

seis á veinticuatro horas en el carmín aluminoso de Grenacher, ó en la solución de cochinilla de Czokor.

2.º Lavado en agua para extraer el exceso de color.

3.º Llévanse los cortes á una solución de eosina al 1 por 200, donde permanecerán algunos minutos.

4.º Nuevo lavado en agua.

5.º Deshidrataciones en alcohol.

6.º Aclaramiento en esencia de clavos, donde se disolverá la celoidina. Si, por tener el corte muchas cavidades, no conviniese extraer la celoidina, se conservará ésta, aclarando con la creosota.

7.º Montaje en bálsamo ó resina d'Amarr.

Coloración con la hematoxilina y eosina.

1.º Los cortes, recién extraídos del agua, se sumergen en un pocillo de porcelana que contenga cierta cantidad de hematoxilina de Böhrer, ó de Ehrlich, ó de Delafield, etc. Aquí permanecerán de dos á diez minutos, durante los cuales se agitarán, á fin de que el teñido resulte por igual. Evítense los pliegues de los cortes. En ocasiones convendrá, para que el teñido sea más lento y manejable, diluir la hematoxilina en el doble ó triple de agua destilada.

2.º Lavado de los cortes en agua abundante.

3.º Traslación de los mismos á una solución de eosina al 1 por 200, donde permanecerán algunos minutos.

4.º Deshidratación en alcohol, aclaramiento en esencia de clavos y bálsamo.

Hematoxilina ferruginosa de M. Heidenhain.—Para colorar en negro los núcleos y en moreno los centrosomas del protoplasma, aconseja este autor el siguiente método :

1.º Los cortes de tejidos se sumergen, por una ó varias horas, en una solución al 2 ó 3 por 100 de alumbre de hierro.

2.º Lavado rápido en agua destilada para quitar el exceso de mordiente.

3.º Inmersión, por media ó varias horas, en una solución acuosa de hematoxilina al 1 por 100.

4.º Lavado por algunos minutos en un exceso de mordiente,

es decir, en el mismo licor ferruginoso antes citado, en el cual el color negro irá desapareciendo paulatinamente hasta que los cortes tomen un tono gris.

5.º Inmersión en agua destilada para eliminar el mordiente.

6.º Deshidratación, aclaramiento y montaje en bálsamo.

Los núcleos aparecen teñidos de negro ó gris obscuro, y los protoplasmas de moreno más ó menos claro, según el tiempo de acción del mordiente.

Este método puede combinarse con la coloración de fondo del método de Gieson, es decir, con la picro-fuchina, obteniéndose espléndidas coloraciones rojas del tejido conectivo. Para ello no hay más que sumergir los cortes en este reactivo, después de efectuado el lavado que sigue á la decoloración.

Coloración con las anilinas.

1.º Los cortes permanecen, de diez minutos á una hora, en una solución saturada en agua (conviene añadir al agua algunas gotas de alcohol para que la solución sea más intensa) de uno de los siguientes colores básicos de anilina : la zafranina, el azul de metileno, la vesubina, el violado de genciana, tionina, etc.

2.º Los cortes son sucesivamente llevados al alcohol, que se renovará dos ó tres veces hasta que desaparezca el exceso de color.

3.º Aclaramiento en la esencia de bergamota (la esencia de clavos no conviene sino cuando la decoloración es todavía insuficiente, porque disuelve las anilinas) y montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Coloración triple de van Gieson.

Los cortes fuertemente teñidos en una solución de hematoxilina madura, se colocan, por algunos minutos, en una solución saturada de ácido pícrico que contenga una pequeña cantidad de fuchina ácida (agua saturada de ácido pícrico, 100; fuchina ácida, 0,1). Los cortes se llevan después al alcohol, donde se deshidratan, se aclaran en esencia de clavos y se montan en d'Amarr. Los núcleos aparecerán violados, amarillos los epitelios y rojos los haces conjuntivos.

Método de Romanowski. — Se comienza por juntar á partes iguales estos dos líquidos: solución acuosa al 0,2 por 100 de azul de metileno y solución á igual título de eosina. En el líquido así formado precipitase una substancia que se ha llamado *eosinato de azul de metileno*, solamente soluble en agua bajo la acción del calor.

Calentado el líquido á 70 ó 90 grados, se sumergen en él, por algunos minutos, los cortes, los cuales una vez extraídos se lavarán primero en agua y luego se decoloran en el alcohol hasta que pierdan el exceso de azul. El eosinato de azul de metileno se desdobra en presencia de los tejidos; los núcleos atraen el azul y los fascículos conjuntivos se tiñen de rojo.

Método de triple coloración con la fuchina ó magenta, el ácido pícrico y el carmín de indigo (Cajal).

1.º Los cortes se sumergen, durante cinco á diez minutos, en una solución saturada ó muy concentrada de rojo magenta (fuchina roja ordinaria).

2.º Lavado rápido en agua abundante para arrastrar el exceso de color.

3.º Coloración, por cinco á diez minutos, en la siguiente solución: agua saturada de ácido pícrico, 100; carmín de indigo, 0,25.

4.º Lavado rápido en agua acética (en un pocillo de porcelana, lleno de agua, se echan dos ó tres gotas de ácido acético).

5.º Lavado durante medio minuto ó más en agua común para arrastrar el exceso de ácido pícrico.

6.º Decoloración en alcohol absoluto, hasta que los cortes hayan desprendido el exceso de magenta, lo que se conocerá en el color violado general adquirido por aquéllos.

7.º Aclaramiento en xilol ó bergamota.

8.º Montaje en bálsamo disuelto en xilol.

Es éste sin disputa uno de los métodos más apropiados para teñir todos los órganos que contienen epitelios y trama conectiva. Los núcleos aparecen impregnados enérgicamente en rojo vivo; los protoplasmas exhiben una tinta verde clara ó rosácea amarillenta, y los haces conjuntivos se presentan de azul puro intensísimo. Tiene además este método la ventaja de la facilidad

y rapidez de ejecución, así como la perfecta conservación de las preparaciones.

En general, el ácido pícrico goza de la propiedad de transformar todo color soluble en las soluciones de aquél en un excelente reactivo de la substancia colágena. Hasta la misma hematoxilina de Weigert-Pal, asociada al ácido pícrico en saturación, se convierte en un reactivo acidófilo, que tiñe la colágena de violado azul.

C. Calleja ha modificado todavía este método utilizando para el teñido nuclear el carmín de Orth ó el aluminoso. La coloración roja resulta así muy estable.

Coloración de las preparaciones englobadas en parafina. — Las preparaciones á la parafina pueden teñirse de dos modos: *en bloque*, antes de la inclusión, y *en los cortes*, después de la fijación de éstos en porta-objetos.

Teñido en masa. — Se realiza cuando la pieza acaba de ser endurecida y fijada. Los líquidos colorantes preferibles al efecto son: la hematoxilina de Böhmer ó Ehrlich, el carmín aluminoso, la hematoxilina de Heidenhain, el carmín lítico de Orth, etc.; las piezas deben ser pequeñas y permanecer de seis á veinticuatro horas ó más en los líquidos colorantes.

Teñido en porta-objetos. — Se efectúa sobre los cortes pegados al cristal y desprovistos de parafina. Para ello, se lubrica la preparación con esencia de trementina, luego con alcohol fuerte, y últimamente con agua destilada. En este momento se aplica el color (hematoxilina, zafranina, carmín lítico, etc.), subsiguendo todas las operaciones requeridas para el montaje, á saber: lavado en agua, deshidratación, aclaramiento en esencia y conservación en bálsamo.

Como materia fijadora al cristal de los cortes seriados, se preferirá el licor de Schallibaum.

B. — SECCIONES EN TEJIDOS Duros

El hueso y el diente, así como el cartílago en vías de osificación, pueden seccionarse, ya en su estado natural, ya previo blandecimiento por los reactivos ablandantes ó decalcificantes.

La obtención de cortes del diente y hueso con su consistencia natural, lógrase utilizando un procedimiento análogo al usado por los petrógrafos para la sección de las rocas. He aquí el *modus operandi* en el hueso.

1.º Obtención, con la sierra-pelo de relojero, de un corte grosero, que comprenda, á ser posible, todo el espesor de la diáfisis de un hueso largo (radio, cúbito, femur).

2.º Sobre una piedra arenisca ó rueda de vaciador, se desbasta el corte por ambas caras, hasta que presente un espesor de menos de medio milímetro.

3.º El corte se lleva á una piedra fina de afilar, como la usada por los peluqueros, en la cual, y mojada con alcohol, se pule y adelgaza hasta que resulte transparente.

4.º Lávase el corte en alcohol limpio y se deja secar sobre papel chupón.

5.º Finalmente, llévase el corte á un porta-objetos donde habrá una gota de bálsamo del Canadá privado de aceite esencial por el calor y recién liquidado á la lámpara. Antes que el bálsamo se solidifique por enfriamiento, se cubre el preparado con una laminilla, oprimiendo fuértemente para repeler el exceso de vehículo.

Al microscopio, se presentarán las lagunillas óseas y conductos calcóforos de color negro, por el aire que contienen (el aire encerrado en el bálsamo exhibe contornos oscuros); y allí donde el aire haya sido rechazado por el vehículo, las laminillas óseas se percibirán correctamente.

Del mismo modo se harán los cortes de diente, con tal de que no interesen el esmalte, tejido que raya el acero. Los cortes longitudinales (que comprenden naturalmente la costra adamantina) no pueden practicarse con la sierra, por lo cual nos vemos obligados á desgastar pacientemente el diente entero en la rueda de afilador, hasta obtener una lámina delgada, que acabará por afinarse y pulirse sobre una piedra fina de peluquero. Para evitar el desgaste de los dedos durante las maniobras citadas, algunos operadores pegan previamente la pieza con bálsamo del Canadá seco á un mango de madera.

Los cortes de hueso y diente pueden también teñirse con los

colores de anilina, obteniéndose bellas imágenes de los conductos calcóforos y osteoplasmas.

Ranvier, que fué el primero en aplicar las anilinas con tal objeto, propuso impregnar las secciones de hueso con azul de anilina y conservarlas en glicerina salada. Pero, desgraciadamente, la preparación se decolora al poco tiempo, y los conductos óseos no se revelan con la claridad y limpieza que en los cortes conservados en bálsamo. Para obviar estos inconvenientes, propusimos nosotros el siguiente método, que proporciona preparaciones muy bellas y absolutamente permanentes (las que conservamos desde hace veinte años están hoy como el primer día).

Procedimiento de coloración del hueso según Cajal.—«Una sección ósea bien afilada en la piedra, se abandona por algunos días en una solución alcohólica saturada de violeta de dalia (cualquier anilina insoluble en agua puede emplearse lo mismo). El corte y el líquido se colocan en un vidrio de reloj á fin de que el alcohol se evapore rápidamente. Cuando el corte está seco, se afila nuevamente (en agua) por ambas caras hasta despojarlo de la costra superficial de color; se deja secar, previo lavado en agua destilada, y se le da transparencia en la esencia de bergamota. La preparación se concluye montando el corte (todavía mojado con la esencia), en el bálsamo del Canadá seco recién derretido al calor. La inclusión en la resina d'Ammar disuelta en la bencina, es también de recomendar, pues no disuelve el violado de dalia. No obstante, nosotros preferimos el bálsamo seco, pues la preparación queda dura y manejable inmediatamente de terminada (1).

Procedimiento de Zimmermann (2).—Este autor, sin tener conocimiento del método arriba citado, ha propuesto un procedimiento de teñido muy semejante al nuestro, á saber: «Delgados cortes de hueso, desengrasados en xilol, se tratan en caliente hasta desecación, por una solución alcohólica saturada de viole-

(1) CAJAL: Tejido óseo. *Boletín Médico-Valenciano*. Enero de 1887.

(2) ZIMMERMANN: Demonstrationen der mikroskopische Präparate. *Verhandlungen des anatomischen Gesellschaft auf dritten Versammlung in Berlin*. 10-12 October, 1889.

ta de metilo. Los cortes desecados se privan de la costra exterior de materia colorante, raspándolos con un escalpelo y aflándolos en la piedra bajo una gota de xilol. Es recomendable calentar el bálsamo antes de cubrir la preparación para aumentar la densidad del vehículo».

Se ve, por lo expuesto, que el método de Zimmermann es substancialmente idéntico al nuestro; pues tanto monta usar una anilina como otra, y lo mismo da aplicar la goma d'Amarr disuelta en bencina que el bálsamo disuelto en xilol; lo esencial es conservar el preparado en un solución resinosa que no disuelva las anilinas. Por lo demás, este procedimiento no proporciona preparaciones tan estables como el nuestro; las que hace un año ejecutábamos nosotros, según las indicaciones de Zimmermann, comienzan á palidecer como sucede indefectiblemente con todo preparado teñido con las anilinas y conservado en ménstruos líquidos.

Procedimiento de teñido con nitrato de plata.—Si un corte afilado de hueso se sumerge primeramente en nitrato de plata, se lava después en agua común, y se expone al sol por algunos minutos, las laminillas óseas aparecerán impregnadas en café claro, y de un matiz más intenso el cemento separatorio de las mismas. Esta reacción, que ya fué notada por nosotros hace muchos años, ha sido primeramente publicada por Matschinsky (1), quien la ha utilizado ventajosamente para el estudio de la textura del hueso (2).

INYECCIONES

Las inyecciones histológicas tienen por objeto hacer perceptibles los conductos vasculares y glandulares, mediante la introducción de materias coloradas coagulables.

(1) MATSCHINSKY: Ueber das normale Wachstum der Röhrenknochen, etcétera. *Arch. f. mikros. Anatomie*. Bd. 39, 1892.

(2) Desde hace más de veinte años, posee el Laboratorio Histológico de la Facultad de Medicina de Madrid, una preparación del hueso ejecutada por este método, y que ha servido á los profesores y ayudantes para la demostración de las laminillas óseas.

En el arte de las inyecciones hay que estudiar dos cosas: las masas de inyección y los instrumentos inyectoros.

Masas de inyección.—Muchas son las propuestas, pero no todas reúnen las condiciones requeridas, que son: ser transparentes, fácilmente solubles, y no trasudar de los vasos. He aquí las dos fórmulas que dan mejores resultados.

Masa de carmín según Ranvier.—Con dos gramos y medio de carmín y unas gotas de agua se hace una pasta, que se disolverá en la menor cantidad posible de amoníaco. Esta disolución se echa gota á gota en otra de cinco gramos de gelatina, disuelta al calor en la cantidad de agua que esta substancia absorba durante algunas horas de hidratación. Hecha la mezcla, no falta más que neutralizar el exceso de amoníaco con una solución de ácido acético; la desaparición del olor amoniacal nos advertirá de la neutralización.

Masa de azul de Prusia.—En el comercio de objetos de micrografía, se halla un azul de Prusia que, á favor de largo tratamiento por el agua destilada, y en virtud de un cambio químico no bien dilucidado, se ha hecho perfectamente soluble en agua. De la solución acuosa saturada de este azul de Prusia, se tomarán 6 ó 7 gramos, que se mezclarán con 5 gramos de gelatina disuelta al calor en su agua de absorción.

La tinta china y el nitrato de plata suministran también masas de inyección aplicables á ciertos casos. Así, cuando se trata de inyectar el hígado, podrán llenarse las arterias con la masa de carmín, las venas con la masa de azul de Prusia y los conductos biliares con una solución de tinta china.

La demostración del endotelio de los capilares exige la inyección de los vasos con una solución de nitrato de plata al 1 por 300, adicionada ó no de gelatina.

Instrumentos inyectoros.—Tales son las jeringas ordinarias usadas en las salas de disección, y las especialmente destinadas á inyecciones finas, construídas según las indicaciones de Robin, Ranvier, Lacaze-Duthiers, etc. Todos estos aparatos (que van provistos de los accesorios indispensables, tales como cánulas, tubos intermediarios con llave, mandrines), dan excelentes resultados con tal que el operador adquiera alguna habilidad.

En ciertos casos, se preferirán los inyectoros de presión continua, entre los cuales debe mencionarse el de Latteux (figura 57), que consiste en una bomba (A), de paredes resistentes, destinada á reservorio de aire, de la cual emergen cinco tubos: dos terminados en los frascos que contienen las masas de inyección (E), uno que aloja al manómetro (A), otro que conduce á la

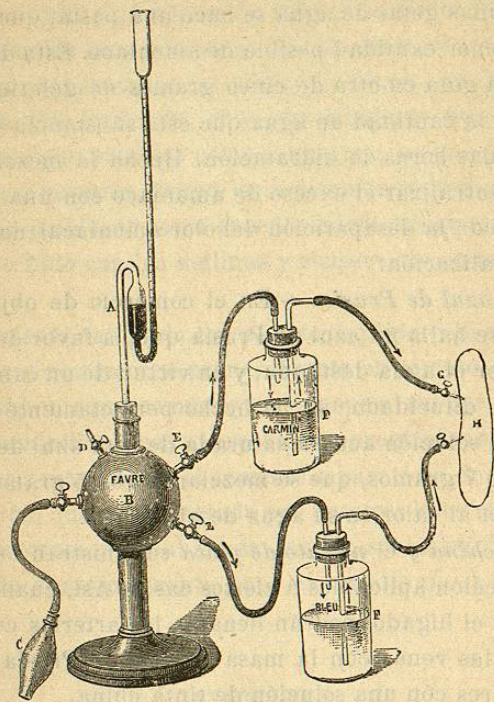


Fig. 57. — Aparato inyector de presión continua: B, reservorio de aire; A, manómetro; C, pera de caoutchouc, donde se hace la presión; E, frascos con las masas de inyección que se mantienen calientes á favor de un baño maría.

pera de caoutchouc, donde se ejerce la presión (C), y el último (D) que sirve para dar acceso al aire exterior en el reservorio. Por el examen de la figura 57, se vendrá fácilmente en conocimiento del mecanismo del aparato; así, la presión ejercida en la pera de caoutchouc se transmite al reservorio, y de éste á la cámara de aire de los frascos, de donde la masa de inyección

se escapa hasta la cánula final, merced al tubo que enlaza ésta con el fondo de la vasija.

En los mamíferos de talla media (perro, gato, conejo, conejillo de Indias), y con más motivo en los de gran tamaño, toda inyección histológica debe ser parcial, tanto para ahorrar materia de inyección, cuanto para asegurar la penetración de ésta en los capilares más finos. Durante la operación, convendrá que el órgano esté sumergido en agua caliente, que se cambiará por fría en cuanto termine la inyección, al objeto de coagular rápidamente la gelatina; evítanse así los escapes de líquido, pudiendo cortarse la pieza sin temor momentos después de la operación.

El endurecimiento se efectuará en alcohol, donde las piezas, reducidas á pedazos no muy grandes (de 1 á 2 cent. cúb.), permanecerán de tres á cinco días. Los cortes serán algo espesos y se conservarán, sin previa coloración, en bálsamo del Canadá. Cuanto más transparente sea la preparación, más limpiamente resaltarán los capilares inyectados.