

## CAPÍTULO VIII

### CONTINUACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Reactivos colorantes selectivos.—Reactivos impregnadores.—Reactivos inofensivos y conservadores.**

**Reactivos colorantes.** — Son aquellos que, fijándose con matices más ó menos intensos, en determinadas partes de los tejidos, permiten distinguir detalles estructurales invisibles ó apenas apreciables con el uso exclusivo del microscopio.

Los reactivos colorantes deben clasificarse en dos grupos : 1.º, agentes que tiñen selectivamente sin experimentar descomposición apreciable ; 2.º, agentes electivos que coloran descomponiéndose. Estos últimos designanse también *reactivos impregnadores*.

**Reactivos colorantes selectivos.**—Son numerosísimos, pero los principalmente usados son : el carmín y picrocarminato, la hematoxilina y los colores de anilina.

**Carmin.** — Introducido en la técnica por Gerlach, es hoy uno de los reactivos de más boga. El carmín es insoluble en agua, en alcohol, éter, glicerina, etc., pero se disuelve en el amoníaco, en los carbonatos alcalinos, en el ácido hidroclicórico, en las soluciones concentradas de alumbre, etc.

La especialidad del carmín consiste en teñir el núcleo de las células, y con menor energía los fascículos del tejido conectivo y cilindros ejes de los tubos nerviosos.

Antiguamente, se utilizaban mucho las soluciones amoniaca-les ; pero hoy se sabe que el carmín alcalino ataca más ó menos la cromatina nuclear, imposibilitando el estudio de las figuras mitóticas ó kariokinéticas. Por este motivo se prefieren los carmines aluminosos que tiñen sin alteración dicha substancia.

Las fórmulas de carmín son muy numerosas. Nosotros daremos aquí las que gozan de más crédito.

*Picro-carminato amoniacal.*—Es una mezcla de carmín y ácido pírico, propuesta por Ranvier para lograr coloraciones dobles de los tejidos. El carmín colora los núcleos en rojo, y el ácido pírico tiñe en amarillo las células córneas y fibras elásticas.

La preparación de este importante reactivo es algo difícil, y sus resultados varían mucho según la fórmula empleada. He aquí la de Löwenthal, que pasa por una de las mejores :

Sosa cáustica.....	0,5
Carmin laca.....	0,4
Agua destilada.....	100

Después de una decocción de quince minutos, dilúyese en 200 de agua, y se añade sucesivamente una solución de ácido pírico al 1 por 100 hasta que cese de disolverse el precipitado que se forma. El líquido debe filtrarse dos ó tres veces, y estará listo para usarse.

*Carmin de Grenacher :*

Carmin.....	2
Solución de alumbre al 5 por 100.....	100

Se filtra después de una hora de ebullición. En este líquido permanecerán los cortes de una á veinticuatro horas, sin temor á la sobrecoloración. El carmín (que adquiere un matiz purpúreo), se fija de preferencia en la cromatina nuclear y figuras mitóticas ó kariokinéticas.

*Cochinilla de Czokor.* — En vez del carmín del comercio cabe utilizar la cochinilla de donde se extrae. La fórmula de Czokor da buenos resultados ; colora la cromatina nuclear de violado purpúreo.

Cochinilla en polvo.....	7
Alumbre calcinado.....	7
Agua.....	700

Hiérvase hasta reducción á la mitad, filtrese y aplíquese como la fórmula precedente.

*Carmin lítico de Orth.* — Las soluciones alcalinas de carmín poseen poca ó ninguna selección; mas cuando un preparado, teñido difusamente en un carmín alcalino, se trata por una solución alcohólica de ácido hidroclórico, el exceso de color se disuelve y se opera una fuerte selección en los núcleos.

La solución de Orth es la siguiente:

Carmin laca .....	2,5
Solución saturada de carbonato de litina .....	100

Los cortes, que permanecerán aquí algunos minutos, son lavados de medio á un minuto en una solución alcohólica de ácido clorhídrico (al 1 por 100), y luego en agua destilada.

**Hematoxilina.**—Es una substancia colorante amarillenta, poco soluble en agua, más en alcohol y en los líquidos aluminosos, que se extrae del palo campeche. Se prefieren generalmente las soluciones de hematoxilina en agua aluminosa, adicionada de cierta cantidad de alcohol. Este reactivo tiñe de color violado azul la cromatina nuclear, la materia birefrigerante de los músculos y la mucina de las células caliciformes.

Pocas substancias colorantes poseen la energía tintórea de la hematoxilina, la cual colora hasta los tejidos que han permanecido mucho tiempo en el ácido crómico y mezclas cromo-ósmicas; pero, en cambio, sus soluciones son muy inestables, no gozando de la virtud selectiva citada, sino durante cierto período (llamado de *madurez del reactivo*), que comienza una ó dos semanas después de preparado el color, y se prolonga, á lo sumo, por espacio de dos ó tres meses.

Recientes investigaciones tienden á referir la inestabilidad de la hematoxilina á una descomposición de esta materia en presencia del aire. Para Mayer, de Nápoles, la substancia activa de la época de madurez, sería un *compuesto amoniacal de hemateína*. Sus ensayos le han conducido á preparar ya madura la solución de hematoxilina. Hé aquí su fórmula:

A..	{Hemateína amoniacal.....	1	} disuélvase al calor.
	{Alcohol al 90 por 100.....	50	
B...	{Alumbre.....	50	}
	{Agua destilada.....	1000	

Se mezclan estos dos líquidos y, en frío, se filtra el licor resultante, que podrá usarse desde luego.

La *hemateína amoniacal* se obtiene disolviendo en caliente un gramo de hematoxilina en 20 de agua destilada, y adicionando un centímetro cúbico de amoníaco (peso esp., 0,875). Evaporado el líquido, la masa resultante será la *hemateína amoniacal* (1).

Hé aquí algunas fórmulas muy usadas de la hematoxilina.

*Hematoxilina Böhmer:*

1 líquido..	{Hematoxilina .....	1
	{Alcohol.....	12
2 líquido..	{Alumbre.....	1
	{Agua.....	320

A un vidrio de reloj lleno del segundo líquido, se añaden dos ó tres gotas del primero. Debe esperarse lo menos ocho días hasta que el líquido tome color azul. Las soluciones rojas antiguas no sirven.

*Hematoxilina de Ehrlich:*

Hematoxilina.....	2
Alcohol absoluto.....	100
Glicerina.....	100
Agua.....	100
Alumbre.....	en exceso.

Se abandona á la luz hasta que tome color rojo. Entonces resulta bastante estable y tiñe bien los núcleos.

Las demás fórmulas de hematoxilina no son superiores á las precedentes y no las mencionamos.

*Hematoxilina de Weigert-Pal:*

La hematoxilina tiene gran afinidad por las sales crómicas, con las que forman lacas de color negro azulado, insolubles en agua, pero atacables por ciertos reactivos. Esta propiedad sirve de base á un excelente método de coloración de la mielina de las fibras nerviosas, ideado por Weigert y modificado por Pal. La importancia de este método de teñido nos obliga á dar una idea del *modus operandi*.

(1) La hemateína amoniacal, susceptible de ser disuelta en solución de alumbre, se expende constantemente en las casas de artículos de micrografía, en la de Grüber, de Leipzig, por ejemplo.

1.º Induración de las piezas de centros nerviosos en líquido de Müller, durante treinta á cincuenta días.

2.º Induración subsiguiente en alcohol, sin previo lavado en agua.

3.º Inclusión en celoidina y ejecución de cortes que deberán recogerse en alcohol.

4.º Inmersión de los cortes, por cuatro ó seis horas, en un líquido compuesto de :

Bicromato de potasa.....	3
Agua.....	100

5.º Lavado rapidísimo de los cortes en una pequeña cantidad de agua destilada.

6.º Inmersión de los mismos, por media á una hora, y á temperatura de 40 á 60°, en la materia colorante siguiente :

Hematoxilina.....	1
Alcohol absoluto ó de 40°.....	10
Solución saturada de carbonato de litina.....	1
Agua destilada.....	90

Este líquido debe estar recientemente preparado, pues á los tres ó cuatro días actúa ya mal, volviéndose rojo-pardo.

7.º Inmersión sucesiva (y durante medio ó un minuto) de los cortes en una solución de :

Hipermanganato de potasa.....	0,5
Agua destilada.....	100

donde se vuelven pardo-amarillentos y se enrecian notablemente.

8.º Transporte de los mismos á una solución de :

Ácido oxálico.....	1
Sulfito de potasa.....	1
Agua destilada.....	200

donde permanecerán algunos minutos, hasta que se decolore todo menos la mielina, que debe quedar negra.

9.º Lavado en agua abundante.

10. Coloración subsiguiente de fondo en picrocarminato ó carmín aluminoso ó litio Carmín.

11. Lavado, deshidratación, esencia de bergamota ó creosota (si se quiere dejar la celoidina) y bálsamo al xilol.

**Acido pícrico.** — Se emplea en solución al 1 por 100. Tiñe de amarillo las fibras elásticas y los tejidos epiteliales, singularmente el epidermis córneo, para el que tiene una afinidad muy viva.

El ácido pícrico, en solución saturada, es también un buen fijador de las células glandulares, según Heidenhain.

**Eosina.** — Conocida en el comercio bajo el nombre de *primero-sa*, es una sal de potasa y de una ptaleína bromada, introducida en la técnica histológica por Renaut. Se usa disuelta al 1 por 100 ó por 200. Esta substancia tiñe en rosa el protoplasma de las células, los fascículos del tejido conectivo, y, sobre todo, los glóbulos rojos. Se emplea asociada á la hematoxilina para lograr dobles coloraciones muy instructivas.

**Azul de metileno y demas anilinas.** — Todas las anilinas básicas, tales como el *azul de metileno*, la *fuchsina*, el *violado de dalia*, el *violeta de genciana*, la *zafranina*, la *vesubina*, el *violado de anilina*, etc., tiñen fácilmente los núcleos, aplicadas, ora en soluciones acuosas débiles adicionadas de unas gotas de ácido acético, ora en soluciones muy concentradas acuoso-alcohólicas.

Las *soluciones acetificadas* tiñen directamente y en pocos minutos la cromatina nuclear de los elementos frescos; mas las *soluciones acuoso-alcohólicas* exigen, para obtener iguales resultados, una operación subsiguiente, á saber: la decoloración del preparado, ya con el alcohol, ya con la esencia de clavo, ya con los ácidos minerales diluídos, agentes que roban el color de todas las partes, menos de los núcleos y de ciertas substancias fundamentales. Con las anilinas usadas de esta suerte (método de Hermann-Böttcher), se consiguen coloraciones tan bellas ó más que las obtenidas con el carmín ó hematoxilina. Más adelante insistiremos sobre este particular.

El *azul de metileno* posee, además de las propiedades comunes á todas las anilinas básicas, una virtud importantísima, señalada primeramente por Ehrlich y aprovechada por Arstein, Smirnow, Dogiel, Retzius, Sig. Mayer, Cucatti, etc., en recientes indagaciones, á saber: la de teñir en azul intenso y durante