

la vida del animal, los cilindros-ejes y terminaciones nerviosas. A este fin se emplean soluciones al 0,3 por 100 en líquido salino indiferente (sal, 0,75 ; agua, 100), las cuales se hacen penetrar en los tejidos vivos ó recién muertos, bien mediante inyección vascular, bien á favor de irrigación directa, renovada varias veces en media ó en una hora. La reacción sobreviene rápidamente en los animales de sangre caliente, más tarde (una á dos horas después de la inyección) en los de sangre fría, y exige como condición precisa la presencia del aire ; las partes profundas impregnadas por inyección, no exhiben la selección característica en los cilindros-ejes, hasta que son puestas al descubierto.

La coloración al azul de metileno es, desgraciadamente, pasajera. No obstante, si se tratan las partes teñidas, durante dos ó más horas, por una solución saturada de picrato-amónico, se alcanza la conservación de una porción más ó menos considerable del teñido. Este fijador trueca el color azul en violado, y convierte la tinta homogénea inicial en una impregnación de aspecto granuloso.

Recientemente ha propuesto Bethe un mejor fijador de la coloración azul adquirida por las partes nerviosas. Los trozos de tejido fresco y coloreado se sumergen por doce á veinticuatro horas en la mezcla siguiente :

Molibdato amónico.....	10
Agua.....	100
Ácido clorhídrico.....	8 ó 10 gotas.
Hidrógeno peroxigenado.....	Unas gotas.

Después de la acción de este líquido, lánvanse las piezas en agua para extraer el exceso de molibdato, se induran en alcohol, se encastran en parafina y las secciones se montan en balsamo, ó d'Ammar.

El alcohol, sin embargo, aun empleado á 0 grados, como aconsejan Bethe y Semi Meyer, disuelve algo el azul. Nosotros preferimos para la induración la fórmula siguiente :

Agua.....	100
Formol.....	40
Solución al 1 por 100 de cloruro de platino.....	5

Para seccionar, englobamos superficialmente las piezas (que deben permanecer de diez á veinticuatro horas en el líquido precedente) en parafina, recogemos los cortes en alcohol adicionado de algunas gotas de la solución de cloruro platínico, deshidratamos en alcohol puro, aclaramos en xilol, y montamos en goma d'Ammar disuelta en xilol. Los cortes deben ser algo gruesos, conviniendo, para que adquieran gran transparencia, montarlos al descubierto, como las preparaciones del método de Golgi.

Substancias impregnadoras.—Ya dijimos más atrás que ciertos agentes como el ácido ósmico y algunas sales metálicas, poseían la propiedad de teñir selectivamente, pero á condición de sufrir, en presencia del tejido, una descomposición. Las substancias que obran de esta suerte, son : el ácido ósmico, el nitrato de plata, el cloruro de oro y las mezclas bicrómicas puestas en presencia de algunas sales de plata ó de mercurio.

Acido ósmico.— Es una substancia verdosa, cristalina, sumamente volátil, que E. Schultze aplicó primeramente á los trabajos micrográficos. Se usa en soluciones acuosas al 1 por 100. Este reactivo, como ya expusimos anteriormente, es un excelente fijador, pero su virtud más valiosa consiste en teñir de negro la grasa y la mielina de los tubos nerviosos.

Semejante efecto depende de una reducción del reactivo en presencia de las grasas neutras.

Nitrato de plata.—Se usa en soluciones flojas, generalmente al 1 por 300. Su especialidad de acción, consiste en colorar en negro pardo los cementos que juntan los epitelios, así como la substancia fundamental del cartilago y tejido conjuntivo. Esta acción no es directa ; necesitase del concurso de la luz, bajo cuya influencia, el cloruro y albuminato argénticos formados al nivel de los cementos, son reducidos bajo la forma de polvo argéntico impalpable.

Es condición precisa que los tejidos destinados á la impregnación sean frescos ; generalmente se prefieren las membranas serosas, la córnea y todas aquellas partes que por su delgadez son transparentes.

El *modus operandi* se reduce á lo siguiente : Comiénzase por poner al descubierto la membrana que se desea impregnar, y á

ser posible, se traslada íntegra al porta-objetos ; en seguida se irriga durante algunos segundos con la solución argéntica ; lávase rápidamente para eliminar los precipitados irregulares y el exceso de reactivo, y, bajo una gota de glicerina, se expone al sol, hasta que los tejidos adquieran color amarillo-pardo. La conservación se verificará en bálsamo ó glicerina.

Cloruro de oro. — Esta substancia se emplea en solución al 1 por 100. Su especialidad de acción consiste en reducirse, bajo la forma de polvo de oro finísimo y de matiz violado ó rojizo, en la mielina y terminación de los cilindros ejes. Como el nitrato de plata, el cloruro de oro exige también la colaboración de un reductor, que puede ser la luz y mejor todavía los ácidos orgánicos.

Muchas son las fórmulas del cloruro de oro ideadas por los autores para el fácil logro de la coloración de las terminaciones nerviosas. Nosotros indicaremos solamente la más constante.

Procedimiento de Loewit. — Primeramente se hace actuar sobre el tejido (que debe ser fresco), y durante un minuto, una solución de ácido fórmico al tercio ; en seguida se abandona el preparado por un cuarto de hora en cloruro de oro al 1 por 100, y, en último término, se lleva la pieza al ácido fórmico puro (ó diluido á la mitad), en donde permanecerá veinticuatro horas. Al cabo de este tiempo, el preparado aparecerá teñido en la superficie de violado-negro, en el centro de amarillo y en las zonas intermedias de rojo-violado claro. Esta región de transición es la que exhibe las mejores terminaciones nerviosas.

Cromato de plata. — Cuando se somete á la acción del nitrato de plata un trozo de centro nervioso ó de tejido con nervios, previamente indurado en bicromato de potasa, prodúcese en el espesor de la trama, y sobre ciertos elementos solamente, un precipitado rojo-ladrillo opaco, que permite seguir fácilmente las fibrillas nerviosas y las expansiones de las células.

Esta singular reacción fué descubierta por Golgi, y ha sido aprovechada ventajosamente en el estudio de la estructura de la retina, mucosa olfatoria, ganglios, médula, cerebro, cerebelo, por numerosos investigadores (Golgi, L. Sala, Fusari, Martinotti, Tartuferi, los hermanos Cajal, Cl. Sala, Kölliker, Lenhosséck,

van Gehuchten, Retzius, Falcone, Schaffer, Calleja, etc. Hé aquí el método de Golgi, tal como nosotros lo practicamos.

Método rápido de Golgi modificado :

1.º Induración de trozos pequeños (1/3 de centímetro cuadrado á lo más) durante uno á tres días en :

Bicromato de potasa al 3 por 100	20
Ácido ósmico al 1 por 100	6

2.º Lavado rápido (dos á cuatro segundos) en agua destilada.

3.º Inmersión por treinta horas en solución de nitrato de plata cristalizado al 0,75 por 100.

4.º Induración por media hora, en alcohol de 40º.

5.º Montaje superficial en un bloque de parafina ó entre dos trozos de médula de saúco, para efectuar las secciones microtómicas, que deberán ser espesas.

6.º Lavado de los cortes (que deben recogerse en alcohol de 40º) en alcohol de 40º, que se mudará seis ú ocho veces durante media hora.

7.º Aclaramiento, por dos á cinco minutos, en la esencia de clavos.

8.º Traslación rápida al porta-objetos, donde se irrigarán con xilol (por algunos segundos) para quitar la esencia de clavos.

9.º Lubricación de los cortes con bálsamo ó resina d'Amarr disueltos en xilol.

10. Desecación subsiguiente de los cortes al descubierto, á fin de que el barniz se endurezca hasta lo hondo del tejido, y las células queden como incrustadas en cristal. La lenta desecación del barniz, así como un montaje á la manera ordinaria, estropean la coloración.

Este método de coloración produce excelentes preparados en la médula embrionaria, cerebro y cerebelo de los mamíferos, en la retina, bulbo olfatorio, terminaciones nerviosas periféricas, gran simpático adulto, conductos glandulares, etc. Tiñe de negro las células y particularmente los cilindros-ejes.

Cuando después de la impregnación en nitrato de plata, el preparado nos mostrase poca ó ninguna reacción, volverán á someterse las piezas (recién sacadas del nitrato) á los mismos

baños, á saber: solución osmio-bicrómica por veinticuatro horas, y nitrato de plata por treinta y seis. Este método, que nosotros hemos llamado de *doble impregnación*, es mucho más constante que el ordinario, y nos ha permitido (así como á Retzius, van Gehuchten, Cl. Sala, P. Ramón, Lenhosséck, etc.) colorar fibras y células nerviosas, que se resisten á los otros modos de empleo de la reacción negra.

Impregnación con las sales de mercurio. — Golgi, en sus fecundas exploraciones técnicas sobre el sistema nervioso, descubrió que si una pieza indurada en bicromato potásico, se trata durante algunas semanas por el bicloruro de mercurio, ciertas células y fibras nerviosas aparecen impregnadas por un precipitado metálico, blanco á la luz refleja, y obscuro á la luz transmitida. El método de Golgi al mercurio, ha sido modificado ventajosamente por Cox, cuyo procedimiento damos aquí.

Método de Cox :

1.º Trozos frescos de centros nerviosos, se abandonan por dos ó tres meses en este líquido.

Bicromato de potasa al 5 por 100	20
Solución de sublimado al 5 por 100	20
Agua destilada	30 ó 40
Cromato de potasa al 5 por 100 con reacción fuertemente alcalina	16

2.º Sección de las piezas como en el método de Golgi.

3.º Después de lavadas en mucha agua, se colocan por algunos segundos en una solución floja de potasa, hasta que el precipitado mercurial blanco se torne moreno.

4.º Lavado en mucha agua para arrastrar la potasa excedente.

5.º Deshidratación en alcohol. Esencia de clavo y goma d'Ammar. Montaje al descubierto.

REACTIVOS INOFENSIVOS

Los *reactivos inofensivos* son líquidos que, por alterar poco ó nada la forma y vitalidad de los elementos anatómicos, se apro-

vechan para conservar, durante el examen en vivo, los humores y tejidos.

Uno de los líquidos inofensivos más usados es la solución salina siguiente :

Cloruro de sodio	0,75
Agua destilada	100

Añadiendo á este licor cierta cantidad de violeta de metilo, se obtiene el líquido conservador *sodico-metilico* de Bizozzero, utilísimo para el examen algo prolongado de las plaquetas de la sangre.

El *humor ácueo*, extraído ya de la rana, ya del conejo, es también un buen vehículo para conservar durante la observación los movimientos amiboides de los leucocitos y el vibrátil de los epitelios.

Los demás reactivos inofensivos, á saber: la *solución salina de Hayem*, el *suero artificial de Schültz*, el de *Kronecker*, etc., se aplican en ciertos casos solamente, y no son tan provechosos como los arriba citados para el examen en vida.

REACTIVOS CONSERVADORES

Son *reactivos conservadores*, no los ofensivos, sino los que, además de poner los tejidos al abrigo de la putrefacción, conservan el color y demás cambios provocados en las preparaciones por las distintas maniobras de fijado y coloración.

El modo de acción de estos reactivos consiste, unas veces, en robar agua al preparado, imposibilitando así toda vegetación de bacterias (alcohol, glicerina), y otras en sustituir el agua de imbibición por materias resinosas imputrescibles, como el bálsamo del Canadá, la resina d'Ammar, el *stirax*, etc.

Glicerina. — Debe ser anhidra y perfectamente neutra, para evitar la alteración que, en presencia de ácidos ó álcalis, experimentan ciertos colores. Esta substancia conserva bastante bien los tejidos, á quienes presta regular transparencia; pero tiene el inconveniente de retraer algo los fascículos conjuntivos y de alterar á la larga la coloración de las células.

Bálsamo del Canadá.—Se aplica, generalmente, disuelto en xilol, de modo que se obtenga una masa de consistencia de jarabe espeso. El montaje en bálsamo de los cortes exige, como condición precisa, la deshidratación (en alcohol) y el aclaramiento. (Véase más adelante: *Conservación de las preparaciones*).

Goma d'Ammar.—Se aplica, como en el bálsamo, la solución en xilol de la resina seca y pulverulenta; su empleo reclama también la previa deshidratación de los cortes.

Licor de Farrant:

Goma arábica.....	100
Agua.....	100
Glicerina.....	2

Añádase para conservar este líquido un cristal de timol.

Se aplica, como la glicerina, sobre objetos no deshidratados. La ventaja principal de este ménstruo estriba en que no exige cementación definitiva, pues la parte que rebosa del cubre-objetos se endurece progresivamente, constituyendo una costra protectora.

Los demás líquidos conservadores, á saber: el de Goadby (sal, alumbre y sublimado), el de Pacini (sublimado, sal y glicerina), la glicerina gelatinada, etc., se emplean raras veces, porque además de la escasa transparencia que dan á los objetos, respetan poco los colores, y el menor deterioro del cemento que rodea el cubre-objetos, ocasiona la desecación del preparado.

CAPÍTULO IX

C. — MÉTODOS HISTOLÓGICOS

Clasificación de los métodos.—Método del examen en vida.—Método aislador.
Método de los cortes.—Método de las inyecciones.

Llámase *método histológico* al conjunto de operaciones destinadas á demostrar tal ó cual disposición estructural de los tejidos. Comprende cada método una porción de actos técnicos que conspiran al mismo fin; así, por ejemplo, la demostración de la textura del núcleo entraña la ejecución de estas operaciones: fijado del objeto, induración, sección, coloración, etc.

Si cada particularidad de estructura de los tejidos exige el empleo de uno ó de varios métodos analíticos, está claro que deben ser éstos muy numerosos. Su exposición circunstanciada reclamaria una extensión de que no disponemos; por lo cual, nosotros nos ceñiremos á explicar los métodos de indagación aplicables á todos ó á varios tejidos. Los métodos analíticos más generales pueden reducirse á cuatro: *el examen en vivo*; *la disociación*, que presenta las células aisladas; *el método de los cortes*, que revela los elementos en sus relaciones y actitudes naturales; *el método de las inyecciones*, que consiente, mediante el relleno de las cavidades orgánicas, la percepción del contorno de éstas. Las *operaciones de coloración* podrían en rigor considerarse como métodos; pero nos parece más práctico englobarlas en el método de los cortes, del cual representan el obligado complemento.

EXAMEN EN VIVO

El examen de los elementos vivos puede efectuarse, bien en líquidos orgánicos, bien en tejidos disociables, bien en membranas transparentes del animal íntegro.