematíes se deshidratan y se retraen.

Los medios naturales más favorables para el estudio de los tejidos de los mamíferos son el suero sanguíneo, obtenido por centrifugación de sangre coagulada, o el líquido amniótico, proveniente del útero grávido de una vaca o de un porcino.

Se emplea también con el mismo fin, el líquido de la cámara anterior

del ojo de los grandes animales, obtenido por punción de la córnea, hecha con una jeringa de Pravatz. Entre los mejores medios indiferentes artificiales, el más conocido es la solución fisiológica de cloruro de sodio; ella debe contener para el examen de los tejidos en los mamíferos y en el hombre 0,9 por ciento de cloruro de sodio. La solución de Ringer es todavía mejor; encierra en 1000 centímetros cúbicos de agua destilada, 8 gramos de cloruro de sodio, 0,2 de cloruro de potasio, 0,3 de carbonato ácido de sodio y 0,2 de cloruro de calcio. A pesar del gran valor biológico que encierra el examen de organismos vivos, los exámenes morfológicos se hacen generalmente tomando por base tejidos muertos y conservados, para lo cual debe observarse el mayor cuidado al matar y conservar los órganos, de manera de conservar lo más fielmente que sea posible su estructura original. Esta estructura debe ser fijada.

Se designan los métodos y los reactivos empleados con este fin, con el nombre de métodos de fijación y agentes fijadores.

Si los elementos han sido muertos en un estado conforme a aquél que presentaban durante la vida, podrán ser fácilmente conservados intactos durante largo tiempo. Para comprender bien las condiciones en las cuales se realizan las fijaciones de los tejidos animales, haremos una corta incursión en los dominios de la química biológica.

Las células y las sustancias intercelulares que constituyen los organismos, se componen principalmente de : agua, cuerpos minerales, hidratos de carbono, grasas y albuminoides. Los albuminoides que, bajo nuestro punto de vista, forman la parte más importante de los tejidos, son cuerpos extremadamente complicados y de un peso molecular considerable. Bajo el punto de vista químico son, en parte neutros, en parte ácidos, en parte básicos, y son solubles en el agua, en los álcalis y en los ácidos débiles.

Su particularidad más importante bajo el punto de vista técnico, es la siguiente : pueden hacerse más o menos insolubles, es decir, son precipitados o coagulados por intermedio de ciertos agentes físicos y químicos.

El calor es el medio más conocido para precipitar la albúmina. Si se calienta una solución de albúmina a una temperatura vecina a los 100 grados, todos los corpúsculos albuminoides son precipitados a condición que la solución posea una reacción débilmente ácida. La albúmina precipitada se hace insoluble, entonces, en el líquido donde estaba disuelta antes.

Si se agrega a una solución de albúmina un ácido mineral, o ciertos ácidos orgánicos, se obtiene lo mismo una precipitación ; la albúmina se ha transformado en una ácido-albúmina que es ligeramente soluble en los ácidos diluidos.

Las sales de los metales pesados constituyen agentes mucho más impor-

tantes para la precipitación de las albúminas. Estas sales transforman la albúmina en un albuminato metálico insoluble en el agua, es decir, en una combinación poco estable de óxidos metálicos y albúmina.

El alcohol es también un medio de precipitación. Si se mezcla alcohol a una solución de albúmina, ésta precipita, pero si se le agrega agua, el precipitado se redisuelve. La albúmina no ha sido desnaturalizada por este procedimiento. Sin embargo si se deja actuar el alcohol durante un cierto tiempo, la albúmina se hace insoluble.

El formol, solución de formaldehído en agua, es hoy día frecuentemente utilizado en las ciencias y en la práctica de laboratorio, puesto que forma con la mayoría de los cuerpos albuminoides una combinación metálica insoluble en el agua.

Estas propiedades de los albuminoides son de gran interés para la técnica histológica, puesto que permiten fijar las imágenes celulares alterables transformándolas en sustancias solubles e inalterables.

Fijar, no significa otra cosa para nosotros que precipitar la albúmina; todo buen medio de fijación debe ser, pues, un buen medio de precipitación. La práctica de estos últimos años nos ha hecho conocer un gran número de procedimientos de precipitación de la albúmina, que se usan para la fijación.

Hemos aprendido, además, que en general existen ventajas en combinar la acción de diferentes reactivos; así, por ejemplo, se mezcla con ventaja alcohol o soluciones de sales metálicas con ácidos, en particular con el ácido acético, obteniendo excelentes resultados.

Antes de abordar el estudio detallado de los diferentes medios de fijación, es necesario todavía pasar en revista algunas nociones importantes bajo el punto de vista general y bajo el punto de vista práctico.

Para obtener en las preparaciones imágenes fieles de las estructuras vivientes, es necesario evidentemente, fijar el objeto vivo. Esto, que es sumamente fácil cuando se trata de piezas animales que pueden extraerse del animal en seguida de muerto, no pasa lo mismo cuando se trata de conseguir, por ejemplo, órganos humanos, por la cantidad de horas que separan el momento de la muerte, de aquél en que se pueden retirar los órganos, distancia que favorece la alteración de los elementos celulares. Además se conoce la dificultad para conseguir piezas anatómicas humanas frescas, dado que sólo pueden obtenerse de algún anfiteatro o de los ajusticiados. Se utilizan también los órganos provenientes de fetos.

Para matar los animales se emplea la mayor parte de las veces el cloroformo. Los pequeños animales se colocan debajo de una campana de vidrio en la cual se introduce un tapón de algodón embebido en cloroformo,

MEDIOS DE DIVISIÓN

Estos métodos tienen por objeto obtener, de un órgano más o menos voluminoso de la economía, preparaciones delgadas, transparentes, penetrables a los rayos luminosos y, por lo tanto, apropiadas para usos microscópicos.

La preparación de los objetos destinados a este fin puede ser obtenida por métodos más o menos diferentes, pero que en suma se reducen a dos principales: o bien se busca conservar la posición recíproca de las partes constituyentes de un tejido, o bien se busca separarlo de sus conexiones, en otros términos, disociarlo o aislarlo. Se consigue lo primero por los métodos de los cortes, que permiten dividir órganos enteros en pequeños fragmentos de un espesor que puede variar según las necesidades. Son los métodos más importantes en histología. Sin embargo, los métodos de disociación presentan todavía un gran interés, porque ellos nos enseñan, mejor que los cortes, la forma de los elementos que componen los tejidos.

MÉTODOS DE DISOCIACIÓN

Los elementos constitutivos de la mayor parte de los tejidos oponen una cierta resistencia a la separación mecánica. Para no citar sino un ejemplo, es totalmente imposible separar mecánicamente una fibra muscular de su tendón, puesto que están sólidamente unidos entre sí por una substancia intersticial particular. Muchos tejidos se presentan a estudio en condiciones semejantes, y es por esto que debemos tratar de disolver químicamente las substancias intersticiales, con lo cual el aislamiento mecánico de los elementos no ofrecerá mayor dificultad. Se designan los agentes químicos susceptibles de disolver las substancias intersticiales con el nombre de líquidos maceradores. Existen en gran número, pero sólo trataremos los más importantes.

Después de la muerte de los tejidos, el jugo intersticial constituye un medio donde se disuelve, por ejemplo, el cemento intercelular de los elementos epiteliales.

Así, los objetos que se fijan un largo tiempo después de la muerte, están más o menos desprovistos de epitelio.

Un excelente medio de maceración de los epitelios es el alcohol débil o alcohol al tercio (una parte de alcohol a 90 grados por dos partes de agua), con el cual, en 24 horas, los epitelios más diversos se dejan disociar.

Los vapores de ácido acético actúan todavía mejor, según nuestra experiencia; se extiende, por ejemplo, una mucosa sobre una placa de cera o de vidrio que se cubre con un cristizador en el cual se ha echado ácido acético. Algunos minutos después se puede separar, a grandes colgajos, el epitelio del corion.

La lejía potásica constituye un líquido de maceración de uso fácil. Se ponen 32,5 gramos de potasa cáustica en un vaso bastante grande. Se le agregan 67,5 gramos de agua y se disuelve agitando continuamente. Como durante la operación la temperatura de la solución se eleva, se pondrá el vaso en agua fría. Esta lejía concentrada aísla en 25 ó 30 minutos las fibras musculares lisas o estriadas, aunque a veces las retrae bastante.

Para macerar los tubos y alvéolos de las diferentes glándulas se emplean, sobre todo, los ácidos minerales concentrados, tales como el ácido nítrico, el ácido clorhídrico, y se deja que actúen durante 24 a 48 horas sobre las pequeñas piezas. Cuando los tejidos han sido preparados por la acción de agentes químicos convenientes, se pueden disociar mecánicamente.

Así, se agitarán los epitelios tratados con alcohol al tercio; después de algunas horas las células caen al fondo del vaso, de donde se las puede recoger por medio de una pipeta o por centrifugación.

Las mucosas sometidas a los vapores de ácido acético, serán divididas en pequeños fragmentos por medio de un bisturí o de una espátula, luego se aislarán las células sobre el portaobjeto por medio de un par de agujas o de una simple agitación.

Los fragmentos de músculos tratados por la potasa serán transportados en glicerina pura, a la cual se agregará, agitando con precaución, tintura de iodo mientras el líquido se decolora. A las 24 horas se pasa el tejido al agua y se disociará por simple agitación.

De las glándulas tratadas con ácidos minerales se extraen pequeños fragmentos, que se extienden sobre un portaobjeto en glicerina débil (una parte de glicerina en dos partes de agua).

MÉTODOS DE CORTES

Así como la disociación de los objetos frescos no sometidos a un tratamiento previo ocasiona dificultades considerables, lo mismo los cortes utilizables de los objetos frescos se obtienen difícilmente. Para que un objeto pueda ser cortado en cortes finos debe poseer una cierta consistencia, que difícilmente se encuentra en los tejidos del cuerpo. En efecto, y es el caso más frecuente, los tejidos son demasiado blandos y no ofrecen una re-

sistencia suficiente a la navaja, o bien, están tan impregnados de sales calcáreas que la navaja no puede cortarlos (huesos, dientes, cartílagos de animales adultos). Sólo el cartílago de los animales jóvenes posee condiciones de dureza que lo hacen apto para ser cortado por la navaja.

Las condiciones en las cuales se encuentran los objetos fijados son más favorables; la mayor parte de los métodos de fijación confiere a los órganos una cierta consistencia y hasta una dureza considerable.

El procedimiento más antiguo para el endurecimiento de las piezas es el frío. El objeto es congelado y dividido en cortes. Este método, aunque antiguo, da todavía buenos resultados.

Los métodos de inclusión constituyen un procedimiento bien diferente. El objeto es embebido en un cuerpo sólido fundido, que se solidifica después de su penetración. La parafina y la celoidina son las sustancias que hoy día desempeñan el papel más importante en las inclusiones.

Para incluir un objeto en parafina es necesario llevar a este cuerpo a una temperatura igual o superior a su punto de fusión. Si se mantiene un tiempo suficiente en esta parafina fundida un objeto tratado previamente de una cierta manera, este objeto es penetrado por el vehículo y adquiere por enfriamiento una consistencia que depende directamente del punto de fusión de la especie de parafina empleada.

La celoidina pasa, al contrario, al estado líquido, por disolución en una mezcla de alcohol y éter. Los objetos son incluidos en esta solución y endurecidos por evaporación y por un tratamiento ulterior conveniente.

Para los cortes se ha usado siempre la navaja. Este instrumento, de uso muy extendido, debe ser excelente para que los cortes den buenos resultados. Sin embargo, este medio primitivo, a pesar de su bondad, ha caído en desuso, dado que poseemos instrumentos que permiten obtener cortes sumamente finos: *los micrótomos*.

Describiremos con algunos detalles en los párrafos que siguen, los tres métodos de cortes más importantes para el fin que nosotros deseamos: método de congelación, métodos de las inclusiones a la parafina y método a la celoidina.

MÉTODO DE CONGELACIÓN

Es bien sabido que el frío no ejerce acción nociva sobre muchos organismos, aún muy diferenciados. Recordaremos solamente que, según las investigaciones de Raúl Pistet, las ranas pueden ser enfriadas hasta 28 grados bajo cero, tomando la consistencia del hielo y sobrevivir todavía si se las descongela con cuidado. Los músculos de los mamíferos pueden so-

portar durante largo tiempo temperaturas de -50 grados y contraerse muy enérgicamente después de haber sido descongelados. Sobre los objetos fijados, el frío no produce ningún deterioro.

Los objetos congelados de una manera conveniente toman una consistencia favorable para los cortes; tenemos, pues, con el frío, un agente de endurecimiento muy práctico.

Aprovéchase para ello el enfriamiento producido sobre una platina metálica, a la cual llega por medio de una cañería apropiada el ácido carbónico que se tiene encerrado en un obús metálico, bajo la fuerte presión de varias atmósferas.

El ácido carbónico proyectado debajo de la placa metálica que soporta la pieza anatómica, trae como consecuencia la congelación de los líquidos que impregnan los tejidos (fijadores, suero fisiológico, líquidos orgánicos), y de ahí el endurecimiento progresivo de la pieza destinada a ser cortada.

Una vez juzgada suficiente la dureza adquirida por la pieza, se reduce a cortes utilizando la navaja del micrótopo, que en la generalidad de los casos es de un tipo especial, por ejemplo, micrótopo de congelación tipo Sartorius.

Es conveniente acostumbrarse a manejar el congelador, puesto que la insuficiencia de dureza impide hacer buenos cortes por la poca resistencia ofrecida al filo de la navaja. En cambio, el exceso de congelación hace que los cortes se vuelvan quebradizos y, por lo tanto, fáciles de desgarrar.

Los cortes así hechos, quedan sobre la navaja o caen sobre el micrótopo, donde se descongelan; o se recogen en un cristizador con agua destilada.

La consistencia del objeto tiene una gran importancia para la obtención de cortes utilizables; depende no sólo de la temperatura, sino también de la estructura de la pieza.

El aparato produce, sobre la mesa de congelación, una temperatura de -12 a -15 grados, temperatura que es, en general, muy conveniente para piezas frescas embebidas en sus jugos naturales, pero demasiado baja para las que salen del agua, que al congelarse lo hacen encerrando en su interior pequeñas partículas de hielo, que luego serán molestas para la producción de buenos cortes.

Nosotros recomendamos poner las piezas en formol al 5 por ciento y ponerlas con este líquido sobre la placa de congelación; se obtendrán así casi siempre buenos cortes; raramente se estará obligado a usar el formol al 10 por ciento.

En lo que concierne al espesor de los cortes, se puede fácilmente, con el micrótopo, obtener cortes de 5 a 10 micrones, pero no aconsejamos ha-

cer cortes tan finos cuando no es necesario, pues el tratamiento ulterior de los cortes es tanto más delicado cuanto más fino es el corte. Cortes de 15 a 20 micrones convienen perfectamente al fin que nosotros perseguimos y muestran los más finos detalles de estructura cuando están perfectamente coloreados.

MÉTODOS DE INCLUSIÓN A LA PARAFINA

El método de inclusión a la parafina es mucho más complicado que el método de congelación. Se trata, en efecto, de incluir el objeto en la parafina, es decir, no rodearlo sino imbibirlo completamente, de tal manera que la pieza y la capa de parafina que lo rodea formen una masa homogénea. Esto no es, naturalmente, posible, sino cuando el objeto ha sido primeramente tratado por un buen disolvente de la parafina; este desiderátum exige manipulaciones preliminares muy complicadas.

Bajo el nombre de parafina se designa una mezcla de carburos de hidrógeno o hidrocarburos, de la fórmula general ($C_n H_{2n}$), donde el valor de n oscila entre 20 y 27. La parafina proviene de la hulla o de la ozókerita (para las parafinas duras) y constituye una masa blanca, untuosa, de una densidad de 0,9; su punto de fusión varía entre 40 y 85 grados, según su origen. Completamente insoluble en agua, casi completamente soluble en alcohol frío; también es soluble en sulfuro de carbono, cloroformo, bencina, benzol, xilol, toluol, el éter de petróleo, etc.; hierve a 300 grados.

Todos estos disolventes de la parafina no son, de ninguna manera, solubles en agua, pero son más o menos solubles en alcohol. Nosotros emplearemos como medio intermedio el cloroformo, que presenta muchas ventajas; se usa también el xilol. El tratamiento previo del objeto, que permite evitar manipulaciones delicadas, es el siguiente:

El objeto ya lavado y fijado se encuentra en el agua, desde donde se le hace pasar por alcoholes progresivamente reforzados. Se comienza con el alcohol al 10 por ciento y se aumenta en cada etapa un 10 por ciento de alcohol. Se obtienen estos alcoholes de grado diversos, agregando al alcohol de 95 grados o al absoluto, una cantidad de agua conveniente. La duración de los pasajes en cada uno de los alcoholes depende de la talla del objeto. Piezas de 1 centímetro cúbico no necesitan más que 12 horas, objetos pequeños de 2 a 4 horas. El objeto quedará siempre en el mismo frasco, que será, si es posible, un frasco de boca ancha, bien cerrado por un tapón de corcho, provisto de una etiqueta donde estará indicada en pocas palabras la naturaleza del objeto, el medio de fijación y el grado del alcohol. Se puede

así, deshidratar completamente en 5 días objetos de talla mediana, agregando al final alcohol absoluto que se cambiará una vez.

Para el pasaje en el disolvente de la parafina debe también procederse por grados. Se trata ordinariamente de la manera siguiente : se mezcla primero tres partes de alcohol absoluto y una de cloroformo ; luego partes iguales de los dos ; en fin, tres partes de cloroformo y una de alcohol absoluto. En cada una de estas mezclas el objeto permanecerá de 6 a 12 horas, y luego se pondrá durante una noche en cloroformo puro.

La imbibición en la parafina no puede realizarse sino cuando la pieza esté en parafina fundida en caliente, y si esta última queda líquida durante todo el tiempo de la inclusión. Para satisfacer esta condición se hace uso de una estufa análoga a la que se emplea para el cultivo de bacterias, o aun de una simple estufa de metal. Es una caja de latón de doble pared, provista de una puerta. El espacio comprendido entre las dos paredes se llena de agua, o mejor, de glicerina neutra, conociéndose el nivel del líquido por medio de un nivel situado en la parte externa. La temperatura de la estufa está indicada por medio de un termómetro. La fuente de calor se obtiene por medio de un mechero situado en la parte inferior de la estufa, y al cual llega el gas después de haber atravesado el termo-regulador.

Algunas estufas pueden ser calentadas por medio de petróleo o por medio de la electricidad. La temperatura de la estufa debe ser 1 ó 2 grados superior al punto de fusión de la parafina empleada.

Un punto importante de la inclusión a la parafina es la valuación exacta del punto de fusión. A este respecto debe considerarse que cuanto más fino debe ser un corte más dura debe ser la parafina, o más exactamente, mayor deberá ser la diferencia entre la temperatura del laboratorio y el punto de fusión de la parafina. Se podrá, por ejemplo, con una parafina de 52 grados hacer cortes de 5 micrones en una cámara fría, pero no en una pieza o en verano. Inversamente, se obtiene muy difícilmente cortes de 25 a 50 micrones en el primer caso y fácilmente en el segundo.

Puede decirse que para cortes delgados la diferencia entre la temperatura del laboratorio y el punto de fusión de la parafina debe ser alrededor de 40 grados. Si disminuye esta diferencia, los cortes delgados se arrollan y se deforman considerablemente. Para los cortes espesos la diferencia debe ser sólo de 30 a 35 grados, porque si es más considerable, los cortes se rompen.

Así, nosotros empleamos dos clases de parafina, una de 45 grados o parafina blanda y una de 56 grados o parafina dura. Para los cortes delgados empleamos solamente parafina de 56 grados, y para los cortes espesos agregamos a la parafina dura una cantidad mayor o menor de parafina blanda.

Para fundir la parafina se hace uso con ventaja de cristalizadores a fondo plano, de porcelana, de vidrio o de latón esmaltado.

Si el objeto está embebido en cloroformo se saca el exceso, se le agregan algunos fragmentos de parafina blanda y se pone el frasco abierto en la estufa. La parafina se disuelve al cabo de 15 a 30 minutos y se va agregando parafina hasta que haya una cantidad suficiente para recubrir el objeto después de la evaporación del cloroformo. Esta evaporación se emplea después de un día y el objeto se encuentra así embebido en parafina blanda en vez de estarlo en cloroformo.

Mientras tanto, se llena un cristizador de parafina y se va haciéndola derretir lentamente hasta llevarla a una temperatura superior en 2 ó 3 grados a su punto de fusión. Una vez fundida la parafina pura, se le llevarán los cortes, que permanecerán durante 2 ó 3 horas más o menos y luego llegará el momento de la inclusión definitiva. Ella puede ser realizada por medio de cajas de papel, de vidrios de reloj, cajas de metal, etc.; estas últimas se componen de dos láminas de metal en forma de escuadras, cuyos lados son de longitud desigual. Estas láminas puestas sobre otras de metal o de vidrio, circunscriben un espacio rectangular que puede ser ensanchado según se acerquen los lados de los ángulos. Las láminas y las placas de metal o de vidrio se untan interiormente con vaselina o glicerina; en seguida se llena la cajita o el molde de parafina, y se coloca el objeto, orientándolo según sea necesario.

En fin, hay que enfriar la parafina, lo que se hace metiendo el molde en un gran recipiente de agua. Es necesario, sin embargo, observar ciertas precauciones, puesto que la parafina, que es más liviana que el agua, tiende a hacer saliencia hacia la superficie y a deformar por lo tanto la inclusión. Se evita fácilmente este inconveniente, dando al molde una inclinación prudente y haciendo correr el agua por su superficie. Después de algunas horas de permanencia en agua fría, el bloque de parafina se ha hecho homogéneo y se separa fácilmente del molde.

Quedan así terminadas las inclusiones de parafina. Sólo queda ahora cortarlas, lo que se hará con algunos de los micrótomos que se describirán más adelante.

A menudo, los cortes hechos a la parafina tienen una marcada tendencia a arrollarse, lo que se evitará manteniéndolos por medio de un pincel. En seguida, la mayor partes de las veces, se fijará el corte sobre un portaobjeto, un cubreobjeto o una lámina de mica. Lo esencial es que los portaobjetos estén perfectamente limpios, para lo cual previamente serán tratados con ácido sulfúrico, luego lavados y por fin puestos en alcohol. En el momento del uso serán extraídos del alcohol y secados perfectamente,

condición necesaria para que los cortes se adhieran bien. Los cortes se adhieren al porta de diversas maneras ; se usa la glicerina albúmina (albúmina de huevo filtrada, mezclada a partes iguales de glicerina, a la que se agrega un cristal de timol para evitar la putrefacción) poniendo una delgada capa sobre el porta a la que se adherirá el corte.

Se usa además la esencia de clavo con colodión (mezcla de una parte de colodión a 3 ó 4 partes de esencia de clavo) depositando una gota sobre la que se colocará el corte. Sin embargo, uno de los mejores métodos es el que usamos nosotros, y consiste en poner los cortes en una cápsula, en la cual hay agua entibiaada; la temperatura será algo menor que la del punto de fusión de la parafina usada, donde los cortes se desarrollarán, o mejor dicho, se extenderán, facilitando así su adhesividad. Una vez bien extendidos los cortes, se colocarán en el vidrio haciendo escurrir el agua de exceso y se llevarán los portas a la estufa donde permanecerán 24 horas, al cabo de las cuales estarán perfectamente adheridos y podrán soportar la manipulaciones ulteriores para su coloración.

MÉTODO A LA CELOIDINA

La celoidina es una solución muy concentrada de fulmicoton o de dinitrocelulosa en una mezcla de alcohol y éter, que se encuentra en el comercio bajo la forma de laminillas rectangulares, espesas de más o menos un centímetro, y de una consistencia cartilaginosa. Estas placas son embebidas en alcohol y libradas al comercio en cajas de latón para evitar la evaporación, por lo cual se cierran herméticamente.

Para obtener una solución adecuada a la inclusión de las piezas, se debe primeramente secar cuidadosamente la celoidina. Con este fin se comienza por recortar la placa en delgadas laminillas, y cada una de éstas en delgados fragmentos, que serán llevados a la estufa recubiertos de papel de filtro, para evitar caigan en el cristizador partículas de polvo. Pocos momentos después, la celoidina forma pequeños trozos opalescentes de una consistencia parecida a la del cuerno o asta.

Al estado seco la celoidina es explosiva, razón por la cual deberá ser manejada con precaución en las diferentes manipulaciones. Se ponen los pedazos en un frasco de 800 a 1000 cc. de capacidad, completamente seco, cerrado por un tapón esmeril, donde se colocarán además unos 250 gramos de alcohol absoluto. La masa será a menudo agitada con una varilla de vidrio, y al cabo de 24 horas las masas se habrán reblandecido y tomado la apariencia de una masa gelatinosa. Se agregan entonces 250 gramos de éter

puro, y después de 2 ó 3 días se obtiene la disolución completa, sobre todo si se ha tenido la precaución de agitar convenientemente la solución con una varilla. Se tendrá así una substancia flúida y de consistencia siruposa : la solución madre de celoidina. Con esta solución se preparan dos mezclas : la celoidina I (mezclando una parte de solución madre y tres partes de alcohol-éter) y la celoidina II (una parte de solución madre y una parte de alcohol-éter). Estas mezclas deben ser guardadas en frascos bien cerrados.

La deshidratación completa del objeto es también aquí la primera y la más importante de las condiciones para obtener una buena inclusión a la celoidina. Se deshidrata, pues, el objeto progresivamente con los alcoholes reforzados, y se deberá cambiar por lo menos una vez el alcohol absoluto.

En seguida se pone al objeto durante 24 horas en una mezcla de partes iguales de alcohol absoluto y éter anhidro, y luego se pasará a la celoidina, es decir, a la celoidina débil, contenida en un frasco bien cerrado. El tiempo que debe permanecer en ella depende de la talla del objeto. Las piezas pequeñas pueden permanecer en ella dos días ; las piezas de regular tamaño dos o tres semanas.

Al ser sacado de la solución débil, el objeto es puesto en la solución fuerte, es decir, en la celoidina II, y luego en la solución madre, donde permanecerá un tiempo igual.

Cuando el objeto está bien embebido en la solución madre, se pondrá en una pequeña cajita o molde de papel para el endurecimiento de la celoidina, que se efectúa al aire, donde después de 8 a 10 minutos ya tiene una consistencia suficiente como para poder ser transportado al alcohol de 70 a 80 grados, donde se deja. Al cabo de 24 horas ha adquirido una consistencia suficiente como para ser cortado.

Para efectuar estos cortes se puede usar el micrótopo de plano inclinado, y durante la confección de éstos, la navaja estará constantemente cubierta de alcohol de 70 a 80 grados. Una vez terminado de hacer los cortes, la inclusión debe ser guardada en alcohol de 70 a 80 grados.

ELECCIÓN DE UN MÉTODO DE CORTES

Cada uno de los métodos de inclusión enumerados recientemente, posee sus ventajas y sus inconvenientes. El método de congelación presenta la ventaja de la rapidez de las operaciones. Además, fuera de la solución de formol, no hace uso de ninguna clase de reactivos, lo que altera al mínimo la colorabilidad de los objetos. Pero el serio inconveniente de este método de cortes, es cuando se trata de cortar objetos que presentan cavidades, lo que favorecerá la destrucción de los objetos.

El método de la parafina es, sin duda, el que modifica más la estructura de los objetos, pues supone no sólo un tratamiento intensivo por el alcohol, sino también una permanencia de los objetos en la estufa, por lo que siempre sufren en su constitución íntima. Su gran ventaja consiste en permitir la confección de cortes relativamente finos y de un tratamiento ulterior muy fácil. De ahí la supremacía actual del método de la parafina en los laboratorios de zoología e histología.

El método de la celoidina ocupa el justo medio entre los dos precedentes. Evita, es cierto, el calentamiento de las piezas, pero exige para dar un buen resultado, una permanencia muy larga en las soluciones, y además, manipulaciones muy cuidadosas.

Los tres métodos permiten obtener cortes muy delgados, de 5 a 10 micrones, siendo la parafina la que permite obtener los más finos.

Estas nociones permitirán elegir el método que más nos convenga, según la clase de objetos que deseemos incluir.

APÉNDICE A LOS MÉTODOS DE DIVISIÓN. LA DECALCIFICACIÓN

Las partes resistentes del cuerpo, huesos, dientes, etc., poseen, debido a sus impregnaciones calcáreas, tal dureza, que es imposible cortarlas. Para reblandecerlas es necesario disolver las sales calcáreas, es decir, tratarlas por los ácidos. Esta operación constituye la decalcificación.

En muchos casos los agentes fijadores pueden servir de decalcificadores. Así, el líquido cromo-ósmico-acético y el sublimado acético son excelentes decalcificadores, dando buen resultado cuando se emplean objetos pequeños, gran cantidad de líquido y, sobre todo, cuando se renueva éste a menudo.

Pero, en general, conviene fijar primeramente los objetos, y decalcificarlos después. Se emplearán para esto los ácidos, que transforman los carbonatos y los fosfatos de cal de los tejidos duros en sales solubles.

Entre los ácidos, el ácido nítrico se presenta en primera línea, empleado en abundancia en solución acuosa al 5 por ciento, sobre los objetos previamente fijados y lavados. Para apurar en lo posible la decalcificación, el objeto será frecuentemente removido en el líquido, y la solución a menudo cambiada. La duración de la decalcificación depende de la talla y de la cantidad de las sales que encierra el objeto. Para comprobar los progresos de la decalcificación, se atraviesa el objeto con una aguja o con una navaja hasta su completo ablandamiento.

Sin embargo, una permanencia de 2 a 4 días para fragmentos no muy gruesos ni muy viejos, y de 8 a 10 días para un diente entero, es suficiente.

Después de la decalcificación no se lavará inmediatamente con agua, sino que se hará actuar durante 24 horas, sea formol al 10 por ciento frecuentemente renovado, o una solución también frecuentemente renovada de sal de Glauber o sulfato de sodio al 5 por ciento, después de lo cual se podrá lavar con agua impunemente.

Entre los otros agentes decalcificadores, señalaremos el ácido tricloracético, cuyo empleo es en todo semejante al del ácido nítrico.

MICRÓTOMOS

El examen microscópico de los tejidos supone como condición indispensable la transparencia de la preparación, lo cual sólo puede lograrse de dos maneras: o disociando el tejido en sus elementos componentes, o reduciéndolo a cortes sumamente delgados. El cumplimiento de esta última condición es difícil cuando se corta a mano libre, porque las secciones son desiguales, pequeñas y casi nunca inferiores a 5 centésimos de milímetro de espesor. De aquí la necesidad de ciertos aparatos llamados micrótomos, cuyo oficio es la ejecución de cortes finos, extensos y regulares, de un órgano o tejido.

Numerosos son en la actualidad los métodos de micrótomos usados en los laboratorios. A pesar de la diversidad de principios en que se funda su construcción, pueden estos instrumentos clasificarse, considerando el mecanismo por el cual asciende el objeto seccionable, en dos grupos: micrótomos a tornillo y a deslizamiento.

Micrótomos a tornillo. — El más sencillo de los micrótomos de esta especie es el llamado de Ranvier; consiste en un tubo coronado en uno de sus extremos por una plataforma; en el otro hay una tuerca donde se mueve un tornillo micrométrico vertical. El movimiento del tornillo empuja la pieza seccionable, que se fija dentro del cilindro mediante un relleno de pedazos de médula de sauco. La navaja se desliza de plano sobre la plataforma, cortando la parte del objeto que sobresale de ella. Este micrótomos está hoy casi abandonado. Ciertos fabricantes, por ejemplo Zeiss, han perfeccionado este aparato, añadiéndole un pie y un tornillo micrométrico con rueda graduada para apreciar el espesor de los cortes.

Los micrótomos de tornillo empleados actualmente son aparatos más complicados, donde el movimiento de la navaja y el ascenso del objeto se opera con una gran regularidad y precisión.

Micrótomos por deslizamiento. — El tipo de estos micrótomos es el de Thoma-Jung que actualmente fabrican también, con algunas variantes de

construcción, Becker, de Cottigue; Leitz, de Yetzlar; Reichert, de Viena y Verick, de París.

El micrótopo de Thoma-Jung consta de un sólido pie cuadrilongo y de una lámina vertical, en una de cuyas caras se ve una resbaladera o carril para el bloque conductor de la navaja. Pero lo que da carácter a estos micrótopos es el mecanismo de ascenso de la pinza portaobjeto. En una de las caras del soporte vertical, aparece un plano metálico inclinado en dos sentidos, es decir, formando ángulo con la horizontal y con el soporte vertical. En este plano inclinado se mueven dos piezas: un bloque que mantiene una pinza portaobjeto capaz de toda suerte de movimientos, y una pieza pesada susceptible de ser sujeta a la resbaladera sobre la cual se desliza, impulsada por un tornillo micrométrico horizontal. Como la pieza portaobjeto asciende al resbalar, la navaja puede cortar sucesivamente nuevas capas de la pieza seccionable.

El tanto de ascenso del portaobjeto puede determinarse fácilmente consultando el tambor, que a favor de una ingeniosa combinación permite dividir la vuelta hasta en fracciones de micrón.

Hay otros tipos de micrótopos que se desvían algo de los anteriores; tales son el automático de Minot, el de palanca de la sociedad de Cambridge y otros. Estos micrótopos de alta precisión y perfectamente automáticos se emplean exclusivamente para obtener cortes de las piezas incluidas en parafina.

El micrótopo de Minot, que es uno de los más sólidos y perfectos, no debe faltar en ningún laboratorio de micrografía. La navaja está fija y el movimiento de vaivén indispensable al portapieza, así como la sucesiva impulsión de éste para ofrecer nuevas capas al filo, está arreglado por un mecanismo muy parecido al de las máquinas de coser.

Al bloque donde se sujeta la navaja puede fijarse una larga cinta donde se recogerán los cortes.

El micrótopo de Cambridge está basado en un principio exactamente igual.

Existen también micrótopos de gran tamaño para seccionar cerebros enteros, y su principio es el aplicado al pequeño modelo de Ranvier; tal es, por ejemplo, el micrótopo de Guddem, y lo mismo el de Nageotte, aunque este último aventaja al anterior por el automatismo del cuchillo.

Advertencia sobre los micrótopos. — Cuando no se puede comprar más que un micrótopo, debe darse preferencia a los universales, es decir, a los que sirven para cortar en parafina y celoidina (Thoma-Jung, Reichert, Schanze, Becker). En estos modelos téngase en cuenta que la dimensión de los cortes guarda relación con la longitud del micrótopo; así, con mi-

crótomos cortos, donde la navaja no tiene campo de excursión, es imposible hacer secciones extensas (por ejemplo, un globo ocular completo).

La pinza portapieza debe permitir toda clase de movimientos. La forma de pinza más aceptable es la llamada del laboratorio de Nápoles, que se usa hoy en casi todos los micrótomos.

El éxito de la microtomía depende, en general, de dos condiciones: de un perfecto endurecimiento e inclusión de la pieza (parafina o celoidina), y de que la navaja esté bien afilada, para lo cual el principiante deberá acostumbrarse a repasarla sobre una piedra fina y en el asentador cuantas veces necesite usar el micrótomo.

La navaja debe cortar todo lo oblicuamente posible, como serrando, aprovechando todo el filo de la misma.

El bloque conductor de la navaja, en los micrótomos por deslizamiento, ha de ser pesado con relación a la misma, a fin de que no oscile al imprimirle movimientos con la mano.

MÉTODOS DE COLORACIÓN

La coloración es un proceso por el cual, un objeto incoloro puesto en contacto con una solución colorante, se colorea.

El objeto toma habitualmente el tinte del colorante, pero en ciertas circunstancias puede tomar otro.

Los métodos de coloración son empleados en histología como el procedimiento más importante para el estudio de los tejidos.

Todas las materias colorantes empleadas en histología son sustancias orgánicas; contienen, pues, carbono y agua. Son obtenidas directamente del reino animal o vegetal, o bien son producidas artificialmente. Se distinguen, pues, los colores naturales y los artificiales.

Para que una materia colorante sea utilizable en histología, debe ser soluble. Entre los disolventes empleados se usa, sobre todo, el agua, el alcohol, más raramente la glicerina, soluciones alcalinas, ácidos o álcalis diluídos.

Para aumentar la potencia de coloración de numerosas soluciones acuosas de materias colorantes, se agregará anilina o bien agua anilinada. Se prepara este producto agregando una pequeña cantidad de anilina a una cantidad cualquiera de agua, se agita y se filtra a través del papel de filtro humedecido.

Habitualmente se hacen soluciones colorantes de una concentración determinada, es decir, que se disuelve una cantidad determinada de materia

colorante en cierta cantidad de disolvente, de manera de disolver todo el colorante.

Se opera, sea a la temperatura del laboratorio, sea calentando previamente la substancia colorante. A menudo se usan soluciones llamadas concentradas, es decir, que se agrega, agitando a menudo, un exceso de colorante a la substancia disolvente. Después de un cierto tiempo, el exceso de materia colorante cae al fondo del frasco y se obtiene así una solución de concentración máxima. Como en la mayor parte de los casos la solubilidad de las substancias colorantes depende de la temperatura, la concentración de las soluciones antedichas será variable. En la práctica deben usarse con precaución las soluciones concentradas, pues al depositarlas sobre la preparación siempre arrastran partículas sólidas de la substancia colorante, lo que contribuye a manchar la preparación.

¿Qué concentración conviene elegir para obtener una coloración tan completa como sea posible? Esto es algo difícil de precisar de una manera general. Hay quien afirma que las soluciones débiles dan mejores coloraciones que las concentradas. Esta opinión puede ser exacta para algunos colorantes, pero no puede ser admitida como idea general. La concentración de la materia colorante debe ser adaptada a la naturaleza de la substancia empleada y al fin que se desea obtener. Habitualmente se colorea a la temperatura del laboratorio. Sin embargo, a veces se hace uso del colorante previamente calentado, y en este caso los tejidos toman más rápida y más intensamente la coloración. La materia colorante actúa sobre los tejidos frescos o conservados. En el primer caso se trata de una coloración vital, o coloración al fresco.

No se obtiene una coloración vital, en el verdadero sentido de la palabra, sino sobre el organismo vivo, al cual se le incorpora la tintura de una manera apropiada. La incorporación de la materia colorante puede realizarse en los animales superiores por la ingestión, para lo cual será suficiente mezclar a los alimentos la substancia colorante; el color, disuelto en el bolo alimenticio, se reabsorbe en el intestino.

Más rápidamente, se inyecta bajo la piel una solución acuosa de la substancia colorante, o bien se hace esta inyección directamente en pleno torrente circulatorio en un animal previamente narcotizado, colocando la aguja en el extremo central de una vena. Esto supone, naturalmente, que la solución empleada no sea un veneno tan violento como para detener inmediatamente los latidos cardíacos.

Si se tratara de otra manera, habría que sangrar previamente al animal y realizar, en seguida, un lavaje bajo presión, del sistema vascular.

Sin embargo, en la mayoría de los casos, la coloración se hace usando

materiales que están fijados. Se distinguen dos procedimientos principales para colorear los objetos conservados; o bien se colorean en masa piezas más o menos gruesas, o bien se colorean los cortes. Para la coloración en masa se requiere usar un reactivo que sea difusible, lo que sólo se obtiene con los reactivos alcohólicos, que son los únicos que pueden penetrar fácilmente al interior de los tejidos gruesos, espesos, lo que unido a la dificultad de controlar la acción del reactivo, hace que este método de coloración sólo se emplee con poca frecuencia.

Al contrario, el método de los cortes es fácil de seguir; puede interrumpirse en el momento que se desee, lo que hace que sea un método de fácil manejo y de uso muy general.

La coloración de los cortes por congelación se realiza en bloques de cristal excavados por una cavidad esférica, cubiertos por una lámina de vidrio. El transporte del corte a la solución colorante se hace por medio de una aguja recurvada, o por medio de una varilla de vidrio retorcida, o de una espátula. Es importante que las agujas estén perfectamente limpias y pulidas, pues una simple aspereza basta para que los cortes se rompan o destruyan. Estas agujas servirán para seguir el corte en las manipulaciones sucesivas. Si se trata de colorear pocos cortes, se usará unas gotas del colorante, pero si se trata de realizar coloraciones de muchos, entonces se pondrán todos en un cristizador, del fondo del cual se pescarán con la aguja.

La coloración de cortes a la parafina se hace de preferencia en frascos cilíndricos, cuyo diámetro y altura son superiores al portaobjeto; o sino en cristalizadores con tapa cuando se trata de cortes adheridos al portaobjeto.

Para cada uno de ellos las manipulaciones sucesivas son idénticas; sólo se diferencian en que en unos se usan frascos y en otros cristalizadores.

Se disuelve primero la parafina, para lo cual emplearemos el xilol ($C_6H_4(CH_3)_2$), líquido claro, más liviano que el agua en la que no es soluble. La disolución de la parafina se produce en pocos segundos para cortes de mediano espesor, y para poder hacer desaparecer completamente el xilol, lo emplearemos el alcohol absoluto. Después de una permanencia variable en alcohol absoluto, los cortes se llevan al de 95 grados; de ahí al de 70, de donde podrán llevarse al agua sin peligro alguno.

El tiempo que deben permanecer los cortes en los alcoholes depende del espesor de los mismos y variará de 4 a 5 minutos en cada alcohol. Una vez llevados al alcohol de 70 grados, debemos llegar a la hidratación completa, para lo cual se llevarán los cortes a un cristizador con tapa, lleno de agua, donde se dejarán durante unos 5 minutos. Después de estas manipulaciones, el corte estará en condiciones de ser coloreado.

Los cortes a la celoidina son más fácilmente coloreables. Del micrótopo

donde se hallan sumergidos en alcohol de 70 grados, pasan directamente al agua o a la solución colorante.

Es inútil repetir que, cuando se haga uso de colorantes en soluciones alcohólicas, el pasaje de los cortes por el agua es perfectamente inútil.

Según que actúen una o varias tinturas sobre un corte, se obtendrán coloraciones simples o combinadas, y para estas últimas se eligen naturalmente los colorantes que ofrecen mayor contraste.

MATERIAS COLORANTES DE ORIGEN ANIMAL

Carmin. — La substancia matriz, productora del carmín, es la cochinilla. La cochinilla es el producto constituido por las hembras desecadas de un insecto, el *Coccus cacti*, que vive en algunas regiones de la América Central, sobre todo en Méjico. Este insecto vive como parásito de algunos vegetales, en especial de varias especies del género *Opuntia*. Las hembras son recogidas sobre las plantas poco antes que empiece la época de la postura de los huevos, y son muertas rápidamente, para lo cual se sumergen en agua caliente. Una vez muertas, son desecadas a la estufa o al horno, y se consigue así el material necesario para obtener el carmín. Se calcula que para obtener un kilo de cochinilla hacen falta alrededor de 140.000 animalitos.

El carmín es extraído de la cochinilla por medio de alumbre y del ácido tártrico, y constituye una masa oscura, terrosa, escamosa, que se encuentra en el comercio bajo forma de laminillas más o menos grandes.

El carmín es completamente insoluble en agua y en alcohol, y es soluble en los álcalis, en el amoníaco, en los ácidos y en las soluciones de bórax y de alumbre.

Químicamente, el carmín es un compuesto alúmino-calcio-proteico del ácido carmínico. El ácido carmínico es el principio colorante del carmín, y es al estado puro un polvo cristalino, de un hermoso color rojo, ligeramente soluble en el agua y en el alcohol. Forma sales solubles con los metales alcalinos y sales insolubles con los metales terrosos y pesados.

En microtécnica se usan las soluciones de cochinilla, de carmín y de ácido carmínico. Los mejores resultados se obtienen con el ácido carmínico químicamente puro, que es el que empleamos nosotros.

El *carmin-alumbre* se obtiene disolviendo en caliente 0,5 gramos de ácido carmínico en 100 cc. de una solución de alumbre al 5 por ciento, preparada en caliente y filtrada después de enfriada. La solución, de un tono violáceo, es adicionada, para su conservación, de un poco de formol, más o menos 0,5 a 1 por ciento. Este colorante colorea rápida e intensamente los

cortes, de un color rojo violáceo. Después de una permanencia de 10 a 15 minutos en el carmín-alumbre, las preparaciones son llevadas durante algunos segundos a una solución de alumbre al 5 por ciento y lavadas después con agua. Se obtendrá así, una coloración nuclear casi electiva. La solución de carmín-alumbre es muy conveniente para las coloraciones en masa, para lo cual, y si se trata de piezas de tamaño mediano, serán mantenidas en el colorante por espacio de 24 a 48 horas, después de lo cual sufrirán un abundante lavaje con agua.

El *paracarmín* da una coloración más intensa todavía. Para prepararlo se disuelve 1 gramo de ácido carmínico, 0,5 de cloruro de aluminio y 4 de cloruro de calcio, a una temperatura moderada, en 100 cc. de alcohol de 70 grados. Se deja depositar, se filtra y se conserva el líquido en frascos bien cerrados. Para colorear se diluirá esta solución en 5 ó 10 veces su volumen de alcohol de 70 grados, y se le agregarán una o dos gotas de ácido acético.

El carmín se emplea con igual éxito para las coloraciones en masa que para los cortes. El lavaje se efectúa simplemente con alcohol de 70 grados, al cual se adiciona un 2 por ciento de ácido acético para obtener una coloración electiva nuclear.

MATERIAS COLORANTES DE ORIGEN VEGETAL

El reino vegetal produce un gran número de materias colorantes, de las cuales sólo se emplean en técnica histológica la hematoxilina y el índigo.

La *hematoxilina* es extraída bajo forma de pequeños cristales rómbicos e incoloros del palo de campeche (*Hematoxylon campechianum*), árbol de la familia de las Leguminosas originario de la América Central. Es difícilmente soluble en agua fría, fácilmente soluble en agua caliente, en alcohol y en éter. Si se expone al aire o a la luz una solución de hematoxilina, se coloreará primero de amarillo y luego de pardo obscuro.

El *hemateína* es una hematoxilina completa o parcialmente oxidada. Se encuentra en el comercio bajo la forma de un polvo obscuro, soluble en agua, alcohol, éter, glicerina, álcalis y amoníaco.

La hematoxilina pura no se usa como materia colorante, se la mezcla a diversos cuerpos que actúan como mordientes.

La *hemalumbre* es un compuesto de hematoxilina. Para prepararlo se disuelven 50 gramos de alumbre en un litro de agua caliente y se filtra después del enfriamiento. Por otra parte, se disuelve el calor moderado 1 gramo de hemateína en 50 cc. de alcohol de 95 grados y se mezclan las dos soluciones; se obtendrá inmediatamente un líquido de color azul obscuro vio-

lado. Esta solución da casi siempre nacimiento a precipitados, razón por la cual debe filtrarse cada vez que se desea usar. El hemalumbre colorea los cortes en algunos segundos; después de la coloración se lavan cuidadosamente con agua clara, tomando los cortes un color azul obscuro. Si la preparación estuviera demasiado coloreada por el hemalumbre, se hará la diferenciación poniéndola en agua ligeramente acidulada con ácido clorhídrico (2 gotas de ácido clorhídrico en 50 cc. de agua), virando el color azul al rojo, mientras que el exceso de colorante desaparece. Después de la diferenciación se lava nuevamente con agua hasta que viren nuevamente al azul.

La *hematoxilina férrica* da una coloración nuclear todavía más intensa que la hemateína. Para prepararla se disuelven por una parte 10 gramos de alumbre de hierro en 150 de agua caliente y por otra parte 1 gramo de hematoxilina en 75 cc. de agua caliente. Se dejan enfriar las dos soluciones y se echará la primera en la segunda, calentando nuevamente y removiendo el líquido hasta que se llegue a la ebullición. Se obtendrá después de su enfriamiento, una solución pardo obscura lista para servir. Colorea rápida y fuertemente. Para diferenciar se procederá en la forma ya indicada.

Hematoxilina férrica de Heidenhain. — Este procedimiento de coloración fué imaginado por Heidenhain, y para aplicarlo es menester usar dos soluciones; una solución al 2,5 por ciento de alumbre de hierro y otra de hematoxilina al uno por ciento, de preferencia vieja y de un color pardo obscuro. Los cortes son colocados durante dos horas o más en el mordiente, después lavados rápidamente en agua y sumergidos durante una noche en la solución colorante. Se teñirán primeramente en gris, luego en azul gris, después en azul obscuro y por fin en negro. Para la diferenciación se les lleva nuevamente al mordiente después de un lavaje rápido en agua. Allí se decoloran poco a poco, dejando escapar nubes de colorantes. La decoloración debe ser observada atentamente y de preferencia debajo del microscopio.

Son los corpúsculos nucleares y la cromatina los que resisten más largo tiempo a la extracción del color; de modo que una vez terminada la diferenciación, los núcleos son puestos en evidencia neta. Cuando la diferenciación ha terminado se llevan los cortes al cristizador, donde sufrirán un prolijo lavaje al agua, la que deberá cambiarse varias veces.

Hematoxilina-Bicromato de potasio. — Se emplea esta hematoxilina para poner en evidencia las fibras del sistema nervioso central que poseen mielina.

Hematoxilina-Acido fosfomolibdico. — Se disuelve 1,75 gramos de hematoxilina en 250 cc. de agua caliente y se agrega 10 cc. de ácido fos-

fomolibdico al 10 por ciento y 5 cc. de ácido fénico puro licuado por el calor. Se obtendrá por esta mezcla un líquido azul oscuro, en el cual se colorean los cortes durante 15 a 20 minutos, después de haber hecho actuar como mordiente a una solución de ácido fosfomolibdico al 10 por ciento, en la cual se sumergen previamente los cortes durante 10 minutos. Luego son llevados al agua; después de efectuada la coloración se volverá a lavar con agua, y luego pasaje al alcohol.

La preparación en conjunto toma un tinte azul gris mate, de una débil intensidad. Sobre este fondo gris resaltan las fibras de colágeno, con un color azul oscuro. Este método permite poner en evidencia las fibras conjuntivas en regiones donde generalmente fracasan otras clases de reactivos.

Indigo. — Esta sustancia colorante conocida desde la antigüedad, se encuentra abundantemente en el reino vegetal, pero se extrae, sobre todo, del indigotero, planta de la subfamilia de las Papilionoideas, que se cultiva en la India. Se presenta en el comercio bajo forma de panes livianos, azul oscuros, insolubles en agua, alcohol, éter, y solubles en anilina, fenol, ácido acético, etc.

El ácido sulfúrico concentrado disuelve el índigo, formando el ácido índigo-sulfúrico. El índigo tratado por un reductor se transforma en índigo blanco, soluble en agua. El gran empleo que se hace en tintorería de este índigo es debido a estos dos productos: blanco de índigo y ácido índigo-sulfúrico.

En histología se emplea el índigo-carmin, que es una sal de sodio del ácido índigo-sulfúrico. Esta sal es un polvo de color azul oscuro, fácilmente soluble en agua, poco o nada en alcohol. En solución al 0,25 por ciento constituye un excelente colorante plasmático.

MATERIAS COLORANTES ARTIFICIALES

Dejando a un lado las sustancias colorantes de origen animal o vegetal, poseemos, además, un gran número de materias colorantes obtenidas por vía sintética; se las designa con el nombre de colorantes artificiales.

Hay que recordar, sin embargo, que todas las materias colorantes naturales o artificiales pueden ser reducidas en último análisis a una sustancia madre, el benzol, y que bajo este punto de vista no hay lugar, pues, a establecer diferencias esenciales. Así, por ejemplo, ya se ha podido reproducir por síntesis ciertos colores naturales, tales como el índigo. Todas las materias colorantes artificiales son extraídas del alquitrán. La expresión de *colores de anilina* no es bastante clara, puesto que la anilina no es la fuen-

te de todos los colores artificiales. Una clasificación racional de los colores es difícil, y por eso dividiremos los cuerpos en básicos, ácidos e indiferentes.

COLORES BÁSICOS

Bajo el nombre de colores básicos se designan las sales de las bases colorantes, sobre todo las derivadas de los ácidos sulfúrico, nítrico, acético y oxálico. Estas sales son la mayor parte de las veces más solubles en alcohol que en agua.

Los colores básicos gozan de una gran afinidad por la cromatina nuclear, y es por esto que se les designa con el nombre de materias colorantes nucleares. Colorean además, la substancia fundamental del cartílago, las granulaciones de los mastzellen, el mucus.

Fuscina. — Es el clorhidrato de rosanilina. Si se pone un exceso en agua anilinada y se mantiene la solución varios días, agitando a menudo, se obtendrá una solución que colorea en 10 a 15 minutos y aun más rápidamente si se emplea en caliente. Se lavará después con alcohol a 95 grados, adicionando o no un 10 por ciento de anilina.

Violeta de metilo. — Es el clorhidrato de hexametilempararosanilina. Polvo metálico de un color violeta obscuro, soluble en agua y más en alcohol. Se emplea más en histología el violeta de genciana. Se usa este colorante disuelto en agua o en agua anilinada, que colorea muy intensamente después de 10 a 15 minutos. Se usa para decolorar el alcohol de 95 grados, y si ésto no fuera suficiente se empleará el líquido diferenciador de Gram. Se prepara este líquido poniendo en un cristizador 1 gramo de iodo, 2 de ioduro de potasio y algunos cc. de agua; se agita hasta que la solución sea completa, y se agrega hasta 300 cc. de agua. Se pondrán algunas gotas sobre el corte previamente lavado en agua, y después de algunos segundos el corte tomará un tinte pardo, y será llevado de nuevo al alcohol de 95 grados. La preparación vira de nuevo al azul y se decolora. Si la decoloración no fuera bastante, se vuelve a hacer actuar el líquido de Gram. Este método de diferenciación que desempeña un papel importante en histología, permite obtener una coloración muy pura de la cromatina, y da excelentes resultados, sobre todo, para estudiar la carioquinesis.

Verde de metilo. — Es un derivado del violeta de metilo; es un polvo verde, de cristales microscópicos; se disuelve fácilmente en agua, y más difícilmente en alcohol, dando un líquido verde obscuro. Es uno de los mejores colorantes nucleares, a pesar de que casi nunca se le emplea solo; se le asocia generalmente a los colores ácidos.

La tionina es uno de los colores más antiguos; deriva de la hulla y pertenece al grupo de las thiazinas. Es un polvo cristalino, brillante, poco soluble en agua, a la que da un tinte azul violeta. Se emplea como colorante nuclear en soluciones al 0,1 por ciento. La coloración dura de 10 a 15 minutos, y después se lava en alcohol. La importancia de la tionina es debida a los tintes metacromáticos que confiere sobre todo al mucus, a la substancia fundamental del cartílago y a los granos de mastzellen.

Estas substancias, en efecto, se colorean en rojo, mientras que los núcleos quedan azules. Si se quiere observar el efecto metacromático, no se lavarán los cortes en alcohol, sino que se los pasa rápidamente al agua y se montan en levulosa.

Azul de metileno. — Este color, tan empleado en histología, es cloruro tetrametilado de tionina. Se encuentran diversas especies en el comercio. El mejor azul histológico es el azul químicamente puro, cristalizado. Se presenta como pequeñas agujas cristalinas, solubles en agua y en alcohol. Es poco soluble en los líquidos salinos, como, por ejemplo, la solución fisiológica, el líquido de Ringer y el agua de mar. Si se agrega un álcali a una solución de azul de metileno, se descompondrá dando nacimiento a azur de metileno y a violeta de metilo. La reducción de una solución acuosa de azul de metileno trae por resultado la decoloración, por la formación de un leucoderivado; la reoxidación se obtiene por simple agitación en el aire. Los tejidos vivos, la sangre, la orina, pueden ejercer esta acción reductriz sobre el azul de metileno.

El azul de metileno es un excelente colorante nuclear. Para utilizarlo de esta manera se hace una solución al 0,1 ó al 1 por ciento, y se colorea durante 10 a 15 minutos, de preferencia a la temperatura de la estufa de parafina, y se diferencia con alcohol de 95 grados, al que se le adicionará, si se quiere, un 10 por ciento de anilina.

La coloración vital de los nervios es la aplicación más importante del azul de metileno. Enumeraremos uno de los procedimientos más constantes como resultado.

Hay que hacer notar que no todos los animales son igualmente convenientes para esta clase de trabajos; hay que usar con preferencia conejos, cobayos o gatos.

Se prepara una solución al 1 por ciento de azul de metileno químicamente puro; se filtra inmediatamente antes del empleo, y se calienta hasta que la temperatura sea igual a la del cuerpo. Se adormece al animal con cloroformo. Se abre el tórax rápidamente sobre la línea media con una cizalla, y una vez abierto el pericardio, se abre el ventrículo izquierdo por sección de la punta del corazón.

La sangre que escurra se seca con un algodón mojado, y se limpia la cavidad torácica de todo coágulo. Se investiga la aorta y se coloca en su interior una cánula de dimensión apropiada, una de cuyas extremidades penetra en la aorta, y la otra está ligada a un tubo de caucho provisto de un robinete de vidrio o ebonita.

Este robinete dará paso a la solución de Ringer, que será la primera a inyectar, para evitar en lo posible la formación de coágulos en el interior de los vasos sanguíneos.

La solución está contenida dentro de un tubo que bien puede ser el de una bureta, y ésta a su vez está contenida dentro de un tubo hueco que permite ser llenado de agua caliente para tener la solución de Ringer a la temperatura ordinaria de 40 a 45 grados.

Una vez listo el dispositivo, se comenzará la inyección, para lo cual deberá tenerse cuidado de no inyectar burbujas de aire. Se hará uso de una presión muy moderada, de manera que la inyección se haga lentamente. Después de la inyección, por el exceso mismo de la presión, el líquido refluye en las venas, y el corazón derecho se llena poco a poco y se endurece; es en este momento que se abrirá el corazón derecho seccionando, de preferencia, la aurícula derecha. El líquido sigue saliendo por la aurícula derecha; se seca el exceso de líquido con algodón y se sigue inyectando hasta que el líquido que refluye por la aurícula sea casi incoloro. Este lavaje exige de 300 a 500 cc. de líquido, después del cual se podrá hacer pasar el líquido coloreado. La solución coloreada, lo mismo que la de Ringer, deben penetrar lo más despacio posible; se calcula que deben entrar alrededor de 1 a 2 cc. por minuto. Cuando el líquido coloreado sale por la aurícula, se ligará ésta, y quedará así cerrado el aparato circulatorio, encerrando en su interior la solución coloreada. ¿Qué cantidad de líquido se debe inyectar? Se calcula alrededor de 200 cc. para un conejo, inyectados en el espacio de 2 a 3 horas. Después de la inyección debe esperarse una media hora para dar lugar a que se enfríe la solución coloreada, y poder sacar los órganos centrales. Debemos recordar que durante todas las manipulaciones para la coloración, se deben usar guantes de goma para evitar se tiñan las manos por algún tiempo.

Después de haber abierto el cráneo y el canal vertebral, si la inyección ha dado buen resultado, el neuroeje es incoloro en el primer momento, pero azulea al rato por la acción del aire sobre el colorante, y entonces la substancia gris y la substancia blanca se diferenciarán perfectamente, coloreándose la primera en azul obscuro y la segunda en azul claro. Se dividirán, entonces, los órganos en pedazos de 4 a 5 mm. de espesor y serán llevados al líquido fijador.

Se emplea como fijador una solución al 10 por ciento de molibdato de amoníaco. Se pulveriza esta sal finamente en un mortero con agua caliente (10 gr. de sal en 100 cc. de agua) y luego se enfía lo mejor posible (de 3 a 5 grados); se sumergen las piezas en este líquido.

Allí las piezas azulean más, puesto que el ácido molíbdico forma con la base del azul de metileno una sal completamente insoluble en agua y apenas soluble en alcohol. La fijación dura 24 horas, al cabo de las cuales se llevarán los cortes al agua para efectuar un buen lavaje. La deshidratación debe ser rápida y hacerse a una temperatura baja. Se usarán cuatro alcoholes, de 50, 75, 95 y 100 grados, permaneciendo las piezas en cada uno de los tres primeros de 3 a 4 horas, y en el alcohol absoluto 12 horas, para pasar luego al xilol, donde pueden permanecer más tiempo.

Azul de metilo G. — Con este nombre se designa una substancia colorante que toma nacimiento cuando se trata el azul de metileno con un álcali. Producto que se disuelve fácilmente en el agua, a la que comunica un tinte azul. El azul de metileno nunca se emplea solo; se emplea siempre asociado a la eosina.

Violeta de cresil RB. — Es una oxiazina que se encuentra en el comercio bajo forma de un polvo azul violeta. Esta substancia se disuelve, sin cambiar de color, difícilmente en agua, pero más fácilmente en alcohol. La metacromasia que da este color es notable, tan delicada como no la produce ningún colorante. Se prepara una solución saturada que se diluirá en el momento del uso en 10 veces su volumen de agua destilada.

La coloración se obtiene en 15 minutos, pero pueden dejarse los cortes más tiempo sin que se sobrecoloreen. Para colorear piezas fijadas deben emplearse, exclusivamente, los cortes obtenidos por congelación. Como fijadores pueden usarse el formol, el sublimado, el ácido nítrico, etc.

Después de la coloración se lavan los cortes y se montan en levulosa. El protoplasma celular, los granos intersticiales de las fibras musculares, se tiñen en azul; la cromatina nuclear en rojo violeta; el tejido conjuntivo en rojo vivo; el mucus, la substancia fundamental del cartílago, los granos de mastzellen, en rojo; los segmentos medulares de los nervios en naranja; la hemoglobina de los hematíes en amarillo.

Safranina O. — Es un polvo rojo bastante poco soluble en agua, más en alcohol. Se prepara una solución concentrada en agua de anilina, en la que se colorearán los cortes, por lo menos durante media hora. Se diferencia con alcohol de 95 grados, al cual se agrega, si es necesario, un poco de ácido clorhídrico (algunas gotas de una solución al 1 por ciento de HCl en alcohol).

La safranina no tiene propiedades metacromáticas; colorea muy intensa-

mente el mucus, la substancia fundamental del cartílago y la substancia de los segmentos radiculares internos.

*Resorcina**fuscina*. — Bajo este nombre mencionaremos, a título suplementario, una substancia cuya constitución química es poco conocida. Para prepararla se toman 200 cc. de la solución de fuscina al 10 por ciento y 4 gramos de resorcina; se calienta algunos minutos, se deja enfriar y se filtra. Al precipitado se agrega 260 cc. de alcohol de 95 grados y se calienta hasta ebullición (al baño de María), y se filtra después de enfriado. Se agrega 4 cc. de HCl y una cantidad suficiente de alcohol a 95 grados hasta obtener 200 cc. de líquido.

En el espacio de 20 a 30 minutos esta substancia colorea las fibras elásticas en azul obscuro, el tejido conjuntivo en azul claro, la substancia fundamental del cartílago hialino en violeta rojizo. Se diferencia por un lavaje cuidadoso en alcohol a 95 grados.

COLORES ÁCIDOS

Las materias colorantes que se agrupan bajo el nombre de colores ácidos, están representadas, principalmente, por las sales alcalinas de los ácidos colorantes y, además, por un ácido colorante: el ácido pícrico. Son casi todos solubles en agua.

Mientras que las substancias colorantes básicas poseen una afinidad marcada por la cromatina nuclear, los colores ácidos se fijan de manera preferente sobre el protoplasma, la substancia acromática del núcleo y el tejido conjuntivo.

Así, por ejemplo, el ácido pícrico presenta una gran afinidad por el citoplasma, la fuscina ácida para el tejido conjuntivo. Los colores ácidos no se usan solos, sino combinados con los colores básicos, formando coloraciones de contraste. Sin embargo, se utilizan mezclas colorantes que se estudiarán después.

Acido pícrico. — Conocemos ya el trinitrofenol como líquido fijador, pero su papel como colorante es mucho más importante. El ácido pícrico es un excelente plasmático, y sirve, principalmente, para dar una doble coloración con el carmín y la hematoxilina.

Sin embargo, como disuelve los colores básicos, debe tenerse presente que, cuando se use el ácido pícrico, hay que sobrecolorear los núcleos, so pena de verlos luego completamente decolorados. Se usa una solución acuosa al 1 por ciento, que en algunos minutos colorea intensamente el citoplasma, el tejido conjuntivo, las fibras musculares y los glóbulos rojos.

Fuscina ácida. — Es la sal alcalina de la rosanilina sulfoconjugada, que toma nacimiento por la acción del ácido sulfúrico fumante sobre la fuscina. Es un polvo rojo oscuro, muy fácilmente soluble en agua, difícilmente soluble en alcohol. La solución acuosa se decolora instantáneamente por la adición de un álcali. La fuscina ácida desempeña un papel considerable en histología; se emplea en muchas mezclas importantes. Se puede utilizar en solución acuosa al 0,1 o al 1 por ciento, como colorante complementario de una tintura básica. La sobrecoloración es corregida por un simple lavaje con agua. La fuscina ácida sirve particularmente para poner en evidencia los bioplastos de Altmann.

Azul de Lyon. — Es un polvo azul oscuro, fácilmente soluble en agua, poco en alcohol. En solución acuosa al 1 por ciento colorear muy bien los preparados previamente tratados con carmín. Se colorea hasta que los cortes empiezan a azulear; luego se pasan al alcohol de 70 grados

El verde Luz. — Es un polvo verde oscuro, fácilmente soluble en agua y en alcohol. Se emplea lo mismo que el precedente.

El Orange G. — Es un cuerpo de ese grupo importante de colores que se designan bajo el nombre de azinas, que son muy empleados en tintorería. Son pequeñas laminillas cristalinas, anaranjadas, que se disuelven fácilmente en agua, más difícilmente en alcohol.

El orange G es uno de los mejores colorantes plasmáticos. Se emplea, sobre todo, en soluciones acuosas al 1 por ciento después de la coloración al hemalumbre. Después de haber actuado el colorante durante algunos minutos, se lavará con alcohol a 70 grados.

El Bordeaux R. — Es igualmente una azina. Polvo rojo oscuro, fácilmente soluble en agua. Se emplea en soluciones acuosas al 0,2 por ciento, actuando el colorante durante cinco minutos, antes, y no después de la coloración nuclear. Se lava después rápidamente con agua y se colorea con la hematoxilina de hierro.

La eosina. — Es la sal de sodio de un ácido colorante: la tetrabromofluorescina. Se encuentra en el comercio bajo forma de un polvo rojo, fácilmente soluble en agua. La eosina es muy empleada como colorante plasmático, sobre todo después de la hematoxilina. Se usará de preferencia la que se conoce con el nombre de eosina amarilla, de la que se hará una solución concentrada que se diluirá en 10 ó 20 veces su volumen de agua, para el uso corriente. La coloración dura tanto más cuanto la solución es más diluida. Después de la coloración se hará un abundante lavaje al alcohol de 70 grados. La eosina desempeña un papel importante en la coloración de la sangre y de los parásitos de la misma.

COLORES INDIFERENTES

Bajo el nombre de colores indiferentes se designa un pequeño grupo de materias colorantes, cuyas propiedades más interesantes para el histólogo se basan en sus condiciones de solubilidad.

Estos colores son insolubles en agua, difícilmente en los alcoholes, fácilmente solubles en las grasas. Químicamente son indiferentes, es decir, no poseen radicales que puedan dar nacimiento a sales.

El Sudán III y el Escarlata R. — Son azinas pertenecientes al grupo de los colores indiferentes. Son polvos rojos o rojo oscuros, difícilmente solubles en los alcoholes. Se prepara, de preferencia, una solución concentrada de cada una de las sustancias en alcohol de 70 grados. Los cortes efectuados en alcohol son puestos previamente en alcohol de 50 grados durante algunos minutos y luego llevados al colorante durante 15 a 30 minutos y luego al agua. La grasa se colorea intensamente en rojo, lo mismo que la mielina de los nervios periféricos y centrales. Se puede combinar esta coloración con una coloración nuclear como la que da el hemalumbre, o con una solución plasmática (ácido pícrico). Se colorea, por ejemplo, al hemalumbre, se lava al agua, se pone al alcohol de 50 grados y luego al Sudán; se lava de nuevo con agua, se colorea en la solución acuosa del ácido pícrico, y se lava otra vez con agua. Para el tratamiento ulterior deben evitarse, naturalmente, los alcoholes fuertes y los disolventes de las grasas.

MEZCLAS COLORANTES

Como ya lo hemos visto, se pueden obtener coloraciones múltiples tratando las preparaciones sucesivamente por diferentes sustancias colorantes, o bien por una mezcla de soluciones. Para preparar las mezclas se puede proceder de tres maneras: unir colorantes básicos, o bien colores ácidos, o mezclar colores básicos con colores ácidos. Los dos primeros métodos son fácilmente realizables; pueden componerse mezclas homogéneas de diferentes sustancias básicas o de sustancias ácidas. Otras son, sin embargo, las condiciones del tercer caso: el de las mezclas heterogéneas.

Cuando se quiere mezclar una solución acuosa de un color básico con una solución acuosa de un color ácido, se produce una transformación que tiene por objeto la formación de un nuevo colorante neutro. Ahora bien, como estas sustancias colorantes neutras son casi siempre insolubles en agua, éllas precipitan, y para disolver este precipitado es necesario emplear

disolventes, tales como el alcohol etílico, el metílico, la acetona, el metilal, etc. Entre las numerosas mezclas de colorantes, sólo nos interesan las de colorantes ácidos, las cuales son frecuentemente empleadas, ya para la coloración nuclear, ya para la de contraste.

La fuscina pírica o licor de Van Gieson. — Es una mezcla de ácido pírico y de fuscina ácida, compuesta por 45 cc. de solución acuosa concentrada de ácido pírico y 5 cc. de solución al 2 por ciento de fuscina ácida. Se emplea esta mezcla después de la coloración nuclear al hemalumbre o a la hematoxilina férrica. Se deja actuar el colorante 10 minutos, y se extrae el exceso de materia colorante con alcohol de 70 grados. El tejido conjuntivo se tiñe en rojo vivo, el citoplasma y la substancia muscular en amarillo.

El picroindigocarmín. — Es una solución de un gramo de carmín de índigo en 300 cc. de solución concentrada de ácido pírico. Esta mezcla se recomienda, sobre todo, después de una coloración al carmalumbre, para carmín o safranina. En 5 ó 10 minutos colorea el tejido conjuntivo en azul vivo, y el protoplasma y las fibras musculares en verde. Después de la coloración debe lavarse con alcohol de 70 grados.

Picrocarmín. — Se hace disolver magnesia calcinada en agua durante, por lo menos, ocho días; se agita a menudo y se trata de que haya siempre un exceso de magnesia. Luego se hará hervir durante media hora 100 cc. de esta solución con 0,2 gramos de carmín pulverizado en un balón cerrado sólo por un tapón de algodón. Después de enfriado se filtra y se le agrega un poco de formol.

Por otra parte, se calienta 100 cc. de una solución acuosa al 0,5 por ciento de ácido pírico con 15 gramos de carbonato de magnesia hasta ebullición y se filtra después de enfriado. Una vez terminada la confección de estas dos soluciones, se mezclan y se obtendrá una solución que colorea en 5 a 10 minutos los núcleos en rojo y el resto en amarillo.

Solución de azur-eosina. — La solución de Giemsa, que es la mejor mezcla de azur-eosina, contiene 3 gramos de eosina y 0,1 gramos de azur-metilo, disueltos en 250 gramos de glicerina y 250 gramos de alcohol metílico. Para colorear se diluye una gota de la solución en una de agua. El colorante de Giemsa es de los más empleados para la coloración de las preparaciones de sangre.

Solución de Biondi. — Bajo este nombre se conoce una mezcla colorante compuesta de un color básico, el verde de metilo, y de dos colores ácidos, la fuscina ácida y el orange G. Para la preparación de este colorante conviene seguir exactamente las prescripciones que vamos a enunciar.

Los productos empleados deben provenir de la AKTIENGESSELCHAFT FÜR ANI-

LINEX FABRICATION, de Berlín, y las marcas METILGRUM NMP y SAUREFUCHSIN SMP, ORANGE GMO.

Se pesarán 3,4 gramos del primero, 4,2 del segundo y 3 del tercero, y se colocarán las tres sustancias en un pequeño mortero de porcelana, donde se reducirán a una fina mezcla que se disolverá en 100 gramos de agua destilada. Se pondrá todo esto en un frasco de Erlenmeyer, que será llevado a la estufa de parafina durante tres o cuatro días, agitándolo frecuentemente. Cuando la disolución sea completa se tendrá un líquido pardo-oscuro, con un ligero tinte rojo. Esta solución concentrada es conservable durante largo tiempo, sólo que en el momento de su uso debe ser acidificada y diluida.

La acidificación puede hacerse de la manera siguiente, que aunque algo empírica es muy práctica. En una probeta graduada se pone 1 cc. de ácido acético, que se diluye en 100 cc. de agua. Se mezcla cuidadosamente y se vuelca el contenido; los restos de ácido que quedan sobre las paredes de la probeta son suficientes para la acidificación. En una segunda probeta más pequeña se miden 5 cc. de la solución madre, que serán llevados a la primera probeta. Se lava cuidadosamente la pequeña probeta y se lleva el todo a la grande. Se completa el todo hasta 50 cc. y se obtiene la coloración lista para actuar, que se mantendrá en buen estado hasta 24 horas después de la preparación.

Para la coloración de los cortes, debe hacerse una diferenciación entre los cortes hechos por congelación y los hechos por el método de la parafina.

Para la coloración de los cortes por congelación, todos los fijadores dan buenos resultados, por ejemplo: el formol; las diferentes mezclas de sublimado; el ácido nítrico; lo mismo el licor de Flemming, siempre que los cortes no hayan permanecido demasiado tiempo en los fijadores. Para los cortes en parafina se emplea el material fijado con sublimado o con líquidos al sublimado. Los cortes a la celoidina no son utilizables sino cuando se ha disuelto la celoidina. La duración de la coloración tiene habitualmente poca influencia sobre el resultado. Diez minutos constituyen un tiempo suficiente, pero pueden dejarse también 24 horas.

Después de la coloración, se lavan los cortes al ácido acético al 0,5 por ciento y se los lleva al alcohol de 70 grados, donde se desprenden nubes de colorantes. No debe dejarse demasiado tiempo en el alcohol, y cuando tomen un tinte rojo, hay que llevarlos al xilol pasando por el alcohol absoluto.

El resultado de esta coloración es excelente. La cromatina nuclear, la sustancia fundamental del cartílago y el mucus se colorean en azul verde; los núcleos, el carioplasma, el tejido elástico, el tejido fundamental de los

huesos y la dentina en rojo; sólo la hemoglobina de los hematíes se colorea en naranja.

Este método de coloración no es aventajado por otro en lo que se refiere a la facilidad de su ejecución y a los resultados diferenciales que se obtienen. Desgraciadamente, el líquido de Biondi une a sus múltiples ventajas, el grave inconveniente de dar preparaciones que son difícilmente conservables durante largo tiempo.

APÉNDICE A LOS MÉTODOS DE COLORACIÓN

Los métodos de impregnación metálica consisten esencialmente en la imbibición de los objetos enteros o cortados, en una solución de una sal metálica susceptible de sufrir una reducción en cierta clase de tejidos, que son así puestos en evidencia por el metal precipitado. En este método de coloración, el metal puede precipitar bajo forma de granulaciones finas, o bien, simplemente, dar al objeto una cierta coloración sin que se pueda observar la precipitación.

Entre los metales empleados en estos métodos, sólo se utilizan los metales preciosos, y entre éstos, la plata y el oro. Se pueden emplear las soluciones de las sales metálicas sobre objetos frescos, sobre objetos fijados, y sobre cortes de objetos fijados. Cada una de estas tres maneras de colorear da buenos resultados si es aplicada en determinadas condiciones.

La fase más importante del proceso de impregnación es la reducción; puede resultar de la naturaleza particular de los tejidos: es, entonces, espontánea. A menudo se activa este procedimiento por medios, tales como la exposición a la luz difusa, a la insolación directa. La luz acelera y hace más intensos los fenómenos de reducción.

Impregnación con las sales de plata. — Entre las sales de plata es el nitrato de plata o piedra infernal el que desempeña un papel más importante. Se encuentra en el comercio bajo forma de lápices. Se disuelve en agua en una cantidad de 200 por ciento, dando nacimiento a un líquido muy cáustico y de reacción neutra. Se puede tener una solución al 20 por ciento, que será conservada en frascos herméticamente cerrados por medio de tapones de vidrio, y absolutamente limpios, pues la menor impureza dará por resultado la precipitación de la sal. Para impregnar los objetos delgados o membranosos, se usa una solución de 0,5 a 1 por ciento, obtenida mezclando 0,5 a 1 cc. de la solución madre con 20 cc. de agua destilada. Se extrae, por ejemplo, una membrana de un animal y se extiende en el fondo de un plato playo, en cuyo fondo se ha depositado una capa de parafina solidificada, a la que se fijará la membrana por medio de alfileres, y

se lava la preparación con agua destilada. Se echa sobre la pieza, según su tamaño, 10 a 20 cc. de la solución de nitrato y se hace que toda la membrana se embeba en la solución. El objeto se va haciendo cada vez más opaco, y después de unos diez minutos se extrae el exceso de reactivo y se lava al agua, exponiendo después el recipiente a la luz, después de haberse agregado un poco de agua acidulada con ácido acético (1 0/0 de ácido acético). La reducción se opera muy rápidamente, y puede apreciarse a simple vista el ennegrecimiento progresivo del objeto. Este método es el clásico para poner en evidencia los cementos intercelulares. Se usan también, a veces, las inyecciones de nitrato de plata en ciertas cavidades como la luz de los vasos y los pulmones.

El método del cromato de plata. — Es habitualmente designado con el nombre de método de Golgi, en honor a su inventor.

Consiste esencialmente en tratar los objetos con una sal de cromo y una solución de nitrato de plata, empleada sucesivamente. La acción del bicromato sobre los tejidos da nacimiento a albúminas cromadas, de cuya constitución depende mucho la duración de la imbibición. Si se lleva después la preparación a una solución de nitrato de plata, se produce sobre ciertos elementos una combinación, una albúmina cromo-argéntica, que parece negra a la luz transmitida. Los elementos coloreados en negro resaltan entonces con una extraordinaria nitidez sobre un fondo amarillo.

Este método no impregna todos los elementos, sino algunos de ellos, con exclusión total de los demás.

Entre las numerosas variantes de este método, hay uno que es el procedimiento rápido y que da a menudo los mejores resultados. Los objetos frescos son cortados en pequeños fragmentos y puestos en una mezcla de ocho partes de solución de bicromato al 2,5 por ciento y dos partes de solución de ácido ósmico al 1 por ciento, durante dos a cinco días. Después de esta permanencia, se sacan las piezas y se extrae el exceso de líquido por medio de un papel de filtro. Se pasan a una solución al 0,75 por ciento de nitrato de plata, solución que deberá cambiarse al cabo de algunos minutos. Al día siguiente se puede practicar los cortes. Agregaremos, sin embargo, las siguientes observaciones. Casi todos los órganos pueden ser tratados por el método de Golgi, y en cada órgano pueden encontrarse impregnados los siguientes elementos: fibras conjuntivas, elásticas y musculares, conductos secretores, células de sostén, etc.

Pero son las células nerviosas y sus prolongamientos, las fibras periféricas y centrales, que se colorean con la mayor intensidad. Gracias a esta particularidad notable, el método de Golgi es empleado principalmente para las investigaciones del sistema nervioso central y periférico.

El material de estudio debe ser tan fresco como sea posible, a pesar de que en rigor esto es un poco exagerado. Según nuestra experiencia, se obtiene muy buenos resultados con piezas recogidas hasta seis, y doce horas después de la muerte. Un punto muy importante para el estudio del neuroeje es la edad de los individuos. Para la especie humana se usarán piezas de niños en las primeras semanas de edad, y para los animales, ratas, perros y gatos, de dos a diez días. El neuroeje de los terneros es un excelente material para estudio, cuando proviene de animales muy jóvenes. Se sacarán piezas pequeñas, de 2 a 3 milímetros de espesor y de 5 a 10 de superficie. Se tomarán de cada pieza numerosos fragmentos, y se pondrán de tres a cuatro en un frasco con 50 cc. de líquido fijador. La duración de la fijación es algo muy importante. Es imposible dar reglas para cada órgano, pero se basará en ensayos anteriores. A los tres días los fragmentos son secados con papel de filtro y pasados a la solución de sal argéntica. Se produce en seguida un precipitado rojo de cromato de plata. Después de algunos minutos se reemplaza el líquido por otro nuevo, que debe permanecer claro. Al día siguiente se pueden hacer los cortes.

Método de la plata amoniacal. — Este método conviene, sobre todo, para piezas fijadas con formol y congeladas. Las piezas lavadas durante veinticuatro horas son impregnadas durante seis a ocho días en una solución de nitrato de plata al 2 por ciento, lavadas rápidamente al agua, y llevadas a la solución siguiente de plata amoniacal, que será siempre preparada en el momento del uso.

A 20 cc. de solución de nitrato de plata al 2 por ciento colocada en un gran cristizador, se agrega, agitando, 3 gotas de lejía de soda al 40 por ciento. Se produce un precipitado de óxido de plata. Se agrega, entonces, gota a gota, amoníaco, hasta que el precipitado se disuelva y que la solución se haya hecho clara. En este líquido el enrojecimiento se acentúa muy notablemente. Al día siguiente se lavan de nuevo las piezas con agua, y se opera la reducción en formol al 20 por ciento.

Este método da resultados comparables al precedente, pero la impregnación intensiva del tejido conjuntivo constituye una circunstancia desfavorable.

Impregnación a las sales de oro. — La sal de oro empleada habitualmente en microtécnica es el cloruro. Se encuentra en el comercio bajo forma de pequeñas masas amorfas, rojooscureas, o de agujas cristalinas de color amarillo.

La primera forma corresponde a la fórmula $\text{AuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; la segunda es una doble combinación de cloruro y ácido clorhídrico $\text{AuCl} \cdot \text{HCl}$. Estas sales son muy higroscópicas, y por esta razón se expenden en el comercio

en tubos cerrados a la lámpara. Se hace de cualesquiera de éstas una solución madre al 2 por ciento, que se conserva en frascos bien cerrados, de vidrio blanco, y en los cuales no se sumergirá ningún objeto metálico para evitar la precipitación del oro al estado metálico.

Se introducirán sólo varillas de vidrio o madera. De los muchos métodos de impregnación al oro, sólo nos limitaremos a enunciar los siguientes :

Cloruro de oro-jugo de limón. — Este método se recomienda, sobre todo, para el examen de objetos u órganos delgados y ricos en tejido conjuntivo. Se colocan las pequeñas piezas de cinco a diez minutos, según el espesor, en jugo de limón fresco que contiene, además de los citratos ácidos, una cantidad de ácido cítrico libre. En este líquido los objetos se hinchan considerablemente, se lavan rápidamente y se llevan a la solución de cloruro de oro al 1 por ciento, durante media a una hora. Después de un nuevo lavaje se efectúa la reducción con ácido acético al 1 por ciento, de preferencia a plena luz y en un cristizador colocado sobre un fondo blanco. Al salir de la solución de oro las piezas tienen un color amarillo claro o amarillo obscuro, y siguen coloreándose más o menos intensamente a la luz, con un color pardo, luego rojo, y por fin violeta. Este último tono puede llegar a ser tan acentuado que las piezas parezcan negras. Son los cilindros de los nervios los que reducen más fuertemente las soluciones de oro, y en las buenas preparaciones se destacan con un color negro sobre un fondo gris claro.

Si se quiere reducir a cortes los objetos impregnados al oro, se fijan con formol al 5 por ciento y se cortan con un micrótopo de congelación. Las preparaciones habitualmente se conservan bien.

Cloruro de oro-ácido fórmico. — Se emplea, sobre todo, este método, para poner en evidencia los nervios de los músculos. Se extienden músculos delgados sobre una placa de cera y se lavan durante 15 a 20 minutos con una solución de ácido fórmico al 30 por ciento. En seguida se llevan durante media a una hora a una solución de cloruro de oro al 1 por ciento, y se opera la reducción en la obscuridad con el ácido mencionado. Al día siguiente la solución está casi terminada. Se ponen luego los objetos en una solución de partes iguales de glicerina y ácido fórmico, y al día siguiente se pasan a la glicerina pura para conservarlos.

Cloruro de oro-solución iodoiodurada. — Para terminar, he aquí un método aplicable no a los objetos frescos como los anteriores, sino a las piezas fijadas y reducidas a cortes. La impregnación al oro de cortes efectuados por el método de congelación o a la parafina, choca con grandes dificultades cuando no se hace con cortes adecuados para recibir las sales de

oro. Utilizaremos cortes por congelación de objetos bien fijados, que llevaremos primeramente durante 30 minutos a una solución iodoiodurada, obtenida diluyendo la solución del laboratorio con partes iguales de agua.

Los cortes se colorean fuertemente en rojo pardo; se lavan, entonces, rápidamente, y se llevan durante 30 minutos al cloruro de oro al 0,2 por ciento, donde se decolorarán primero, para teñirse en amarillo después. Después de un lavaje cuidadoso, los cortes son puestos para diferenciación, en una solución de resorcina al 2 por ciento. La reducción es completa al cabo de una a dos horas, aunque puede ser interrumpida cuando se desee. Se lava con agua, y se hace actuar una solución de hiposulfito de sodio al 5 por ciento, que disuelve en 15 a 20 minutos todo el oro no reducido que se encuentra en los cortes.

En fin, los cortes son lavados muy cuidadosamente al agua.

Este método da excelentes resultados para muchos elementos, en particular pone en evidencia las fibras conjuntivas, y a menudo, también la neuroglia.

COLORACIONES DE SANGRE

Primera coloración. Coloración de Giemsa

1° *Fijación.* — Se fija el frotis con alcohol absoluto, alcohol metílico o con el líquido de Hoffmann durante 5 a 15 minutos;

2° *Coloración.* — Se colorea con solución de Giemsa (una gota por cada cc. de agua destilada) durante 10 a 20 minutos. Se lava el preparado con agua destilada hasta ligera coloración rosada, se seca rápidamente, y se observa con objetivo de inmersión. Se elimina el aceite de la inmersión con una gota de xilol y se conserva en seco, sin montar en bálsamo de Canadá.

Segunda coloración. Coloración de Leischmann

1° *Fijación.* Se fija el frotis con la misma solución colorante de Leischmann al 10 por ciento, se tapa lo mejor posible con una cápsula de vidrio y se deja de 20 a 30 segundos;

2° *Coloración.* — Se descubre el portaobjeto, y se echa sobre el mismo el doble número de gotas de agua destilada (v. gr.: si 4 gotas de solución, 8 de agua destilada), se mezcla y se deja por 4 a 10 minutos, al cabo de los cuales se diferenciará;

3° *Diferenciación.* — Se lava con agua destilada hasta ligero tinte rosado, se seca rápidamente y se observa con inmersión.

La gota de aceite de inmersión puede eliminarse con algunas gotas de xilol.

Los preparados de sangre coloreados con este método deben ser conservados en seco y nunca ser montados en bálsamo de Canadá, pues esta última sustancia decolora los preparados.

Tercera coloración. Coloración panóptica de Pappenheim

(Método de May-Grünwald-Giemsa)

1º *Fijación.* — Se echan sobre el frotis 10 gotas del colorante de May-Grünwald, se cubre con una cápsula de vidrio bien seca y se deja actuar durante 3 minutos;

2º *Coloración.*

Primer tiempo. — Se destapa el frotis y se agregan 10 gotas de agua destilada; se cubre de nuevo y se deja actuar de 2 a 4 minutos.

Segundo tiempo. — Se vuelca el colorante precedente, y sin lavar se le agrega un poco de solución de Giemsa (una gota en 1 cc. de agua destilada) y se deja actuar de 10 a 30 minutos.

Tercer tiempo. Lavaje. — Se lava rápidamente con agua destilada, se seca y se examina como los anteriores. Se conservan sin montar.

Apéndice. — En todas estas coloraciones es indispensable usar agua destilada, para evitar la precipitación de los colorantes, lo que haría fracasar la coloración. Las coloraciones de sangre deben ser hechas con mucho cuidado a causa de la dificultad con que se obtienen buenos resultados cuando no se tiene una buena práctica en el uso de estas coloraciones, que son las más delicadas que se conocen, puesto que no sólo tiñen los elementos sanguíneos y sus parásitos, sino que la coloración es electiva y diferencial para cada uno de ellos y de sus granulaciones.

CORTES INCLUIDOS A LA PARAFINA

Coloración a la hematoxilina y eosina

Desparafinado e hidratación. — 1º Se inunda el portaobjeto con xilol, durante 1 minuto más o menos;

2º Nuevo baño con xilol durante 2 minutos;

3º Baño de alcohol absoluto durante 2 ó 3 minutos;

4º Baño de alcohol de 95 grados durante 2 ó 3 minutos;

5º Baño de alcohol de 70 grados durante 2 ó 3 minutos;

6° Se lava el corte con agua destilada durante algunos minutos ;

Coloración. — 7° Se elimina el exceso de agua y se cubre con algunas gotas de solución de hematoxilina (hematoxilina de Mayer de 3 a 5 minutos) ;

8° Se extrae el exceso de colorante y se lava con agua, o se cubre con algunas gotas hasta que el corte tome un color azul violeta ;

9° Se saca el exceso de agua y se lava el corte para arrastrar el exceso de colorante, y se cubre con algunas gotas de la solución de eosina ;

10° Se deja actuar la eosina durante 3 a 5 minutos y se lava ;

11° Nuevo lavado con agua para arrastrar el exceso de eosina ;

Deshidratación y montaje. — 12° Baño de alcohol a 70 grados de 2 a 4 minutos ;

13° Baño de alcohol a 95 grados de 2 a 4 minutos ;

14° Primer baño de alcohol absoluto de 2 a 4 minutos ;

15° Segundo baño de alcohol absoluto de 2 a 4 minutos ;

16° Primer baño de xilol de 2 a 4 minutos ;

17° Segundo baño de xilol de 2 a 4 minutos ;

18° Se vuelca el xilol y se trata de absorber el exceso con un papel de filtro cuidando de no tocar la preparación ;

19° Se coloca una gota de balsamo de Canadá y se cubre con una lamina, tratando de que no se produzcan burbujas de aire. Se dejarán secar durante 2 ó 3 días en un lugar seco, y una vez endurecido el bálsamo, se guardan en una caja después de haberlos rotulado.

MÉTODOS DE INYECCIÓN

Como apéndice a la técnica microscópica general, describiremos brevemente la técnica de las inyecciones, que los histólogos han obtenido de los anatomistas.

Se llama inyección, la repleción de ciertas cavidades del organismo por medio de una masa artificial llevada por medio de instrumentos apropiados.

Las cavidades inyectadas pueden ser de diversa naturaleza, por ejemplo : los canales de Havers, el tejido óseo, las cavidades articulares, el sistema excretor de las glándulas. Pero en general, el término de inyección se aplica a los aparatos sanguíneo y linfático.

Las masas de inyección pueden ser constituídas por diferentes sustancias, que en el momento del uso deben ser líquidas. La mayor parte de las veces se usan masas coloreadas, cuyos tonos son fácilmente diferenciables.

La clasificación de las masas coloreadas pueden hacerse bajo diferentes

puntos de vista. Se pueden distinguir las masas incoloras y las masas coloreadas, y entre estas últimas las masas opacas y las transparentes. Una masa de inyección coloreada debe encerrar una materia colorante no susceptible de difundirse, puesto que de otra manera el color atraviesa la pared de los vasos y se difunde en el interior de los tejidos, haciendo la preparación inutilizable. Las materias colorantes solubles dan coloraciones mucho más perfectas cuando no son difusibles, por ejemplo, el azul de Berlín y el carmín.

La solución acuosa concentrada de azul de Berlín, filtrada antes del empleo, da la mejor masa acuosa para inyecciones de los conductos glandulares.

Para la inyección de los vasos sanguíneos se emplean las masas solidificables, es decir, masas líquidas en caliente y sólidas en frío. Con este fin se agrega una cantidad suficiente de gelatina a la materia colorante. Estas masas a la gelatina, se solidifican completamente y permiten la confección ulterior de preparaciones microscópicas.

Masa azul a la gelatina. — Se ablandan 50 gramos de gelatina poniéndola durante algunas horas en agua destilada; se le escurre convenientemente y se calienta al baño de María, en un cristalizador de 1000 cc. de capacidad hasta que esté completamente solidificada. Se echan en seguida en el cristalizador 500 cc. de la solución concentrada de azul de Berlín, llevado a la temperatura de la gelatina. Se agita convenientemente hasta que el color esté bien incorporado y la masa sea homogénea. Se filtra entonces con una franela y en caliente.

Masa roja a la gelatina. — Se ablandan 50 gramos de gelatina por la permanencia de algunas horas en agua destilada; la masa bien escurrida se colorea durante dos o tres días en una solución de 15 gramos de carmín en una solución de bórax al 10 por ciento. Después de la coloración se saca el exceso de colorante por una corriente de agua, y se ponen las placas de gelatina fuertemente hinchadas y coloreadas en rojo, en un gran recipiente que contiene varios litros de solución de ácido clorhídrico al 2 por ciento. Se agitan las masas de gelatina hasta que viren al rojo oscuro y al rojo cereza, luego son bien lavadas y se dejan escurrir y secar, para después ser fundidas al baño de María. Para la conservación, se agrega a la masa un pedazo de alcanfor del tamaño de una nuez.

Como instrumento de inyección se emplea, en la mayoría de los casos, una jeringa metálica de 100 a 200 cc. de capacidad, cuyo cilindro o pistón está recubierto de cuero o de caucho. A la extremidad cónica de la jeringa se adapta una pieza intermediaria, provista de un robinete que se fija a la cánula metálica. Estas cánulas metálicas son poco prácticas. Se usan general-

mente de vidrio, que pueden prepararse en el laboratorio con cualquier tubo.

Se toma un tubo de vidrio de un calibre suficiente y se calienta en una de sus extremidades, dándole vuelta sobre un eje, a la llama de un pico de gas. Cuando el vidrio se ha ablandado, se estira tanto más cuanto más delgada deba ser la cánula.

Se reúne la cánula a la pieza intermediaria, mediante un tubo de caucho. Para la inyección de un líquido frío, puede servirse del aparato que usamos para las coloraciones vitales. En este caso hay que hacer variar la presión más o menos, subiendo o bajando el recipiente. Debemos hacer notar a propósito de inyecciones, que éstas serán tanto mejor cuanto más limitadas. Las inyecciones de órganos resultan a menudo buenas; pero si se quiere inyectar un organismo entero, entonces las dificultades son mayores, y es sumamente difícil obtener un resultado regular.

Si se desea inyectar una masa a la gelatina, el objeto debe ser llevado a una temperatura superior al punto de fusión de la gelatina. Las piezas cadavéricas frías son calentadas en agua caliente a 40 ó 45 grados, durante un tiempo más o menos largo, según su talla. Sobre un animal todavía caliente, al contrario, se debe practicar la inyección inmediatamente.

Para esto, después de haber librado un vaso, se rodea de un hilo de seda en hansa. Se secciona esta hansa y se obtienen así dos, de las cuales una servirá al operador para cerrar el vaso y la otra será tomada con una pinza para usarla a su debido tiempo. El operador hiende entonces la pared vascular en una extensión de unos 5 milímetros, luego introduce en esa hendidura la cánula previamente llenada de la solución fisiológica, o bien de una solución al 8 por ciento de sal de Glauber (SO_4Na_2) exenta de burbujas de aire.

La cánula es reunida a la pieza intermediaria, cuyo robinete está cerrado. En este momento, el operador aprieta fuertemente el segundo hilo del hansa sobre el botón de la cánula. Se puede entonces inyectar directamente, por medio de la jeringa, la masa llevada a una temperatura de 40 grados, pero se puede también, para arrastrar la sangre y los pequeños coágulos, inyectar primero una solución caliente al 8 por ciento de sal de Glauber, y en seguida, la masa a la gelatina. De esta manera se obtiene un mejor calentamiento de los tejidos y una inyección más completa, pero se usa una cantidad mayor de masa.

Cuando el líquido de inyección refluye por los vasos referentes, se cierran las arterias por medio de una pinza y se sigue inyectando, aumentando progresivamente la presión hasta que el sistema vascular esté convenientemente tenso por la masa. La duración y la presión con la cual se debe efectuar la inyección, es cuestión de práctica.

El tratamiento ulterior de las piezas inyectadas no difiere del de las piezas ordinarias. Una vez terminada la inyección, las piezas son enfriadas lo más rápidamente posible para solidificar la masa colorante. Luego se cortan en fragmentos de un tamaño conveniente, que se fijarán de una manera apropiada. El formol es un buen fijador para las piezas inyectadas.

Montaje y terminación de las preparaciones microscópicas. — Después de haber coloreado una preparación por uno u otro de los métodos que se han indicado, se trata de conservarlas de manera que experimenten las menores alteraciones posibles y duren mucho tiempo.

En algunos casos este *desideratum* se obtiene con facilidad, pues hay coloraciones que de por sí dan preparaciones inalterables; aparte de la doble coloración a la hematoxilina-eosina, la mayor parte de las coloraciones palidecen con el tiempo, sobre todo las que están hechas con colorantes artificiales.

Sin embargo, la decoloración depende de las condiciones en que se ha hecho el montaje y la conservación. Los cuerpos empleados para el montaje deben ser purísimos, y no tener ni siquiera rastros de ácidos, que son los que disminuyen la duración de las coloraciones.

Muchos colorantes resisten mal la acción de la luz, y por eso es necesario conservar las piezas en la obscuridad.

Las sustancias empleadas para el montaje de las preparaciones microscópicas, los *medios de conservación*, son líquidos o sólidos. En este último caso hay que disolverlos, naturalmente, en un disolvente apropiado. Por la evaporación espontánea o artificial de este disolvente, el objeto recubierto por la laminilla se encuentra cubierto por una delgada y sólida capa que realiza, al mismo tiempo, la unión del portaobjeto con el cubreobjeto.

En los casos de los medios líquidos, debe evitarse, por el contrario, la evaporación y desecación de las preparaciones, fijando sólidamente el portaobjeto al cubre, por medio de una sustancia especial. Se obtiene una buena sustancia fundiendo en una cápsula de porcelana 10 gramos de cera, a la cual se mezcla, agitando, 35 gramos de colofonia. Para hacer esta más manuable todavía, se le puede agregar todavía un poco de esencia de trementina. En el momento del uso, se calienta la espátula y se la mete en la masa sólida; se adherirá a la espátula una cantidad de sustancia suficiente como para cerrar la preparación. Se vuelve a calentar la espátula y se la pasea alrededor de la preparación. El cemento se solidifica casi instantáneamente; pero es necesario que los bordes de la preparación estén bien limpios y secos, pues de otra manera el cemento no adhiere.

La inclusión por medio de un líquido sólido es mucho más simple. Se toma una pequeña gota de la sustancia a emplear, y se la deposita sobre

la preparación, y sobre ésta se colocará el cubre con todo cuidado para evitar la penetración de burbujas de aire.

Se puede colocar encima una pequeña pesa para favorecer la extensión de la substancia, y se conservará al abrigo de la luz y del polvo hasta su desecación, que se hará rápidamente.

Las preparaciones serán recubiertas con cubres cuyo tamaño sea sensiblemente mayor que el de la preparación, y cuyo espesor sea de 0,15 a 0,12 milímetros. Si son más delgados son muy difíciles de limpiar, y si son más gruesos no permiten el uso de los fuertes objetivos de inmersión; se les conserva de preferencia en un cristizador cerrado, lleno de alcohol de 70 grados. En el momento del uso se extraen por medio de una pinza y se secan con un trapo fino.

Entre los numerosos medios que han sido propuestos, tres solamente nos interesan especialmente: la glicerina, el bálsamo de Canadá y la levulosa.

La glicerina. — Es un líquido espeso, incoloro, que se mezcla en todas proporciones con el agua y el alcohol, y constituye un buen medio de disolución para ciertos cuerpos orgánicos e inorgánicos. Su índice de refracción es de 1,45. Se emplea mucho como medio de conservación, pero la mayor parte de las materias colorantes sumergidas en esta substancia palidecen muy rápidamente. La glicerina pura deshidrata las preparaciones y las retrae, causa por la cual nunca se usa sola, sino mezclada con agua.

El bálsamo del Canadá. — Es la resina de diferentes pinos de la América del Norte. Posee una reacción débilmente ácida y se disuelve en éter, xilol, benzol y cloroformo. Su índice de refracción es de 1,53. Cuando el bálsamo ha sido neutralizado con un tratamiento de carbonato de potasio, constituye el mejor medio conocido para conservar las preparaciones coloreadas. Se disuelve de preferencia en el xilol químicamente puro; la solución debe tener una consistencia tal, que no se escurra fácilmente. Se conserva en frascos cerrados. Las preparaciones que sean montadas en bálsamo, deben ser previamente deshidratadas con alcohol absoluto y luego llevadas al xilol. Se deposita el corte sobre el porta y una vez secado se le coloca encima una gota de bálsamo y en seguida el cubre.

Los cortes a la celoidina no deben ser deshidratados en alcohol absoluto porque la celoidina se reblandece demasiado en los alcoholes fuertes. Se les lleva solamente al alcohol de 95 grados y se termina la deshidratación con el carbolxilol, solución de una parte de ácido fénico licuado en caliente, en tres partes de xilol; cuando el carbolxilol ha hecho a los cortes completamente transparentes, se llevarán al xilol y luego al bálsamo.

Después de algunos días, el bálsamo se seca, y entonces el cubre quedará adherido sólidamente al portaobjeto. Una vez montadas las preparaciones,

deben ponerse a secar en un lugar donde no haya polvo, pues éste se pega con facilidad a las preparaciones. Es de buena técnica, una vez montadas, ponerlas a secar en la estufa, donde al mismo tiempo que se secan más rápidamente, se resguardan del polvo.

La levulosa. — Es un azúcar de frutas cuya forma comercial más pura es la de cristales de un color amarillo claro que se disuelven en agua y en alcohol con extrema facilidad, dando un líquido siruposo de un color amarillento. Posee un índice de refracción de 1,50. No se usa sino la levulosa cristalizada, de la que se toman 20 gramos, que se disuelven en un frasco de bálsamo, con 15 cc. de agua. Se pone el todo a la estufa durante una noche. Para usarlo se seca el porta objeto y los alrededores de la preparación, pero además hay que extraer el exceso de agua con un papel de filtro. Se echa entonces una pequeña gota de la solución de levulosa sobre el objeto, y se espera 1 ó 2 minutos antes de recubrirlo; luego se pone la laminilla y se pone a la estufa durante algunos minutos para que el cubre tome una posición estable.

Se rodea la preparación con el betún.

La levulosa es un excelente método de montaje que posee sobre el bálsamo la gran ventaja de no necesitar pasar los cortes por el alcohol antes de usarlo.

Conserva la mayor parte de los colores mejor que la glicerina, pero bajo este punto de vista es inferior al bálsamo de Canadá.