

**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'Amarr.**—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.

**Líquidos orgánicos.**—La observación de los tumores vivos, tales como la sangre, la linfa, el esperma, etc., es de las más sencillas. En el centro de una cámara húmeda porta-objetos, se deposita una gota del líquido que se desea examinar: cúbrese rápidamente el preparado con una laminilla que, para evitar la intrusión de microbios, se cementará con parafina. Si el líquido pertenece á un animal de sangre fría, bastará el empleo de la cámara húmeda; mas si procede de un animal de sangre caliente, la observación se hará en la cámara de Pfeiffer.

**Examen de los tejidos íntegros ó disociados.**—La córnea de la rana, trozos de tejido conectivo extraído mediante las tijeras curvas, las fibras musculares frescas de las patas del hidrófilo, pedazos del epitelio vibrátil del esófago de los batracios, etc., podrán conservarse vivos en cámara húmeda y por varias horas. El vehículo preferible será para los elementos de la rana, el humor acuoso del mismo animal, y para los del *hidrophilus piceus*, *ditiscus marginalis*, etc., la linfa que de estos coleópteros rezuma cuando se les arranca una pata ó la cabeza. En general, y para evitar la muerte rápida de los elementos, la disociación preliminar al examen será muy ligera: se impedirá también que el cubre-objetos oprima demasiado la preparación.

**Examen de los órganos transparentes.**—El mesenterio, pulmón y lengua de la rana, las expansiones membranosas de la cola del renacuajo y de la larva del sapo, el mesenterio del conejillo de Indias de pocos días, etc., constituyen órganos adecuados á la observación microscópica de algunos tejidos vivos, tales como los nervios, los vasos, la sangre y linfa, el tejido conectivo, los epitelios, etc.

**Examen en el renacuajo.**—Prefiérense larvas de pequeño tamaño, porque pueden acomodarse fácilmente encima de un porta-objetos. Para inmovilizar el animal, se añaden al agua en que nada unas gotas de una solución de curare al 1 por 100. Mientras el renacuajo tiene el epitelio íntegro, no se absorbe el veneno; pero en cuanto se pica la piel, el curare penetra y el animal queda inmóvil, aunque no muerto, pues el corazón continúa latiendo y la nutrición se mantiene. Al objeto de evitar la

deseccación, se mojará de cuando en cuando la piel, y se cubrirán las expansiones de la cola con una laminilla.

**Mesenterio de la rana.**—El mesenterio se presta admirablemente, por su gran transparencia y delgadez, al estudio de los vasos y sangre, así como al examen de los corpúsculos del tejido conectivo.

La rana se inmovilizará también con el curare, de cuya solución al 1 por 100 se inyectarán bajo la piel, en el saco linfático dorsal, algunas gotas. A los diez minutos, la absorción es suficiente para paralizar los movimientos voluntarios. Acto continuo, y previa una sección lateral del abdomen, se extrae un asa intestinal (porción superior del intestino), provista de un repliegue mesentérico dilatado. A prevención, tendremos preparado un cristal pequeño (el tamaño 9 por 12 centímetros, llamado cuarto de placa por los fotógrafos, es excelente), en cuyo centro se pega con parafina un cilindro de corcho, cuyo diámetro concuerde con el del asa intestinal, y cuya altura guarde proporción con el espesor de la rana. En el contorno superior del corcho se labrará exteriormente una muesca, en donde, á favor de finos y cortos alfileres, deberá fijarse el intestino. La observación se efectúa á flojos aumentos (A ó C de Zeiss), si se desea apreciar la circulación en un territorio algo extenso; la percepción de finos detalles exige un objetivo fuerte (E de Zeiss, por ejemplo), y la protección del mesenterio mediante un pequeño cristal circular. Finalmente, se cuidará de mantener la respiración cutánea de la rana, mojando la piel cada cinco ó diez minutos; esto evita también la desecación del mesenterio.

El examen de la membrana interdigital se hará fácilmente, inmovilizando la rana sobre un corcho plano y extenso, en el cual habrá un agujero que se cubrirá con las expansiones interdigitales de la pata extendida. La extensión de los dedos se mantendrá á favor de hilos, fijos por uno de sus extremos en las últimas falanjes, y atados por el otro en los agujeros del corcho.

Aunque con menos comodidad, cabe también examinar la circulación en el mesenterio del conejillo de Indias. El ratón, la rata y el gato son menos á propósito, á causa de las espesas formaciones adiposas que recubren los vasos peritoneales. En cuan-

to á la inmovilización, se efectuará inyectando en el peritoneo cierta cantidad de hidrato de cloral; dos ó tres gramos de solución acuosa al 5 por 100 bastan para narcotizar, por algunas horas, un conejo de Indias de pequeña talla.

#### DISOCIACIÓN

El *aislamiento* de los elementos anatómicos puede efectuarse de las siguientes maneras: por *acción mecánica*, por *acción química* y por *compresión*.

**Disociación mecánica.** — Esta operación se ejecuta en los tejidos blandos, sobre todo en los que, como el muscular, el nervioso, el fibroso, el del cristalino, están contruidos por filamentos largos paralelamente dirigidos.

Las maniobras de disociación se ejecutan sobre un porta-objetos colocado encima de un fondo negro ó blanco (según sea el color del tejido), con el objeto de percibir claramente, por contraste, los más pequeños fragmentos desprendidos. El desmenuzamiento, que se prolongará hasta que las parcelas obtenidas resulten casi invisibles, se efectuará con las agujas enmangadas y bajo una gota de líquido indiferente, á menos que no convenga, como sucede en los nervios, ayudarse de la semidisecación. En ciertos casos, se facilitará mucho la operación con el microscopio simple.

La *compresión* de los tejidos frescos ó fijados entre dos laminillas, la *dilución* de los líquidos cargados de células á favor de vehículos indiferentes, y la *inyección* de estos mismos reactivos en los intersticios de tejidos fibrosos, son procedimientos mecánicos que podrán aplicarse también con provecho.

**Disociación química.** — Se efectúa utilizando la virtud que poseen ciertos reactivos de disolver el cemento separatorio de las células. Así, cuando un trozo de epitelio fresco se abandona por treinta y seis horas en el alcohol al tercio, el epitelio aparece desintegrado, y es fácil trasladar á un porta-objetos numerosas células sueltas, que serán teñidas en la hemotoxilina ó en el picro-carminato. La potasa al 40 por 100, el ácido nítrico al tercio, el líquido metílico de Schiefferdecker (agua, 20; glicerina, 10;

alcohol metílico, 1), el líquido de Landois (solución saturada de bicromato amónico, neutro, 5; solución saturada de fosfato potásico, 5; solución saturada de sulfato sódico, 8; agua, 100), serán muy útiles en casos especiales.

#### MÉTODO DE LOS CORTES

El método de los cortes comprende el conjunto de operaciones que deben realizarse para conseguir secciones delgadas, transparentes y coloreadas de un órgano ó tejido. La importancia de este método es tan grande que, á menudo, hace inútiles todos los demás. Así, por ejemplo: la estructura de los tejidos cartilaginoso, óseo, epitelial, etc., puede estudiarse suficientemente en los cortes, con tal de variar los procedimientos de fijado, inclusión y coloración en armonía con el detalle estructural que se desea poner de relieve.

Es preciso distinguir dos casos en lo referente á las maniobras necesarias para la obtención de finas secciones: cuando los tejidos seccionables son blandos, y cuando son excesivamente duros, casi pétreos.

#### A. — SECCIONES EN TEJIDOS BLANDOS

Los órganos blandos, parenquimatosos, *verbi gratia*, el ovario, el hígado, el intestino, la médula, los ganglios, etc., deben sufrir, al objeto de prestarles el endurecimiento conveniente, las operaciones siguientes: fijación, induración y encastramiento ó inclusión; vienen después las maniobras de sección, seriación (si ha lugar), coloración y montaje.

**Fijado de las piezas.** — Se verificará por uno de los líquidos más atrás mencionados con el título de fijadores. El líquido elegido variará según el objeto que nos propongamos demostrar. Así, cuando se desea estudiar la kariokinesis ó la textura del núcleo, se dará la preferencia al fijador de Rabl ó al de Flemming; si se intenta poner de manifiesto la textura de los tubos nerviosos, se echará mano del ácido ósmico al 1 por 100, quo se hará obrar durante algunos minutos; finalmente, si se busca solamente una imagen de conjunto, se apelará al alcohol absoluto.

**Induración.**— Después de extraer la pieza del líquido fijador, se lava en agua abundante (excepto cuando se emplea el alcohol absoluto), y se sumerge, ya en el alcohol, ya en el bicromato potásico.

El endurecimiento en alcohol es el complemento obligado de toda acción indurante ó fijadora conseguida con otros reactivos. Así, toda pieza fijada en el ácido ósmico, licor de Flemming, bicloruro de mercurio, licor de Kleinenberg, formol, etc., se trasladará al alcohol, donde permanecerá dos ó tres días. Este reactivo servirá también para acabar el endurecimiento de las piezas de centros nerviosos, indurados previamente en el ácido crómico ó en el bicromato de potasa.

**Inclusiones.**— La inclusión ó encastramiento, es la operación por cuya virtud se hace penetrar en el espesor de la pieza endurecida por el alcohol, una materia solidificable, que lleva al *máximum* la consistencia del tejido, y facilita la ejecución de cortes, cuyo espesor oscila entre dos centésimas y una milésima de milímetro.

Muchas son las sustancias propuestas con tal objeto; pero los histólogos emplean hoy casi exclusivamente las *inclusiones en parafina y celoidina*. Estas son las que expondremos brevemente, aconsejando al lector deseoso de profundizar el asunto y de conocer los otros modos de encastrar (inclusión en jabón, en albúmina, en agar-agar, en goma, etc.), la lectura de las obras especiales de técnica micrográfica.

**a) Inclusión en colodion y celoidina.**— Este método de encastramiento fué imaginado por M. Duval que se sirvió primeramente del colodion espeso, que solidificaba mediante el alcohol de 36°. Actualmente se prefiere la celoidina, que es una especie de colodion seco, de color ambarino, soluble lentamente en una mezcla, á partes iguales, de éter á 65° y alcohol de 40° ó absoluto. Algunos proponen la *fotoxilina*, que se disuelve más rápidamente en la mezcla alcohólico-etérea, y forma, cuando solidificada, una masa transparente; pero no posee ventajas sobre el colodion y la celoidina, si hemos de juzgar por propias experiencias.

La solución de celoidina debe tener consistencia de jarabe es-

peso. En ella permanecen uno ó varios días las piezas; después son abandonadas por veinticuatro horas en alcohol de 36° ó cloroformo puro. Estos líquidos roban el éter de la celoidina, que adquiere una consistencia semejante al cautchouc.

Antes de incluir las piezas, deben deshidratarse en alcohol absoluto, y se supone que han sido preventivamente fijadas. Para mayor claridad, he aquí la marcha de las operaciones necesarias á una buena inclusión:

1.º Los trozos de tejido ó neoplasia, de un espesor que no pasará de un centímetro (la anchura es indiferente), permanecerán veinticuatro horas en una mezcla de éter y alcohol.

2.º Después se sumergirán, por veinticuatro á cuarenta y ocho horas ó más (según el espesor de las piezas), en una primera solución de celoidina al 2 por 100.

3.º Durante dos, tres ó más días, atendido el volumen, se empararán las piezas en una segunda solución de celoidina al 8 ó más por 100. Este líquido debe tener consistencia de espeso jarabe.

4.º Extraída la pieza de la celoidina, se montará inmediatamente (evitando la desecación del vehículo) sobre un corcho limpio y seco, ó sobre un trozo de madera. Pegada á tal soporte, quedará expuesta al aire, durante algunos minutos, á fin de que se condense un tanto más la celoidina envolvente.

5.º Los corchos ó maderas con los objetos pegados, se introducirán en un frasco de boca ancha que contenga alcohol de 36°. Aquí permanecerán las piezas (que deben quedar envueltas por el alcohol) unas veinticuatro horas.

6.º Puesta la pieza con su soporte de corcho en la pinza porta-objetos del microtomo, se procederá á seccionarla, cuidando de lubricar la navaja con alcohol de 36°.

7.º Los cortes serán recogidos en agua, donde permanecerán hasta el momento de ser teñidos. Si la tinción debiera demorarse dos ó más horas, la conservación de los cortes durante este tiempo se hará en alcohol de 36°.

*Observaciones.*— El método de inclusión del colodion ó celoidina es aplicable á todos los tejidos sin excepción, aun á los más duros, á condición de estar decalcificados.

El tiempo necesario al englobamiento podrá abreviarse mucho si las piezas son muy pequeñas (3 ó 4 milímetros de espesor). En tal supuesto, cabe practicar todas las operaciones de la inclusión en unas doce ó catorce horas, pudiendo prescindirse del primer baño de éter y alcohol, y aun de la primera solución de celoidina.

b) **Inclusión en parafina.**—Las piezas englobadas en esta materia adquieren una consistencia muy notable, siendo fácil reducirlas con el microtomo á secciones de 3 á 5 milésimas. Hasta los tejidos muy blandos, tales como el nervioso, el glandular, y aquellos que encierran repliegues ó cavidades considerables, por ejemplo, el ovario, el testículo, el intestino, los embriones, etcétera, se cortan sin ninguna dificultad, particularmente si se utilizan el microtomo automático de Minot, ó el de la Sociedad de Cambrigde.

El orden de las operaciones es el siguiente :

1.º Las piezas, convenientemente deshidratadas y fijadas, se colocarán en una mezcla, á partes iguales, de alcohol y cloroformo. El cloroformo debe echarse después del alcohol, y á favor de una pipeta que penetrará hasta lo más hondo, á fin de constituir una capa profunda exclusivamente clorofórmica. En cuanto las piezas, que se mantendrán algún tiempo entre las dos zonas de alcohol y cloroformo, desciendan del todo, pueden trasladarse :

2.º Al cloroformo puro, donde quedarán por seis á veinticuatro horas.

3.º Del cloroformo se transportarán á una solución concentrada de parafina en cloroformo, donde se abandonarán por seis á veinticuatro horas.

4.º Después se conducirán á un baño maría (1) que contenga parafina derretida, y á temperatura apenas superior al punto de fusión. Aquí permanecerán según las dimensiones, desde ocho horas á dos ó tres días.

5.º Extraída la pieza, se enfriará repentinamente para que la

(1) Utilizase de preferencia el baño maría de Giesbrecht ó de Nápoles, el cual está provisto de termo-regulador de mercurio, termómetro, etc. Su precio viene á ser de 75 francos.

materia de inclusión se solidifique en cristales finísimos (una solidificación lenta da cristales espesos que estropean los elementos); luego se montará en un bloque de parafina, al cual se pegará mediante un escalpelo caliente, terminándose la operación, recubriendo la superficie de la pieza con una capa de parafina de 3 ó 4 milímetros de espesor.

6.º Al montar la pieza en el microtomo, se tallará en cuadrado, procurando que una de las caras se dirija hacia adelante. El filo de la navaja deberá ser paralelo á dicha superficie, es decir, perpendicular á la resbaladera; disposición que favorece singularmente la obtención de series ó cintas de cortes.

7.º Los cortes se llevan á un porta-objetos, se lavan con esencia de trementina ó xilol para quitarles la parafina, y se montan en bálsamo. Se supone, naturalmente, que la pieza fué teñida en masa antes de la inclusión. Ya veremos luego cómo se logra el teñido individual de los cortes.

*Observaciones.*—A) El cloroformo y la solución de parafina en cloroformo se emplean, antes de la inmersión en el baño de parafina, para facilitar la penetración de ésta en la trama del tejido. Pero pueden utilizarse con tal fin todos los disolventes de la parafina: la esencia de trementina, la esencia de clavo, la esencia de cedro, el xilol, el petróleo, el toluol, etc. El modo de empleo de estos agentes será igual que el del cloroformo.

B) Los cortes de la parafina tienen, á veces, tendencia á arrollarse, imposibilitando el logro de las series. Los remedios propuestos son muchos. He aquí algunos :

Mecánicamente, se evita dicho enrollamiento, superponiendo á la pieza, suavemente y mientras se corta, un pincel ancho y flexible. La navaja pasa entonces por debajo de éste y el corte queda plano.

Se aconseja también tallar en prisma triangular, de arista aguda anterior, el bloque de parafina; con lo que, si el corte se arrolla en espiral, podrá desarrollarse á un suave calor en el porta-objetos, teniendo la precaución de poner el lado ancho y la base de la espiral hacia abajo.

Un procedimiento que, para pequeñas piezas, nos ha dado resultados, es formar la costra exterior de parafina de capas alter-

nadas (por sumersión y rápido enfriamiento de la pieza) de parafina dura y blanda.

Pero el mejor remedio es usar una parafina cuyo punto de fusión guarde relación con la temperatura del ambiente. Bajo las altas temperaturas del verano (25 á 30°), convendrá una parafina que funda á 55°; en pleno invierno (10 á 12°) se preferirá la parafina que funda á 45°; finalmente, con temperatura de transición (18 á 22°) se ensayarán con ventaja parafinas de punto de fusión de 48 á 50°, ó mezclas, previamente ensayadas, de parafinas dura y blanda. El punto de fusión de una parafina puede exaltarse con la cocción prolongada.

**Seriación y montaje de los cortes en porta-objetos.**—*Cortes á la celoidina.*— Los cortes á la celoidina podrán seriarse, con sólo recogerlos en una sucesión ordenada de pocillos de porcelana como los que utilizan los acuarelistas. En cada pocillo sufrirá el corte todas las operaciones de teñido, lavado, deshidratación, aclaración, etc., sin confusión alguna, con tal que los pocillos estén numerados.

Cuando los cortes son 1, 2 ó 3, no hace falta utilizar ningún procedimiento de adherencia al porta-objetos. Teñidos, deshidratados y aclarados, se lubrican en una gota de bálsamo y se cubren con una laminilla.

Pero si los cortes son pequeños y numerosos, y se desea montarlos ordenadamente en un solo porta-objetos, cabrá utilizar el artificio siguiente: aclarados y ordenados convenientemente sobre el cristal, se mojan con bálsamo al xilol á poca concentración; cuando, transcurrido un cuarto de hora, la capa de fijativo esté casi seca (debe cubrir los cortes), ya no habrá inconveniente en proteger el preparado en el cubre-objetos, lubricado en bálsamo ordinario. La presión de la laminilla no desarreglará las secciones, porque el nuevo líquido conservador será incapaz de reblandecer la costra de fijativo.

Para series largas y cuidadosas debe preferirse el método de Weigert, á saber:

1.º Conforme se obtienen los cortes, se van colocando, empapados en alcohol de 36°, sobre una hoja de papel *closet*, donde á prevención, tendremos marcado el comienzo de la serie.

2.º El papel (siempre húmedo con alcohol flojo) con los cortes hacia abajo, se coloca sobre una lámina de cristal colodionada, como las que emplean los fotógrafos para dar el brillo; se aprieta el papel sobre el colodion, y los cortes se adhieren en cuanto aquél se despegas.

3.º El cristal y los cortes (que no deben secarse) se cubrirán de una nueva capa de colodion, la cual se dejará coagular durante algunos minutos.

4.º Puestos los cristales en el agua (antes de secarse el colodion), se desprenderá fácilmente la película del colodion con todos los cortes seriados, pudiéndose ya con toda seguridad ejecutar en ella, como si se tratase de un solo corte, todas las operaciones ulteriores de coloración, deshidratación, aclaramiento y montaje. La esencia para aclarar será la creosota, que transparenta mucho y no ataca á la celoidina.

*Cortes á la parafina.*—Con los microtomos automáticos llamados de Minot y de báscula (Reichert), se obtienen fácilmente, si la parafina posee la debida consistencia, cintas de cortes, que se pegan al porta-objetos á beneficio del líquido siguiente:

*Licor de Schallibaum:*

Colodion normal.....	1
Esencia de clavo.....	3

Con esta mezcla se lubrica, en capa delgadísima, el porta-objetos. Este licor tiene la propiedad de no secarse á la temperatura ordinaria, y de coagularse rápidamente. Fijadas las series, llévase la preparación á un baño maría (56° ó 60°), donde, á la media hora, se habrá evaporado la esencia y endurecido la capa de colodion.

Ulteriormente se extrae la parafina con la esencia de trementina, y se cubre el preparado con una laminilla untada de bálsamo.

**Coloración de los cortes de preparaciones englobadas en celoidina.**—He aquí la marcha sistemática para los carmines, la hematoxilina y las anilinas.

*Coloración con el carmín y eosina.*

1.º Los cortes lavados en agua destilada, se abandonan por