

1985

080589824

Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE CIENCIAS



Manual de Técnicas Histológicas para
Tejido Nervioso

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Lic. en Biología

P R E S E N T A

Marisela Plascencia Cruz

GUADALAJARA, JAL., 1988

T I T U L O :

" MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA TEJIDO
NERVIOSO ".

A L U M N A :

MARISELA PLASCENCIA CRUZ.

DIRECTOR DE TESIS :

M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES :

AGUSTÍN PLASCENCIA GUTIÉRREZ Y
ESPERANZA CRUZ DE PLASCENCIA,
POR SU AYUDA Y PACIENCIA.

A MIS HERMANOS :

AGUSTÍN, ISMAEL,
MARÍA ESPERANZA,
LUZ ELENA, MAR--
THA ALICIA, ALE-
JANDRO, GABRIELA
Y VÍCTOR MANUEL.

I N D I C E

INTRODUCCION	1
OBJETIVOS	4
CAPITULO I	
GENERALIDADES	5
1.1 La célula	5
1.2 Tejidos	7
CAPITULO II	
APARATOS DE OBSERVACION	14
2.1 Microscopio óptico	14
2.2 Microscopio de polarización	15
2.3 Microscopio de fluorescencia	16
2.4 Microscopio de contraste de fases	16
2.5 Microscopio de interferencia	17
2.6 Microscopio electrónico	17
CAPITULO III	
APARATOS DE CORTE (MICROTOMOS)	18
3.1 Micrótomos para cortes por parafina	18
3.2 Micrótomos para cortes por congelación	19
3.3 Métodos de los cortes	20

CAPITULO IV	
MATERIAL DE LABORATORIO	25
Cristalerfa	25
CAPITULO V	
REACTIVOS	30
5.1 Reactivos fijadores	31
5.2 Reactivos aclaradores	31
5.3 Reactivos opacantes	31
5.4 Reactivos aisladores	32
5.5 Reactivos ablandantes	32
5.6 Reactivos inofensivos	32
5.7 Reactivos colorantes	33
5.8 Reactivos conservadores	33
CAPITULO VI	
FIJACION	35
6.1 Cualidades que debe poseer un fijador	36
6.2 Desventajas de los métodos de fijación	37
6.3 Agentes químicos y combinaciones fijadoras	38
6.4 Mezclas fijadoras	43
6.5 Modo de empleo del fijador	45
CAPITULO VII	
INCLUSION	51
7.1 Líquidos de conservación	52

7.2 Inclusión en parafina	57
7.3 Inclusión en celoidina	61
7.4 Doble inclusión, celoidina-parafina	62

CAPITULO VIII

METODOS GENERALES DE TINCION	63
8.1 Clasificación de los colorantes	63
8.2 Métodos de coloración	65
8.2.1 Coloraciones generales y específicas	65
8.2.2 Coloraciones directas e indirectas	65
8.2.3 Coloraciones progresivas y regresivas	66
8.2.4 Coloraciones simples y combinadas	67
8.3 Impregnaciones metálicas	67
8.4 Mecanismo de las impregnaciones de plata	68
8.5 Conservación de las preparaciones	69
8.6 Tinción monocromática (hematoxilina férrica)	71
8.7 Tinción policromática sin mordiente ni diferenciación (hemalumbre picrocarmín de índigo)	73
8.8 Tinción policromática con empleo de mordiente o diferenciación (tricolorómico de Ramón y Cajal)	74

CAPITULO IX

SISTEMA NERVIOSO	78
------------------	----

CAPITULO X

TECNICAS PARA TEJIDO NERVIOSO 97

DEMOSTRACION DE LOS GRUMOS DE NISSL

Método de Gothard (para cortes en celoidina) 97

PARA LA OBSERVACION DE LOS SOMAS CELULARES Y SUS PROLONGACIONES

Tinción vital o posvital del sistema nervioso
con el azul de metileno (aplicación "in toto"
o en bloque) 98

Método con cromato argéntico, Técnica de Golgi 100

Método con el bicloruro de mercurio (aplicado
en bloque). Técnica de Cox 102

PARA LA OBSERVACION DE LAS NEUROFIBRILLAS

Método con la plata amoniaca, Técnica de
Gros-Schultze 104

Método al proteínato de plata (aplicable a
cortes en parafina). Técnica de Bodian 107

Método con nitrato de plata (aplicación en
cortes) Técnica de Holmes 109

Método de doble impregnación (nitrato de plata-
proteínato de plata). (Aplicable en cortes)
Fitzgerald, 1964. 112

Método de Ramón y Cajal con nitrato de plata
(aplicable en bloque) 115

DEMOSTRACION DE LAS VAINAS DE MIELINA	
Método de Woelcke (1942)	118
Tinción selectiva de las vainas de mielina en degeneración waleriana. Método de Marchi	119
Método de Donaggio	121
MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA NEUROGLIA	
Métodos de Rfo-Hortega (para cortes por congelación)	123
Método de Ramón y Cajal con sublimado de oro para astrocitos protoplasmáticos	128
Método de Golgi-Rfo-Hortega, con cromato de plata, para poner de manifiesto la oligodendroglia (aplicación en bloque)	131
Método de impregnación para células de Purkinje de Cajal	132
Método de impregnación al cloruro de oro de Ruffini, para terminaciones nerviosas	133
Método de la plata hiperfuerte de Llombart, para terminaciones nerviosas y corpúsculos sensitivos	135
APENDICE	139
CONCLUSIONES	154
RESUMEN	156
BIBLIOGRAFIA	157

I N T R O D U C C I O N

Este manual pone a su disposición una serie de técnicas histológicas para tejido nervioso, ya que es frecuente, que para localizar una técnica determinada sea necesario recurrir a una extensa variedad de bibliografía antes de localizar dicha técnica.

La técnica histológica es el conjunto de recursos prácticos que utilizan los histólogos para evidenciar las estructuras de los elementos anatómicos de los organismos. Los recursos prácticos empleados para demostrar las partes más elementales de los organismos son en la actualidad casi innumerables; cada estructura particular requiere el empleo de varios métodos, de aquí que éstos sean muy numerosos. Por lo que en este trabajo sólo se mencionan los más conocidos y más usados para el tejido nervioso.

La selección del material más útil en las circunstancias actuales de la enseñanza de la Biología, es el propósito de este trabajo, y se espera que sea de utilidad práctica en los cursos de histología.

Es evidente que todas las técnicas y métodos desarrollados han hecho aportaciones importantes al conocimiento micrográfico, dependiendo su importancia biológica de la

época y circunstancias en que aparecieron. A través del tiempo las técnicas histológicas han tenido diferentes enfoques. y sufrido modificaciones de acuerdo a las necesidades y nuevos descubrimientos.

Los métodos histológicos e histoquímicos clásicos permiten distinguir la topografía del sistema; la célula nerviosa como cualquier otro tipo de célula, debe estudiarse - por los métodos histológicos que nos permitan ver sus caracteres estructurales. Es preciso aplicar técnicas muy espe- ciales y específicas para la determinación de estructuras - propias de las células nerviosas, como son las neurofibri- llas, los constituyentes de la vaina de mielina, el núcleo, los cuerpos de Nissl (retículo endoplásmico rugoso), mito- condrias y otros. Así también para apreciar la longitud y - prolongaciones celulares de las neuronas, es necesario uti- lizar métodos especiales adaptados a su peculiar morfología.

Por lo tanto, la selección de los métodos a utilizar - dependerá de la región del sistema nervioso en estudio.

La Histología es considerada por los investigadores como una fuente preciosa de información que demuestra además de la estructura, las funciones y sus variaciones.

Por otra parte, la Histología pasa a ser el complemen-

to indispensable de diversas disciplinas descriptivas o experimentales y, además, sus métodos se imponen cada vez que un fenómeno biológico debe ser relacionado con una estructura viva, tejido, célula u organelo.

Se presentan aspectos teóricos que podrían causar dificultad al estudiante que apenas inicia.

Con este manual no pretendemos sustituir la enseñanza oral, ni los tratados de Histoquímica, ni abarcar todas las técnicas, pero sí cierto número de métodos seguros y significativos.

OBJETIVOS

- Tener la información necesaria y actualizada sobre las técnicas histológicas del tejido nervioso.
- Contar con el apoyo técnico necesario para la clase de Histología.
- Apoyar cualquier investigación que se realizará en esta área.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1.- LA CELULA.

El cuerpo consiste en tres elementos; a saber: células, sustancia intercelular y líquidos corporales. Los líquidos corporales incluyen sangre, linfa y líquido tisular (intercelular). La sustancia intercelular es el material que está entre las células y les brinda sostén e incluye fibras formadas de la índole de colágena y elastina y material amorfo ó sustancia fundamental.

La célula es la unidad estructural y funcional de vegetales y animales, es el fragmento de vida más sencillo que puede vivir con independencia. Los procesos de todo el organismo son la suma de las funciones coordinadas de sus células constitutivas. Las células de distintas plantas y animales, y de diferentes órganos en una sola planta o animal, presentan gran variedad de tamaños, formas, colores y estructuras internas; pero todas tienen en común ciertas características. Cada célula, rodeada por una membrana plasmática, contiene un núcleo y un buen número de organelos subcelulares -mitocondrias, retículo endoplásmico granuloso, retículo endoplásmico liso, aparato de Golgi, lisosomas, centriolos, cilios y flagelos. Así como inclusiones; éstas com

prenden productos metabólicos y sustancias ingeridas, muchas de las cuales se presentan pasajeraamente en el citoplasma y, si bien suelen considerarse no vivientes, muchas de ellas probablemente sean indispensables para el metabolismo celular normal.

Los cuerpos de vegetales y animales superiores están organizados en formaciones de complejidad creciente; las células se disponen en tejidos, los tejidos en órganos y los órganos en sistemas.

1.2.- TEJIDOS.

Una de las principales tendencias en la evolución de los vegetales y animales ha sido la especialización y división del trabajo entre las células componentes. Las que forman el organismo del árbol o del hombre no son todas iguales; cada una se especializa en ciertas funciones. Esta especialización permite que las células funcionen con más eficacia, pero significa también la dependencia mutua entre las partes del organismo; la lesión o destrucción de una parte del cuerpo puede significar muerte total del mismo. Sin embargo, las ventajas de la especialización son superiores a sus desventajas.

Un tejido puede definirse como un grupo o capa de células de la misma especialización que, en conjunto, se distinguen por sus funciones especiales. El estudio de la estructura y disposición de los tejidos se llama Histología. Cada variedad de tejido consta de células con tamaño, forma y disposición característicos. Los tejidos pueden estar formados por otros elementos además de las células vivas; por ejemplo, la sangre y el tejido conectivo contienen sustancias inertes entre las células. A pesar de la complejidad de nuestro organismo, existen sólo cuatro tipos básicos de tejidos; epitelial, conjuntivo, muscular y nervioso. Estos cuatro tipos de tejidos no existen aisladamente, sino que -

se asocian unos con otros en proporciones variables para formar los diferentes órganos y sistemas del organismo animal.

TEJIDOS EPITELIALES:

El tejido epitelial está constituido por células generalmente poliédricas, yuxtapuestas, entre las cuales hay es casa sustancia intercelular. Una de las propiedades de los tejidos epiteliales es la capacidad de cohesión entre sus células, las cuales forman capas celulares continuas que revistan la superficie y las cavidades del cuerpo.

Las células epiteliales derivan de las tres hojas germinativas. La mayor parte de las células epiteliales que recubren la piel y algunas cavidades naturales (boca, ano y fosas nasales) son de origen ectodérmico. El epitelio que reviste casi todo el tubo digestivo y el árbol respiratorio deriva del endodermo; las glándulas del aparato digestivo, como el páncreas y el hígado, también están formadas por reepitelio de origen endodérmico. La mayoría de los epitelios restantes tienen origen mesodérmico, como en el riñón.

Los epitelios pueden tener una o varias de las siguientes funciones: protección, absorción, secreción y sensación. Se dividen en seis subclases, de acuerdo con su forma y función.

- Epitelio plano.
- Epitelio plano o escamoso estratificado.
- Epitelio cuboide.
- Epitelio cilíndrico.
- Epitelio sensitivo.
- Epitelio glandular.

TEJIDO CONJUNTIVO.

Los tejidos conjuntivos tienen un origen mesodérmico y se desarrollan a partir del mesénquima, que es un tejido em brionario caracterizado por poseer células con prolongaciones, sumergidas en abundante sustancia intercelular amorfa, poco viscosa. Las células mesenquimatosas poseen núcleos - ovoides, con cromatina fina.

El tejido conjuntivo se caracteriza morfológicamente - por presentar diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por ellas. La riqueza en material intercelular es una de sus características - más importantes. Este material está representado por una - parte con estructura microscópica definida, las fibras conjuntivas, y por otra parte no estructurada, la sustancia - fundamental amorfa. Bañando las células, las fibras y la - sustancia amorfa, hay una pequeña cantidad de líquido, llamado plasma intersticial. Las fibras de tejido conjuntivo -

son de tres tipos: colágenas, elásticas y reticulares.

Los tejidos de este grupo desempeñan las funciones de sostén, relleno, defensa y nutrición. Las cápsulas que revisten los órganos y la malla tridimensional interna que soporta sus células están constituidas por tejido conjuntivo. Este forma también los tendones, ligamentos y el tejido areolar que llena los espacios entre los órganos. Los tejidos óseo y cartilaginoso, responsables principales del sostenimiento del cuerpo humano, son variedades del conjuntivo.

El tejido conjuntivo contribuye a la defensa del organismo por poseer células fagocitarias y células productoras de anticuerpos. Las primeras engloban partículas inertes y microorganismos que penetran en el organismo; las segundas, sintetizan proteínas específicas llamadas anticuerpos, capaces de combinarse con proteínas extrañas. Al combinarse con las proteínas de ciertas bacterias y virus, o con las toxinas bacterianas, los anticuerpos pueden destruir la actividad de estos elementos, haciéndolos inocuos para el organismo.

El papel que desempeña el tejido conjuntivo en la nutrición deriva de su íntima asociación con los vasos sanguíneos. Tanto las sustancias nutritivas transportadas por la sangre, como los productos de desecho del metabolismo que -

conducidos a los órganos de eliminación, atraviesan el conjunto que envuelve los capilares.

TEJIDO MUSCULAR.

El tejido muscular es el responsable de los movimientos corporales. Está constituido por células alargadas -las fibras musculares-, caracterizadas por la presencia de gran cantidad de filamentos citoplasmáticos específicos.

Las células musculares tienen origen mesodérmico y su diferenciación ocurre principalmente por un proceso de alargamiento gradual, con síntesis simultánea de proteínas filamentosas.

De acuerdo con sus características morfológicas y funcionales, se pueden diferenciar en los mamíferos tres tipos de tejido muscular.

El músculo liso, formado por aglomerados de células fusiformes que no poseen estrías transversales. Sus contracciones son lentas y no están sujetas a control voluntario.

El músculo estriado esquelético, formado por haces de células cilíndricas muy largas y multinucleadas, que presentan estrías transversales. Tiene contracción rápida y

gorosa y sujeta a control voluntario.

El músculo estriado cardíaco, que también presenta estrías transversales, está formado por células alargadas y ramificadas, que se unen longitudinalmente a las células vecinas, formando una red. Estas células presentan contracción involuntaria, vigorosa y rítmica.

Las células musculares están tan diferenciadas y tienen características tan peculiares que sus componentes han recibido nombres especiales. La membrana se llama sarcolema; el citoplasma (con excepción de las miofibrillas), sarcoplasma; el retículo endoplasmático, retículo sarcoplasmático; y las mitocondrias, sarcosomas.

TEJIDO NERVIOSO.

El tejido nervioso está compuesto de células llamadas neuronas, especializadas en conducir impulsos nerviosos electroquímicos. Una neurona posee una parte dilatada, el cuerpo celular, dentro del cual encontramos el núcleo, y dos fibras nerviosas delgadas (a veces más), parecidas a pelos que se extienden a partir de dicho cuerpo celular. Las fibras nerviosas están formadas por citoplasma y cubiertas por membrana plasmática, varían de ancho desde unos cuantos micrones hasta 30 ó 40 micrones, y de longitud desde un mi-

1 metro o dos hasta más de un metro. Las hay, en el hombre, que van desde la médula espinal hasta el extremo del brazo o la pierna, con más de un metro de longitud. Las neuronas, están unidas en cadenas, lo que permite el envío de impulsos sobre distancias considerables en el organismo. Las fibras nerviosas del sistema nervioso periférico están rodeadas de una vaina celular, el neurilema. En algunas fibras nerviosas estas células secretan un envoltorio espiral de material aislante grasoso, la mielina. Entre las células de neurilema hay espacios, los nodos de Ranvier donde la fibra no está cubierta de mielina.

Se reconocen dos tipos de fibras nerviosas, los axones y dendritas, según el sentido en el cual conducen con normalidad el impulso nervioso: los axones lo hacen alejándose del cuerpo celular, y las dendritas hacia el cuerpo celular. La unión entre el axón de una neurona y la dendrita de la siguiente se llama sinapsis. El axón y las dendritas en realidad no se tocan en la sinapsis; hay un pequeño intervalo entre ambos.

CAPITULO II

APARATOS DE OBSERVACION

La Histología es la parte de las ciencias biológicas - ocupada en el estudio de los tejidos de los seres vivos.

Para poder encarar el estudio organizado de los tejidos, el investigador debe someter el material que desea analizar a una serie de procedimientos.

Los siguientes recursos prácticos forman la técnica - histológica utilizada en el estudio de los elementos constitutivos de los tejidos: Aparatos, material de laboratorio - que incluye cristalería, accesorios y reactivos y los métodos o técnicas histológicas.

Entre los múltiples aparatos que se utilizan actualmente para el estudio de la Histología, aquellos que se hacen indispensables para la enseñanza y la investigación son los aparatos de observación y de corte.

2.1.- MICROSCOPIO OPTICO.

El microscopio puede ser simple cuando consta de una sola lente biconvexa o planoconvexa, dispuesta de tal suerte que suministre una imagen virtual derecha y más grande -

que el objeto, o puede ser compuesto cuando está constituido por un sistema de lentes separadas que combinan las dos condiciones en que las lentes dan imágenes amplificadas, es decir, una imagen real invertida y amplificada, más una imagen derecha y más grande en relación a la primera.

Todo microscopio compuesto comprende una parte mecánica y una parte óptica. Ambas se complementan y deben ser lo más perfectos posibles para obtener el mejor rendimiento.

La parte mecánica comprende el pie o estativo, el brazo o columna la platina y el tubo principal.

La parte óptica consta de espejo o prisma que refleja luz de la lámpara, condensador, objetivos y oculares.

2.2.- MICROSCOPIO DE POLARIZACION.

Para fines prácticos un microscopio de campo claro, puede servir como microscopio de polarización si se equipa adecuadamente con dos filtros de material polaroide: Uno que encaja en el anillo del condensador y que quede cercano a la fuente luminosa y otro que se ajuste al ocular del microscopio y que quede cercano al objetivo. Al interponer estos filtros en planos de polarización perpendiculares entre sí, se obtiene un campo de luz polarizada que varía -

en presencia de algunos materiales que destacan por su brillantez y coloración particular, los materiales que producen este efecto se dice que son ópticamente activos.

2.3.- MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA.

En un microscopio común puede aplicarse la fluorescencia mediante la inclusión adecuada de una fuente de iluminación ultravioleta, un condensador con lente de cuarzo y entre el objetivo y el ocular, los filtros necesarios para eliminar la luz ultravioleta que puede pasar al sistema. La fluorescencia que poseen los cuerpos puede ser natural ó inducida por medio de fluorocromos.

2.4.- MICROSCOPIO DE CONTRASTE DE FASES.

Es el sistema óptico de mayor utilidad en el estudio del material vivo; para la histología representa la observación de la estructura real de las células eliminando las alteraciones que en cierta medida conllevan el material fijado y teñido. Además unifica la forma y la función celular que es tan importante en la interpretación histológica.

Este microscopio se basa en la introducción de una diferencia de fase de $\frac{1}{4}$ de longitud de onda, entre la luz directa y la difractada que pasan a través del objetivo. Esto

convierte las diferencias de refractividad en diferencias de intensidad de la luz apreciable por el ojo. En la práctica esto se logra mediante dos dispositivos anulares que se colocan uno en el condensador y otro en el objetivo y que producen el desfase en λ de longitud de onda. Se debe utilizar luz monocromática, de preferencia verde.

2.5.- MICROSCOPIO DE INTERFERENCIA.

Este sistema trabaja produciendo una interferencia entre dos campos, uno de la fuente de luz y otro de la fuente de luz más el objeto, haciéndose posible variar la diferencia de fases entre los dos campos y aumentar así considerablemente el contraste. Puede obtenerse interferencia policromática si se adiciona un lámina de refracción policromática.

2.6.- MICROSCOPIO ELECTRONICO.

Este se basa en una fuente de electrones producida por un cañón de tungsteno, y en el uso de dispositivos electrostáticos que desvían los electrones como lo hacen las lentes con rayos luminosos, y que permiten ampliar grandemente la imagen de un objeto en pantalla fluorescente. Este microscopio no permite la observación de material vivo, sino convenientemente fijado y reducido a finos cortes de 1/50 de micrómetro de espesor.

CAPITULO III

APARATOS DE CORTE (MICROTOMOS)

Para hacer el examen microscópico de los tejidos, es necesario que éstos ofrezcan transparencia, lo cual sólo puede lograrse mediante películas muy delgadas de tejido como las que se obtienen en algunos cultivos de tejido dissociando el tejido en sus elementos componentes; o reduciendo a cortes sumamente delgados. Muy numerosos son en la actualidad los modelos de micrótomos usados en los laboratorios, pero considerando el mecanismo mediante el cual impulsan el objeto seccionable casi todos caen en la categoría de micrótomos de deslizamiento. Estos micrótomos tienen variaciones en precisión, automatismo, tamaño, etcétera y pueden ser muy específicos de acuerdo al material de inclusión.

3.1.- MICROTOMOS PARA CORTES POR PARAFINA.

Estos micrótomos constan en general de una sólida base y soportes verticales; uno de éstos corre sobre un carril y lleva la pieza conductora de la navaja que puede fijarse mediante tornillos en las más variadas posiciones; otro soporte sostiene las piezas que contiene la portaplátina y que tiene un mecanismo de ascenso y descenso esta pieza está unida a una manivela que permite regular estos movimientos, la pinza portaplátina puede deslizarse horizontalmente y

paralela a la navaja mediante un tornillo micrométrico. Como la platina asciende automáticamente al resbalar paralela a la navaja, pueden hacerse cortes sucesivos del objeto seccionable regulando el grosor con el tornillo micrométrico - que se fija en el número de micras deseado.

3.2.- MICROTOMOS PARA CORTES POR CONGELACION.

Los modelos por demás muy variados son sencillos y económicos además, aunque el micrótopo no sea especial para congelación puede hacersele adaptaciones para que funcione como tal, sobre todo a micrótopos que sirven para cortar mediante inclusión en parafina y celoidina.

En términos generales el aparato consta de una base - que puede sujetarse fácilmente al borde de una mesa; sobre esta base se encuentran las otras piezas que son: Una platina donde se coloca el bloque que se va a seccionar; relacionada y por debajo de esta platina encontramos una cámara pulverizadora unida al tanque que contiene el gas, el cual es independiente del micrótopo y mediante tubos y juego de llaves hace pasar el ácido carbónico instantáneamente hasta el pulverizador; la otra pieza indispensable es la navaja que mediante un soporte que le brinda giro en arco de círculo - ataca perpendicularmente a la pieza seccionable.

3.3.- METODOS DE LOS CORTES.

El método de los cortes comprende el conjunto de operaciones que deben realizarse para conseguir secciones delgadas y transparentes de un órgano o tejido. La importancia de este método es tan grande, que a menudo hace superfluos todos los demás. Así por ejemplo, la estructura de los tejidos nervioso, glandular, cartilaginoso, óseo, epitelial, et cetera, 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 a las maniobras necesarias para la obtención de finas secciones: - cuando los tejidos son blandos, y cuando son excesivamente duros, casi pétreos.

Cortes en tejidos blandos: Para obtener de un tejido -blando cortes suficientemente delgados, que consientan la -observación al microscopio, es preciso darle una consistencia apropiada. Los fijadores e indurantes aumentan la dureza de los tejidos blandos; pero, salvo en muy contados casos, no les dan la consistencia necesaria, que sólo se alcanza por la congelación ó la inclusión.

Proceder de la congelación: La congelación se obtiene por la evaporación del anhídrido carbónico líquido en el micrótopo. La serie de operaciones necesarias para cortar de esta manera, son las siguientes:

Fijación: Es conveniente y; en la mayor parte de los casos necesaria; sin ella, muchas de las materias que integran los tejidos se mantienen en estado semisólido, disgregándose los cortes al descongelarlos. Se hace de preferencia en disolución de formalina del 10 al 20 por 100, de 24 horas en adelante; pero también piezas que hayan sido fijadas en otros líquidos (alcohol, etc.), pueden ser cortadas por congelación, si se tienen en agua unas horas para que se laven e hidraten.

Lavado: Por pocos minutos, en agua para extraer el exceso de formol.

El bloque destinado a las secciones (que deberá tener cuando más medio centímetro de espesor) se coloca en la plataforma del micrótopo de papel humedecido.

La congelación se obtiene abriendo breves momentos, a intervalos, la llave de salida del gas; pues como, aunque rápida no es instantánea, hay que dar tiempo para que el frío producido en la plataforma se propague a través de la

pieza; se apreciará ésto observando el cambio de color de la porción congelada.

Cortes: Cuando la congelación ha llegado a la parte superior, se comienza a cortar; si el bloque no está suficientemente duro, saldrán desgarrados los cortes, debiéndose congelar más; si tienden a arrugarse, la congelación es excesiva, y esperando a que se caliente algo o ayudándose con el calor de la mano, se llegará pronto al punto debido, obteniéndose entonces rápidamente buen número de cortes.

Los cortes son trasladados con los dedos o con un pincel, sin comprimirlos, a una vasija con agua o formalina al 4%, donde se extienden y se conservan hasta su destino ulterior (observación directa, coloración, etc.).

La congelación va siendo cada vez más empleada para la obtención de cortes histológicos, por su rapidez y economía; solamente en los tejidos demasiado duros ó en tejidos que tengan grandes huecos o una estructura areolar, será conveniente la inclusión que, por otra parte, consiente obtener y manejar cortes más finos.

Cortes en tejidos duros: El hueso y el diente así como el cartilago en vías de osificación, pueden seccionarse, ya en su estado natural, ya previo reblandecimiento, por los -

reactivos ablandantes o descalcificantes.

La obtención de cortes del diente y hueso con su consistencia natural, se logra utilizando un procedimiento análogo al usado por los petrógrafos para la sección de las rocas.

Los pasos a seguir son: Obtención con la sierra pelo de relojero un corte grosero que comprenda, de ser posible, todo el espesor de la diáfasis de un hueso largo (radio, cúbito, fémur).

Sobre una piedra arenisca a rueda de vaciador se debata el corte por ambas caras, hasta que presente un espesor de menos de medio milímetro.

El corte se lleva a una piedra fina de afilar, como la usada por un peluquero, en la cual, y mojada con el alcohol se pule y adelgaza hasta que resulte transparente.

Lávese el corte en alcohol limpio y déjese secar sobre papel secante. Del mismo modo, se harán los cortes de diente, con tal de que no interese el esmalte, tejido que ralla el acero. Los cortes longitudinales (que comprenden, naturalmente la costra adamantina) no pueden practicarse con la sierra, por lo cual nos vemos obligados a desgastar pacien-

temente el diente entero en la rueda del afilador, hasta ob tener 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 a un mango de madera.

CAPITULO IV
MATERIAL DE LABORATORIO
(CRISTALERIA).

El material de cristalería más común y su empleo en la técnica histológica puede ser resumido en la siguiente lista:

- Vasos de precipitado graduados y no graduados.

Se usan para colocar sustancias que no sean muy volátiles, concentradas o corrosivas, por ejemplo agua, alcohol diluido, etcétera. Los hay de muchas capacidades, los más empleados varían entre 40 y 500 cc. Pueden usarse también como recipientes para residuos, para calentar ligeramente algunas sustancias. Existen pequeños vasos de 10 cc. especiales para reactivos argénticos mejor conocidos como pocillos de Río-Hortega.

- Matraces graduados y no graduados.

Se usan sobre todo para la preparación de reactivos, como colorantes, alcoholes, etcétera, y en general para diluciones o mezclas; es frecuente que una vez preparado el reactivo se desocupen los matraces y las sustancias se pasen a frascos tapados, donde se conservan. Se usan también para calentar sustancias, incluso hasta abullición tapando o no la boca del matraz, según el desprendimiento de vapores.

- Probetas y Pipetas graduadas.

Se emplean en la elaboración de reactivos y soluciones para medir con precisión los volúmenes de líquidos que se requieren.

- Cajas de Petri. Cajas y vasos de Koplín.

Se emplean sobre todo en la elaboración de las técnicas de tinción, en ellas se depositan las diferentes sustancias en el orden establecido por la técnica y allí se colocan los cortes libres en cuyo caso se usan cajas de Petri, o adheridos al portaobjetos, utilizándose entonces las cajas o vasos de Koplín. Las cajas de Petri se utilizan en especial para teñir cortes por congelación o inclusión, pero uno por uno; las cajas y vasos de Koplín para teñir cortes en serie, por inclusión o frotis. Las cajas de Petri profundas y no profundas; las primeras suelen usarse para el xilol o la creosota, para facilitar el montaje de los cortes en el portaobjetos y en general para baños abundantes o por largo tiempo; las segundas se utilizan en general para baños escasos o de poco tiempo.

- Frascos goteros.

Estos frascos son útiles para guardar reactivos no corrosivos que se emplean en pequeñas cantidades y se adicionan por goteo.

- Frascos con tapón esmerilado para reactivos.

Se utilizan sobre todo para guardar reactivos, en especial los muy corrosivos, pues frecuentemente los vapores destruyen los tapones que no son de vidrio, estos frascos pueden ser transparentes o de color ámbar; los primeros para reactivos que no sufren cambios por la acción de la luz, y los segundos cuando sucede el caso contrario.

- Cristalizadores.

Son ideales para efectuar baños sobre otros recipientes que contengan sustancias a las que se desea elevar o bajar la temperatura, o simplemente, conservar a ciertas condiciones de temperatura o también suelen emplearse para seleccionar y enjuagar el material obtenido de las disecciones.

- Vidrios de reloj.

Se emplean para hacer pequeñas mezclas, enjuagues o tintaciones de pocos cortes o para cubrir recipientes, sobre todo vasos de precipitado y pocillos de Rfo-Hortega. Los hay de varios tamaños para adaptarse a la boca del recipiente.

- Frascos de boca ancha con tapón de rosca.

Se emplean con frecuencia, sobre todo en la enseñanza, para realizar la fijación de los órganos y para la prepara-

ción de las piezas de platino que van a ser incluidas en pa rafina; en estos frascos, los estudiantes hacen sus deshi-- drataciones, aclaramientos, transparentaciones, etcétera. - En los laboratorios de investigación o técnicas de rutina - son menos empleados, puesto que los pasos previos a la in- clusión suelen hacerse en un procesador automático de teji- dos.

- Cubreobjetos y Portaobjetos.

Los cubreobjetos y los portaobjetos son láminas delga- das de cristal, libres de burbujas y asperezas, que sirven para montar y cubrir los preparados destinados a la observa- ción microscópica. El tamaño y delgadez de estas laminillas varía para adaptarse a las dimensiones de los preparados; - en general los portaobjetos miden 75 mm. de largo por 25 mm de ancho con espesor poco variable, y los cubreobjetos más usados, de 22 por 22 mm ó 22 por 40 mm, con un espesor en- tre 7 y 30 centésimas de milímetro. En el mercado, el espe- sor se denomina con los números 1, 2, 3, correspondiendo el número 1 a los más delgados, que son los que se recomiendan para trabajos de investigación y para la aplicación de fuer- tes aumentos. Sobre el portaobjetos se montan los prepara-- dos, frescos o fijados y teñidos, cubriéndose o no con un - reactivo conservador. Sobre ellos se realizan también los - métodos de tinción en los cortes, que mediante un adherente fueron montados previamente en ellos, igualmente si se tra-

ta de frotis o extendidos. Los cubreobjetos son delgadísimos cristales que están destinados a cubrir las preparaciones ya montadas en el portaobjetos, y embebidas o no en el conservador; su función principal radica en hacerlas planas y manejables bajo el microscopio y protegerlas de cuerpos extraños.

- Embudos.

Son elementos indispensables en la preparación de muchos reactivos entre ellos los colorantes. El empleo de los embudos está íntimamente ligado al uso de papel filtro o algodón de vidrio, ya que es mediante el ensamble de estos dos objetos que se hace el filtrado de las sustancias, de las cuales se desea eliminar precipitados, residuos, impurezas, etcétera.

- Otro material.

Aunque no se trata precisamente de material de cristalería mencionaremos algunos accesorios indispensables para la elaboración de las técnicas histológicas. Estos son: ganchos de vidrio, agitadores, pinceles, agujas de disección, pinzas, etcétera, necesarios para manejar los cortes; y etiquetas, charolas y cajas para manejar las preparaciones.

CAPITULO V

REACTIVOS

Se denominan reactivos a las sustancias que producen en los tejidos modificaciones físicas o químicas, en virtud de las cuales puede adquirirse información acerca de la estructura y relación de sus elementos anatómicos.

Existen tejidos como el conectivo, nervioso, etcétera, cuyos elementos carecen de color o bien tienen escaso contraste en sus índices de refracción, lo que dificulta, bajo el microscopio, la determinación de ciertas estructuras por la homogeneidad que ofrecen al observador.

Este hecho, entre otros, ha propiciado que los reactivos sean ampliamente usados, debido a su poder revelador. Además la mayor parte de los tejidos son gruesos y opacos, y es necesario reducirlos a finos cortes; para ello se hacen indispensables operaciones previas a la fijación y posteriores de coloración y conservación.

Son múltiples los reactivos empleados, y una manera práctica de clasificarlos es de acuerdo a las modificaciones que provocan en los tejidos. Así tenemos reactivos fijadores, aclaradores, opacantes, aisladores, ablandadores, inofensivos, colorantes y conservadores.

5.1.- REACTIVOS FIJADORES.

Estos reactivos detienen o minimizan las alteraciones post-mortem por precipitación o coagulación de las proteínas celulares; al mismo tiempo endurecen los tejidos preparándolos para su posterior manipulación. Los fijadores más usados son el alcohol, ácido crómico, acético, pícrico, ósmico, cloruro de platino, bicloruro de mercurio y formol, - este último diluido al 10%, es el más empleado. Pueden usarse solos o mezclados en distintas proporciones utilizando así las ventajas de varios de ellos.

5.2.- REACTIVOS ACLARADORES.

Los reactivos aclaradores actúan borrando o moderando los índices de refracción de los elementos tisulares. Mientras menos contraste más claros aparecerán los preparados y más fácil será la apreciación de los elementos coloreados.- Entre los más usados tenemos esencias o aceite de clavo, de cedro o de orégano, xilol y creosota.

5.3.- REACTIVOS OPACANTES.

Los reactivos opacantes actúan de modo contrario a los reactivos aclarantes, oscureciendo el contorno de células y robando transparencia a la preparación. Este efecto es útil cuando se observan células sueltas, filamentos libres y superficies que exhiben expansiones delicadas. Entre estos -

agentes tenemos el aire, alcohol, eter, agua corriente.

5.4.- REACTIVOS AISLADORES.

Estos reactivos actúan liberando los elementos celulares de los tejidos o, al menos, facilitando su disociación mecánica. Los más usados son el ácido nítrico al 25%, potasa al 40%, alcohol al 30%, ácido sulfúrico diluido, ácido pícrico a saturación.

5.5.- REACTIVOS ABLANDANTES.

Estos reactivos se usan para reblandecer los tejidos - excesivamente duros, como hueso y diente en virtud de que - disuelven las sales de calcio. Entre estos reactivos los - más usados son los ácidos nítrico, tricloroaceticocrómico, - clorhídrico y pícrico, todos en soluciones más o menos di- - luidas a excepción del pícrico, que se emplea a saturación.

5.6.- REACTIVOS INOFENSIVOS.

Los reactivos inofensivos, también llamados soluciones o sueros fisiológicos, son aquellos líquidos que alteran po- - co o nada la forma y vitalidad de los elementos celulares y con este fin se utilizan durante el examen en vivo del hom- - bre y tejidos. Entre estos líquidos los más usados son solu- - ciones salinas como el líquido de Ringer, de Locke, de Bizo- - zero, etcétera, o simplemente cloruro de sodio 0.9 g. di---

suelto en 100 cc. de agua destilada. Son también ventajosas las soluciones naturales, como el humor acuoso, y sobre todo el plasma sanguíneo no coagulado.

5.7.- REACTIVOS COLORANTES.

Los reactivos colorantes son sustancias que permiten distinguir detalles estructuralmente invisibles, o poco aparentes al microscopio, por su capacidad de fijarse en ciertas partes de los tejidos con matices de variada intensidad. Estas sustancias son de dos tipos generales: Colorantes naturales, extraídos de productos animales o vegetales, como el carmín, la hematoxilina, la orceina y la safranina. Y colorantes artificiales, conocidos como colorantes de anilina, colorantes de carbón o colorantes sintéticos. Aquí podemos anotar también los reactivos impregnadores, que tienen la propiedad de teñir selectivamente, pero a condición de sufrir en presencia del tejido una descomposición. Las sustancias que actúan así son el ácido ósmico, el nitrato de plata amoniacal, el cloruro de oro y el bicromato de potasio puesto en presencia de sales de plata o de mercurio.

5.8.- REACTIVOS CONSERVADORES.

Los reactivos conservadores son aquellos que protegen a los tejidos de la putrefacción, conservan el color y evitan cambios que pudieran sufrir las preparaciones histológicas.

cas. Estos reactivos algunas veces elimina el agua del preparado, evitando todo crecimiento bacteriano, otras veces - sustituyen el agua por materias resinosas imputrecibles. En tre estos conservadores tenemos la glicerina, el bálsamo - del Canadá, resinas sintéticas, gelatina, licor de Apathy y licor de Ferrant.

CAPITULO VI

FIJACION

La fijación tiene como principales finalidades el evitar la putrefacción y la autólisis, ya que son las causas de las rápidas modificaciones que experimentan las células, al morir.

En la autólisis hay que evitar la acción de las enzimas celulares, ya que cuando cesa la actividad viva de la célula, en vez de ayudar al proceso de síntesis protoplásmica actúan de manera inversa. Hay que evitar también el crecimiento de bacterias que destruyen los tejidos, dando lugar al fenómeno de putrefacción.

Para evitar ésto, es preciso someter a los tejidos a la acción de sustancias que detengan o reduzcan al mínimo estas alteraciones. Esto se consigue con reactivos que solidifiquen, por coagulación o precipitación, las sustancias protéicas celulares; al mismo tiempo, esta acción endurece los tejidos dándoles una consistencia adecuada para su tratamiento posterior.

No existe un fijador universal. Todas las combinaciones tienen sus ventajas y sus inconvenientes, por lo que hay numerosos métodos de fijación. Sin embargo es convenien

te considerar de manera general algunos de los problemas - que pueden presentarse.

Una pieza que haya sido correctamente fijada puede en determinados aspectos alterarse si las manipulaciones que - siguen a la fijación han sido efectuadas con poco cuidado.

La acción del fijador debe detenerse en el momento preciso, casi puede asegurarse que no hay ninguna mezcla fija-dora que sea un líquido de conservación adecuado.

No debe olvidarse, que un defecto de fijación no puede ser subsanado; que es inútil pretender hacer un estudio histológico de un material mal fijado.

6.1.- CUALIDADES QUE DEBE POSEER UN FIJADOR.

Penetración: debe penetrar lo antes posible hasta el - interior de la pieza. Ciertos fijadores poco penetrantes como el alcohol fijan la porción más superficial, por lo que las piezas deben ser pequeñas; de lo contrario su parte central se descompondría antes que llegue el fijador.

Conservación: debe conservar la estructura de la pieza lo más semejante posible a los tejidos vivos. Hay algunos - fijadores, como el formol poco concentrado, que alteran la

estructura de los tejidos vivos. Esto debe evitarse y ser -
tenido en cuenta cuando se elige la solución.

Endurecimiento: debe producirse rápidamente para evi--
tar las deformaciones que trae consigo la descomposición -
química.

Mordiente: vale decir que debe favorecer una posterior
coloración.

Insolubilizar los elementos que constituyen los teji--
dos: por ejemplo, si deseamos estudiar las grasas de un te-
jido u órgano, no podemos fijar jamás en alcohol, porque és
te solubiliza y elimina todos los lípidos.

Un buen fijador no debe arrugar ni encoger los tejidos,
no los debe ennegrecer, ni dejarlos quebradizos o frágiles;
debe dejarlos aptos para ser teñidos selectivamente.

6.2.- DESVENTAJAS DE LOS METODOS DE FIJACION.

Los métodos de fijación, desde el punto de vista histo
químico, tienen numerosas objeciones, siendo las principa--
les:

Pérdida de sustancias solubles, por ejemplo, lípidos -

en fijadores disolventes de grasas y proteínas, polisacáridos y materiales inorgánicos en fijadores acuosos.

Desplazamiento de algunos constituyentes celulares por difusión dando artefactos de arrastre, por ejemplo agregación de pequeñas partículas, y artefactos de fijación, por ejemplo, apilotamiento de ácidos nucleicos en el núcleo.

Desnaturalización de proteínas con alteración de sus propiedades físicas.

Alteración química de los grupos reactivos de proteínas, y destrucción de enzimas.

6.3.- AGENTES QUÍMICOS Y COMBINACIONES FIJADORAS.

Los tejidos son tratados por una solución de un solo compuesto químico o por una mezcla de varios compuestos químicos, siendo este último caso el más frecuente. Los ingredientes que forman un fijador compuesto se escogen de manera que sus cualidades se complementen.

Agentes fijadores: Las sustancias químicas empleadas normalmente en la preparación de fijadores combinados son:- Alcohol etílico, Formaldehído (indebidamente llamado formol) Acido acético, Acido pícrico, Acido crómico, Bicromato potásico

sico, Cloruro de mercurio o sublimado, Tetróxido de osmio - (indebidamente conocido como ácido ósmico).

Entre estas sustancias, algunas precipitan las protefnas, y otras nó.

Precipitan: Alcohol etílico, ácido pícrico, ácido crómico y sublimado.

No precipitan: Formol, bicromato potásico y ácido ósmico. El ácido acético posee una débil acción precipitante de las nucleoprotefnas.

Propiedades de los principales agentes fijadores (según Baker, 1956).

Alcohol etílico (concentración óptima del 70 al 100%).

Reductor, por lo que es incompatible con el bicromato potásico y con el tetróxido de osmio.

Precipita enérgicamente las protefnas, pero casi no insolubiliza las nucleoprotefnas.

Desnaturaliza las protefnas, sin adicionar átomos.

Disuelve determinados lípidos complejos, precipita el glucógeno sin fijarlo.

Provoca una fuerte contracción y endurece.

Prepara mal la tinción.

Formol (concentración óptima del 4 al 10%).

Reductor, por lo que teóricamente tiene las mismas incompatibilidades que el alcohol; así tenemos que, con respecto al bicromato, la reacción es tan lenta que casi no se ha iniciado cuando la fijación ya ha terminado.

No precipita las proteínas, pero adiciona átomos a sus moléculas.

Fija los lípidos complejos, por lo que conserva bastante bien las mitocondrias y el aparato de Golgi.

No contrae las estructuras, pero sí las endurece.

Acido acético (concentración óptima 0.3 al 5%).

No fija las proteínas citoplasmáticas, pero precipita las del núcleo.

Es buen fijador de los cromosomas.

Destruye el condrioma.

Provoca hinchamiento de los tejidos y no los endurece.

Acido pícrico (solución saturada):

Precipita las protefnas, formando picratos de protefna.

Contrae considerablemente los tejidos sin endurecerlos.

Despolimeriza los ácidos nucleicos.

Acido crómico (concentración óptima del 0.5 al 2%).

Fuerte oxidante, por lo que es incompatible con el for-
mol y el alcohol.

Precipita toda clase de protefnas.

Facilita las tinciones con colorantes básicos.

Debe eliminarse totalmente, con abundante agua.

Bicromato potásico (concentración óptima del 1 al 2%):

Oxidante, por lo que es incompatible con el alcohol.

Fija de una manera homogénea, sin precipitar las pro-
tefnas.

Disuelve la cromatina.

Fija los lípidos complejos, por lo que se recomienda - para las mitocondrias.

Debe eliminarse totalmente con abundante lavado en - - agua.

Cloruro de mercurio o sublimado (solución saturada):

Precipita todas las proteínas sin combinarse con ellas.

Gran velocidad de penetración.

Endurece mucho.

Debe ser eliminado con un compuesto yodado.

Excelente mordiente para la posterior tinción del material.

Provoca determinados artefactos nucleares.

Tetróxido de osmio (concentración óptima del 1 al 2%):

Fuerte oxidante, incompatible con el alcohol y el formal.

Fija de manera homogénea, sin precipitar proteínas.

Fija las mitocondrias; fija y ennegrece el aparato de Golgi.

Fija en profundidad de una manera muy desigual.

Provoca velocidad de precipitación; no contrae.

Debe ser cuidadosamente eliminado mediante un lavado con agua.

No facilita las tinciones nucleares.

6.4.- MEZCLAS FIJADORAS.

Se puede decir en general que ninguno de los agentes fijadores es capaz de reunir por sí solo todas las cualidades que debe tener un buen fijador. En la actualidad es muy común utilizar mezclas fijadoras combinadas de tal manera que completen la acción de un fijador con otro balanceando las acciones nocivas, de esta forma los diferentes elementos de los tejidos y células pueden ser conservados lo mejor posible.

Las mezclas fijadoras llevan habitualmente el nombre de la persona que las descubrió o las utilizó por primera vez. A continuación mencionaremos algunas de estas mezclas, separadas por grupos caracterizados por el elemento más activo.

Mezclas fijadoras a base de cromo, en forma de ácido crómico o bicromato:

Mezcla de Orth o Muller/Formol. Buen fijador general, útil para glicógeno y grasa.

Mezcla de Zenker (1894). Buen fijador general.

Mezcla de Helly (1904) o Zenker/formol. Excelente para tejido hematopoyético y discos intercalares.

Mezcla de Regand (bicromato-formol-acético). Bueno para mitocondrias y gránulos citoplasmáticos.

Mezclas fijadoras a base de ácido ósmico:

Mezcla de Flemming (cromo-aceto-ósmico). Bueno para figuras mitóticas.

Mezcla de Chumpey (1909). Bueno para detalles citológicos.

Mezcla de Altman. Buen fijador general.

Mezclas a base de sublimados corrosivos:

Sublimado alcohólico de Shaudin (1889). Bueno para protozoarios.

Mezcla de Gilson (1897). Bueno para invertebrados.

Mezclas a base de ácido pícrico:

Picroformol de Bovin (1897). Recomendado para uso co--

mún y cotidiano, excelente para conservar glucógeno.

Mezcla de Dubosc-Brasil. Buen fijador general.

Mezclas fijadoras a base de formol:

Formol-bromuro de Cajal. Excelente para tejido conecti
vo y neuroglia.

Mezclas fijadoras a base de alcohol:

Fijador de Carnoy. Bueno para ácidos nucleicos, glicó-
geno y gránulos de Nissl.

Alcohol-formol. Bueno para tejido nervioso.

6.5.- MODO DE EMPLEO DEL FIJADOR:

Después de haber elegido el fijador se debe de termi--
nar la manera de emplearlo para obtener los mejores resultada
dos; se propone seguir las siguientes indicaciones:

Para extraer los tejidos que se van a fijar, se reco--
mienda que el animal sea descerebrado o bien muerto en el -
momento de hacer la disección, efectuando todas las manio--
bras lo más rápidamente posible para evitar las alteracio--
nes post-mortem. También es esencial extraer los órganos -
sin que sufran traumatismo, separándolos cuidadosamente por
sus adherencias conectivas.

Una vez extraídos los órganos se obtienen las piezas - que van a ser fijadas, éstas se denominan fragmentos de platina y para hacerlos se toma en cuenta la forma y consistencia del órgano.

Los órganos parenquimatosos como las glándulas hígado, bazo, riñón, etcétera, se cortan en fragmentos cuyo volúmen aproximado sea de 1 cc, es conveniente hacer estos cortes - en forma de pirámide del centro hacia afuera del órgano.

Para asegurar la correcta fijación y corte de las piezas puede hacerse un segundo movimiento en el fijador, para hacerlo se requiere elaborar cortes más pequeños y definitivos al cabo de dos horas de fijación, aprovechando el endurecimiento parcial que han sufrido los órganos; se obtienen así piezas muy regulares y convenientemente orientadas, lo cual es difícil lograr en los órganos frescos que son muy - blandos, en seguida, se colocan los cortes en el nuevo fijador, favoreciendo así la pronta penetración de éste. Por -- precaución debe agitarse los fragmentos mientras se están - fijando para que no se adhieran a las paredes del frasco.

Los órganos tubulares se cortan en secciones transversales entre 0.5 y 2 centímetros de largo aproximadamente. - Puede seguirse el segundo movimiento descrito anteriormente. Para trabajos más específicos, es necesario tomar en cuenta

que la mayoría de los órganos tubulares se contraen y es necesario que se les fije en extensión para evitar que las capas musculares se contraigan irregularmente deformando la superficie interior. Esto se logra ligando el tubo en uno de sus extremos e inyectando por el otro el fijador suficiente para distender moderadamente la cavidad, ligando luego este otro extremo.

Para membranas y órganos delgados en general, se colocan las piezas en papel filtro de poro cerrado o cualquier otra superficie plana a la que se adhieren, se pueden cubrir con otro papel o algodón para evitar que floten; de esta manera conservan su estructura plana a través de la fijación.

Para órganos esponjosos, como los pulmones se recomienda endurecer por una o dos horas en el fijador, secciones más o menos voluminosas, aproximadamente de 2 cc. y posteriormente se cortan piezas rectangulares de menor volumen y se sumergen en nuevo fijador. Un algodón colocado sobre el fragmento evita que éste flote. En general es aconsejable que los fragmentos de platina no excedan de un centímetro cúbico, excepto para piezas muy delgadas cuyo tamaño puede variar; con esto se logra una adecuada fijación en la mayoría de los fijadores.

Es esencial que la composición del fijador permanezca lo más constante posible, a pesar de las acciones osmóticas y químicas ejercidas por las piezas que se están fijando, - es necesario por tanto emplear un volumen de fijador muy grande en relación al volumen de la pieza a fijar. La proporción suele ser de 50:1, pero puede disminuir de acuerdo al fijador; para el formol al 10% es suficiente una proporción de 10:1.

Para facilitar la penetración del fijador es necesario que la pieza se encuentre en suspensión en el líquido, esto se puede lograr suspendiendo la pieza en una bolsa de gasa.

Las piezas no deben sufrir ninguna lesión mecánica, ni ser aplastadas con las pinzas. Cuando se haya de fraccionar el material, se recomienda colocarlo sobre una hoja de cartulina y cortarlo con una navaja bien afilada.

El lavado después de la fijación es una operación de gran importancia ya que es necesario eliminar lo más posible las sustancias fijadoras, para que no interfieran con los reactivos empleados posteriormente. El disolvente empleado para el lavado, así como su tiempo de acción depende del fijador y la técnica que se vaya a seguir. Una vez lavadas las piezas debe continuarse el procedimiento inmediatamente.

Fijación por congelación. Disolución (o congelación - sustitución).

METODO:

1. Congelar la pieza sometiéndola en alcohol a -80°C (temperatura que se obtiene saturando acetona con nieve carbónica).
2. Trasladar el material a alcohol absoluto de 95° manteniendo a -30° ó -40°C (emplear un congelador o una mezcla frigorífica formada por CO_2 disuelto en acetona en un vaso de Dewar). Para el estudio de enzimas hay que tener en cuenta que el agente de sustitución no sea un inhibidor de la enzima a estudiar.
3. Después de la fusión del hielo, al cabo de unas 24 horas se somete lentamente al material a la temperatura ordinaria, en su líquido de sustitución.
4. Incluir en parafina, siguiendo las normas habituales.
5. La extensión de los cortes se efectuará teniendo en cuenta las siguientes consideraciones: si la sustitución se ha efectuado por alcohol o por el líquido de Gendre (3), ha podido producirse la desnaturalización de las proteínas, por lo que puede efectuarse la extensión en medio acuoso; pero si la sustitución

ción se ha hecho con n-butanol, la desnaturalización no habrá tenido lugar y la extensión en un medio acuoso provocaría la inmediata alteración de los orgánulos celulares. Es necesario hacer la extensión de los cortes en alcohol etílico de 85°, que provoca la desnaturalización, o sea la insolubilización de las proteínas.

CAPITULO VII

INCLUSION

Las piezas fijadas antes de proceder a contarlas deben ser incluidas en un medio plástico, salvo algunas excepciones. Este medio de inclusión debe ser lo más químicamente neutro posible; hay que tener siempre presente que la inclusión no se trata de un simple englobamiento, sino que hay una verdadera impregnación del tejido a nivel celular.

El principio de la técnica de la inclusión consiste en someter las piezas a la acción de diversos disolventes para conseguir que una sustancia frecuentemente hidrófoba penetre en el tejido que en principio está hidratado, para mantener en su posición original los elementos que lo integran al efectuar los cortes. Por lo que la pieza debe someterse a una serie de tratamientos sucesivos, cada uno de los cuales está destinado a preparar la penetración del siguiente y en eliminar el anterior. Cada disolvente, por tanto debe ser miscible con el que le ha precedido y con el que le sigue.

Cada medio de impregnación debe sustituir totalmente el medio que le ha precedido. Si la inclusión se hace en un medio no hidrosoluble, por ejemplo, el material totalmente deshidratado, para lo cual se someterá a sucesivos baños de

alcohol, de creciente concentración, hasta que desaparezca el menor vestigio de agua. La graduación exacta de los alcoholes empleados es de poca importancia, salvo la de alcohol absoluto, así como la permanencia del material en cada uno de los baños, ya que depende de numerosos factores, tales como el tamaño de las piezas, su grado de hidratación inicial. Siendo los alcoholes débiles, se eliminarán más aprisa si, al efectuar los cambios de baños, el recipiente en que se trabaja es cuidadosamente secado o sustituido por otro.

Las impregnaciones se efectúan en forma de baños que se hacen en recipientes idénticos o parecidos a los empleados para la fijación, siendo de cómodo manejo. Para cada disolvente se renueva generalmente el baño dos veces, cambiando la pieza del recipiente o sustituyendo el líquido usado por otro nuevo en el mismo recipiente. Cuando la temperatura de fusión del medio de inclusión lo exige, los baños se hacen en la estufa.

Existen varios medios de inclusión, siendo uno de los más corrientes la parafina; las inclusiones en celoidina ó en gelatina se emplean menos.

7.1.- LIQUIDOS DE CONSERVACION.

Tras la fijación puede ser necesario demorar la inclu-

sión debido a varios motivos; entre otros, a que la orientación de la pieza sólo puede determinarse más tarde, hecho que ocurre frecuentemente en los invertebrados cuya anatomía es poco conocida.

En estos casos, las piezas se conservan en medios líquidos diversos que se escogerán según el tipo de tejido, y sobre todo según la fijación que se ha realizado y del medio de inclusión que se empleará.

Existen numerosos líquidos que actúan de conservadores de piezas a incluir, con propiedades muy similares como son:

Formol diluido. Los materiales fijados en mezclas de formol así como en el líquido de Baker (1), por ejemplo, pueden conservarse en una solución al 10% de formol antes de ser cortados por congelación.

Butanol o alcohol butílico normal. Se trata del líquido conservador más usualmente empleado. Las piezas pueden mantenerse mucho tiempo en él, y algunas incluso ganan una consistencia que les será favorable para cuando se corten. Se emplea también para completar la deshidratación, siendo utilizado por algunos como intermediario entre el alcohol etílico y la parafina, con lo que se reduce el número de pasos a seguir en el proceso de la inclusión.

Este líquido puede emplearse sea cual fuere el fijador utilizado, salvo, lógicamente, las piezas formoladas, que no pueden soportar la deshidratación alcohólica.

Modo de empleo:

a) Las piezas fijadas con una mezcla a base de bicromato o tetróxido de osmio serán sometidas, después de un lavado, a tres baños de 6 horas en alcohol de 70°, después a tres baños de 6 horas en alcohol de 95°. Un baño en alcohol absoluto puede ser intercalado en el paso entre el alcohol de 95° y el butanol. Los últimos vestigios de alcohol etílico serán eliminados con dos baños en butanol y las piezas se conservarán en el tercer baño de butanol.

b) Las piezas fijadas por una mezcla a base de ácido pícrico serán tratadas de la misma manera, iniciándose la deshidratación con el alcohol de 95°.

c) Las piezas fijadas con mezcla anhidra, como la de Carnoy, tras dos baños en alcohol de 100°, que eliminará el ácido acético y el cloroformo, se colocarán en butanol; conservándose en el tercer baño de butanol.

Esencia de cedro. La esencia de cedro (no hay que confundir con el aceite de cedro) constituye un excelente medio de conservación. Actúa de intermediario entre el alcohol

y la parafina y reblandece determinados tejidos que, tras la fijación se habfan endurecido considerablemente y vuelto quebradizos.

Generalmente se utiliza la esencia de cedro después de la fijación cromo-ós mica y, sobre todo, después de la impregnación con tetróxido de osmio, siendo conveniente y aconsejable después de la mayor parte de fijaciones.

Aunque la esencia de cedro sea miscible con el alcohol de 95°, es preferible deshidratar completamente las piezas antes de conservarlas en dicha esencia. Siendo este producto muy poco volátil, los baños de parafina que se hacen en el transcurso de la inclusión pronto se impregnan de esta esencia, por lo que hay que renovarlos frecuentemente.

Modo de empleo:

Deshidratar las piezas como en el caso de la conservación en butanol y guardarlas en el tercer baño de esencia de cedro.

Mezclas con colodión (o celoidina). Este tratamiento frecuentemente se denomina inclusión mixta y no debe confundirse con la doble inclusión. Antes de la inclusión en parafina, se impregna en material de colodión, impregnación que

subsiste durante la inclusión en parafina, contrariamente a lo que ocurría en los casos precedentes. En este caso no se trata simplemente de un medio intermediario.

Las piezas deben ser cuidadosamente deshidratadas antes de sumergirlas en la solución de colodión.

Estas soluciones contienen un 1% de celoidina en polvo o de colodión en solución comercial; en este último caso hay que tener en cuenta la dilución que presenta el material - proporcionado por el proveedor. El disolvente puede ser benzonato o salicilato de metilo. Cuando debe hallarse la actividad enzimática del material, el disolvente empleado es la acetona. Antes de la inclusión en parafina se eliminará del material todo vestigio de disolvente, tratándolo con benceno (1 hora aproximadamente).

La impregnación en celoidina puede efectuarse cualquiera que haya sido el método de fijación. Es aconsejable en - casos, en que el material sea muy frágil o anatómicamente - heterogéneo y de una manera general, siempre que se prevea una difícil inclusión en parafina.

Modo de empleo:

a) Deshidratar cuidadosamente hasta alcohol absoluto - inclusive.

b) Introducir las piezas en una solución preparada de la siguiente manera:

- Salicilato de metilo o benzoato
de metilo o acetona -----100 ml
- Celoidina ----- 1 g.

Las piezas se conservan en el tercer baño de esta mezcla, a fin de que se haya eliminado totalmente el alcohol.

En resumen, se pueden interrumpir las manipulaciones - entre la fijación y la inclusión gracias a la existencia de líquidos de conservación que pueden mantener las piezas fijadas, por períodos que oscilan entre las 24 horas y varios años.

7.2.- INCLUSION EN PARAFINA.

El método de la inclusión en parafina es el más usual, debido a que ofrece mayor número de ventajas prácticas, así como más posibilidades para aplicar las técnicas ulteriores.

Las propiedades más interesantes son, sin duda, el ser químicamente neutras, solubles en numerosos disolventes y fáciles de cortar con cuchillas. El único carácter físico

que tiene que considerarse, es su punto de fusión. Cuanto más elevado sea el punto de fusión de una parafina, mayor es su dureza.

Las parafinas de 56° - 58° convienen para la mayor parte de los casos. De una manera general hay que tener en cuenta la dureza del objeto a incluir y la del medio de inclusión. Cuanto más resistente sea el material, mayor será la dureza de la parafina a emplear. No es aconsejable la impregnación del material con una parafina blanda antes de hacer la inclusión definitiva con una parafina más dura; efectivamente, la parafina blanda puede no eliminarse bien en el momento de la inclusión definitiva, provocando que el bloque quede eterogéneo en cuanto a su dureza, inconveniente muy lamentable en el momento de efectuar los cortes. Por consiguiente, la impregnación y confección del bloque se harán siempre con parafina de calidad equivalente. Puede hacerse una excepción a esta regla, en el caso de que se trate de conservar compuestos termolábiles, como son las enzimas.

Al no ser la parafina miscible en agua, las piezas fijadas deberán deshidratarse, siendo el alcohol etílico el deshidratante más usado; pero como la parafina tampoco es miscible con el alcohol etílico, hay que emplear tras la deshidratación un líquido intermediario. Este, en general

es aclarante, con lo que se puede calcular el grado de penetración del intermediario según la transparencia adquirida por la pieza.

El líquido intermediario debe ser miscible con el alcohol y con la parafina; numerosos compuestos presentan ambas propiedades. Así tenemos: benceno, toluol, xilol, esencia de cedro, cloroformo, óxido de propileno.

Tras pasar el material por el líquido intermediario, se procede a una cuidadosa impregnación del material por la parafina líquida. Esta impregnación se efectúa en caliente, en una estufa cuya temperatura está regulada, según el punto de fusión de la parafina escogida para hacer la inclusión, ó a una temperatura ligeramente superior (1° ó 2°). También en este caso es conveniente pasar por tres baños sucesivos de parafina para eliminar totalmente los vestigios del líquido intermediario. Cada baño puede servir para incluir varias veces sucesivas, cierto número de piezas; o sea, que la parafina puede servir varias veces, a diferencia de los alcoholes empleados en la deshidratación y de los líquidos intermediarios, que sólo pueden utilizarse una vez.

La duración óptima de los baños de parafina se elegirá empíricamente para cada clase de material; oscila desde algu

nas horas, en el caso del páncreas de vertebrados, a tres - días en el caso que se incluya la cabeza de un insecto grande.

Hay que tener en cuenta que algunos materiales con el calor se endurecen, mientras que otros, por el contrario, - se hacen más flexibles. La duración de la inclusión en para fina depende también del líquido intermediario utilizado - que se habrá de eliminar: cuanto más volátil sea, más corta será la inclusión. Así tenemos por ejemplo, que una inclusión de un material determinado tratado previamente con benceno con dos horas hay suficiente; mientras que si el mismo material ha sido tratado con esencia de cedro, la impregnación deberá durar unas 12 horas. En general, es más conveniente alargar los baños que acortarlos, ya que es imposible obtener buenos cortes de una inclusión defectuosa.

Cuando el material debe someterse al estudio de enzimas, la duración de la inclusión debe ser lo más breve posible, así como la temperatura de inclusión.

Siempre que se puede, resulta interesante efectuar un paso durante el primer baño, en una estufa de vacío. Este procedimiento mejora la inclusión.

Cuando la inclusión en caliente ha terminado, se con-

fecciona el bloque y de esta manera las piezas pueden conservarse indefinidamente.

7.3.- INCLUSION EN CELOIDINA.

La inclusión en celoidina es menos fuerte que la parafina. Es recomendable para materiales de grandes dimensiones o excepcionalmente duros (centros nerviosos de animales grandes o tejido óseo, por ejemplo); también es aconsejable cuando se desean obtener cortes muy gruesos (más de 15 micras).

El principio de esta inclusión consiste en impregnar piezas totalmente deshidratadas en soluciones cada vez más concentradas de colodión. Por evaporación del disolvente de colodión y su endurecimiento con la acción de un curtiembre, se obtiene el bloque. Después del curtimiento es preferible "aclorar" el bloque y conservarlo en un medio líquido.

Las manipulaciones que hay que efectuar para incluir en celoidina no son mucho más numerosas que en el caso de la inclusión en parafina, pero los tiempos son sensiblemente más largos. Todas las operaciones se efectúan a la temperatura del laboratorio. Debe eliminarse cuidadosamente todo vestigio de agua, tanto en los frascos como en los disolventes.

7.4.- DOBLE INCLUSION, CELOIDINA-PARAFINA.

Es posible compaginar las ventajas de los dos medios - de inclusión en celoidina y parafina; el interés de la para fina es principalmente para la obtención de cortes.

El sistema más sencillo consiste en tratar el bloque - de colodión como si fuese una pieza de material biológico - corriente e incluirlo en parafina.

El procedimiento es recomendado para las piezas que - sean muy pequeñas, muy duras o muy esponjosas.

CAPITULO VIII

METODOS GENERALES DE TINCION

La coloración es la propiedad que poseen ciertos cuerpos de ejercer sobre la luz una absorción selectiva; dicho de otra forma un cuerpo aparece coloreado porque transmite por transparencia o difusión, las radiaciones complementarias de aquellas que absorbe.

Un colorante es un cuerpo coloreado que puede comunicar su coloración a otros cuerpos.

8.1.- CLASIFICACION DE LOS COLORANTES.

Atendiendo a su origen los colorantes se clasifican en dos grupos: Los naturales y los artificiales.

El primer grupo tiene poca importancia en la actualidad porque la mayor parte de estos colorantes son preparados sintéticamente. El segundo grupo corresponde casi a la totalidad de los colorantes usados en la técnica microscópica.

Colorantes naturales: Son extraídos de productos animales o vegetales como el carmín (*Coccus cacti*), la hematoxilina (*Hematoxilon campechianum*), la orceína (*Rocella tinctoria*).

ria), el tornasol (*Chrozophora tinctoria*).

Colorantes artificiales: Son conocidos también como como colorantes de anilina, de carbón o sintéticos.

Ehrlich los ha dividido en dos grupos según sus afinidades para el núcleo y el citoplasma: Nucleares o básicos - cuando el compuesto colorante es una base y citoplásmicos o ácidos cuando el compuesto colorante es un ácido.

Es muy raro que se empleen los ácidos o las bases libres debido a su poca solubilidad. Los colorantes artificiales que se emplean son casi siempre sales. Los colorantes básicos son sales en las cuales la base es coloreada y el ácido es incoloro por ejemplo, el azul de metileno, que es una sal formada por la combinación de la tetrametilitionina coloreada y el ácido clorhídrico incoloro. Los colorantes ácidos son sales en las cuales el ácido es coloreado y la base es incolora, por ejemplo, la eosina que es una sal en la cual el ácido eosínico es coloreado en tanto que la potasa o sosa es incolora.

Ehrlich distingue también a los colorantes neutros, en los cuales la base y el ácido son coloreados, como el picrato de azul de metileno.

Michaels ha creado la categoría de los colorantes indiferentes, para aquellos que no son ni ácidos ni básicos y no poseen agrupamientos capaces de formar sales, son por ejemplo el Sudan III y el rojo escarlata.

8.2.- METODOS DE COLORACION.

No todos los colorantes pueden servir indistintamente a la técnica histológica, por lo tanto, se han dividido los métodos de coloración en las siguientes categorías de acuerdo a las relaciones entre el colorante y el tejido.

8.2.1.- COLORACIONES GENERALES Y ESPECIFICAS.

Las primeras se basan en el teñido intenso de los núcleos, y débil del protoplasma, o en la fuerte coloración de ambas partes con colores distintos; esto aunado a las tonalidades que dan las sustancias intercelulares permite tener una idea clara de conjunto tanto para los tejidos como para los órganos. Las segundas se aplican para estudiar particularidades histológicas, aprovechando la tinción selectiva y casi exclusiva de algunos colorantes sobre ciertas estructuras.

8.2.2.- COLORACIONES DIRECTAS E INDIRECTAS.

Directas. Colorean directamente los tejidos una vez que

se han puesto en contacto con ellos.

Indirectas. Son las que necesitan de un mordiente que ponga a los tejidos en condiciones de tomar el colorante.

8.2.3.- COLORACIONES PROGRESIVAS Y REGRESIVAS.

Cuando el tejido adquiere lenta y progresivamente el grado de color necesario, sin exigir una operación posterior de desteñido, tiene lugar lo que se conoce como coloración progresiva; se usa sobre todo con los colorantes que dan coloraciones muy sólidas o difíciles de diferenciar por ejemplo, el azul de metileno, azul de algodón, carmín y hematoxilina. La coloración regresiva es aquella en la que el objeto sobrecolorado, por la excesiva concentración del colorante, debe sufrir la acción de un disolvente apropiado; el disolvente cumple en este caso, dos fines esenciales: eliminar el exceso de colorante y respetar el teñido, haciéndolo más evidente en ciertas partes del prepararo, es decir, es un agente diferenciador.

Entre las sustancias diferenciadoras encontramos alcalis como sosa y potasa; alcoholes etílico y metílico; ácidos como el sulfúrico, clorhídrico, nítrico, acético, pícrico, etcétera; oxidantes como el permanganato potásico; reductores como el ácido fórmico y el formol; sales metálicas

como el alumbre de hierro, cloruro férrico, yoduro de potasio; y metaloides como yodo, bromo.

Los colorantes que más se prestan para la diferenciación son los básicos como la hematoxilina.

8.2.4.- COLORACIONES SIMPLES Y COMBINADAS.

Las coloraciones simples son aquellas que se obtienen con un solo colorante, ácido o básico. Según su naturaleza, son: Monocromáticas o metacromáticas. En el primer caso todos los elementos son teñidos en el tono del baño colorante, en el segundo ciertos elementos tisulares viran el color a un tono diferente.

8.3. IMPREGNACIONES METÁLICAS.

La impregnación a base de sales metálicas, principalmente de plata, ha sido indispensable para el estudio del sistema nervioso, y brinda preciosas imágenes de este tejido, debido a la distinta intensidad con que se deposita el coloide metálico. Algunas sales metálicas poseen la propiedad de precipitar selectivamente, sufriendo una descomposición en presencia del tejido; el precipitado impregnador se forma algunas veces por reducción, afectando el estado coloidal como en la impregnación metálica áurea, y otras se -

forman por doble descomposición en presencia del mordiente, como sucede con el cromato de plata sobre piezas embebidas en bicromato de potasio.

8.4.- MECANISMO DE LAS IMPREGNACIONES DE PLATA.

Cuando en una solución amortiguada de plata se sumergen los cortes de tejido, dos tipos de plata se depositan en ellos una fracción de plata reducida por el tejido, probablemente como diminutas partículas metálicas o "núcleos" y una fracción de plata reducible que es reducida por una sustancia que actúa como desarrollador. Según Silver, diferentes desarrolladores producen diferentes efectos en el proceso de impregnación con una influencia controlada a causa de un desarrollador particular.

La cantidad y distribución de los núcleos de plata y la plata reducible dependen de propiedades del tejido, el pH de la solución, la concentración de plata, el tiempo y la temperatura de incubación.

Los núcleos de plata juegan un papel dinámico como centros catalíticos para la reducción de plata. Hay una compleja interrelación entre estos centros, la plata reducible, el desarrollador y los tejidos; todos juegan un papel fundamental en la impregnación final de la sección.

8.5.- CONSERVACION DE LAS PREPARACIONES.

Las preparaciones fijadas y teñidas pueden sufrir decoloraciones u otras alteraciones, si no son protegidas adecuadamente. Para la conservación de las preparaciones se utilizan resinas sintéticas o bálsamo del Canadá. Se aplican generalmente disueltos en xilol, a modo de jarabe espeso. Antes de cubrir las preparaciones es preciso que los cortes estén perfectamente deshidratados y aclarados.

La deshidratación se hace de preferencia, en varios cambios de alcohol o acetona, y para la aclaración se requiere de una esencia que puede ser de clavo, cedro, bergamota, orégano, creosota, xilol, etcétera; después de algunos minutos de permanencia en esta esencia se escurren las preparaciones y se recoge el exedente con papel filtro. No es indiferente la elección de la esencia, depende en gran parte del medio en el cual se hizo la inclusión pero sobre todo el método de tinción, por ejemplo, para las coloraciones con anilinas se utilizan esencias que no disuelven estos colores, como bergamota y xilol. La creosota o la esencia de clavo conviene usarlas con coloraciones sólidas que no se destiñan con facilidad, por ejemplo, colorantes naturales o impregnaciones argénticas.

Las preparaciones así tratadas están listas para ser -

cubiertas con el agente conservador, para lo cual se coloca una gota sobre un cubreobjetos limpio y se acerca al portaobjetos que contiene el corte, de manera que toman contacto uno con otro enseguida se adhieren y se deja que el conservador se extienda por todo el cubreobjetos; hay que procurar que el tamaño de la gota sea suficiente para llenar el cubreobjetos, sin que falte ni se derrame; se deja secar a la temperatura ambiente por espacio de varios días o en una estufa a 37°C por 24 horas.

El medio de montaje debe reunir las siguientes condiciones:

- Ser transparente, para satisfacer las condiciones de observación.

- Asegurar la mejor conservación posible de las preparaciones.

- Asegurar la adherencia del cubreobjetos y del portaobjetos, esta última condición no la presentan los medios de montaje que no se solidifican.

Si la observación es inmediata y la preparación no debe conservarse, puede observarse el corte en una gota de agua o de glicerina, recubierta por el cubreobjetos. Este.

procedimiento sólo se emplea en casos muy especiales; en general, se prefieren los montajes más o menos permanentes.

8.6.- TINCIÓN MONOCROMICA.

HEMATOXILINA FERRICA:

Este es uno de los métodos más antiguos y, aunque es monocrómico, da resultados muy representativos. A pesar de su aparente simplicidad ofrece ciertas dificultades. Sus resultados dependen de la fijación y del modo de empleo. Esta tinción puede ser considerada simultáneamente como método general y citológico.

FIJACION. Puede emplearse la mayor parte de los fijadores, la elección de uno u otro depende de lo que se intente poner de manifiesto.

REACTIVOS. Hematoxilina de Regaud (II)

Solución acuosa de alumbre férrico al:

- 5% para el mordiente;
- 0.5 al 3% para diferenciación (hacer la dilución en el momento de emplear, a partir de la solución del 5%).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar.

2. Someter los cortes durante 24 horas a la solución de alumbre férrico, que actúa de mordiente.
3. Teñir con hematoxilina durante 24 horas.
4. Pasar rápidamente por agua destilada.
5. Diferenciar con alumbre férrico en el microscopio. Este proceso es tanto más lento cuanto más diluida sea la solución diferenciadora.
6. Lavar como mínimo durante 1 hora con agua corriente todo vestigio de alumbre.
7. Deshidratar.
8. Montar.

ADVERTENCIA. Las tinciones de contraste no son compatibles.

RESULTADOS. Dependen fundamentalmente de la fijación empleada. Se ponen de manifiesto en color negro:

- a) Después de una fijación alcohólica, los núcleos, los ergastoplasmas, algunos gránulos de secreción acidófilos, algunas fibras colágenas, los cetrosomas, las raíces ciliares, las tonofibrillas, las bandas de cierre, los epitelios chapa y el vitelo.

- b) Después de la fijación con bicromato y una poscromización corta: todas las estructuras antes mencionadas y además el condrioma.
- c) Después de la fijación con bicromato y una larga poscromización; solamente se pone de manifiesto el condrioma.

8.7.- TINCION POLICROMICA SIN MORDIENTE NI DIFERENCIACION.

Método policrómico de rápida realización, a base de dos tiempos y en que el colorante de los ácidos nucleicos es una laca aluminica o férrica. La tinción de contraste se efectúa sin emplear mordiente ni diferenciar.

FIJACION. Pueden usarse todos los fijadores corrientes, evitando el empleo de los fijadores a base de tetróxido de osmio, que dan malos resultados con las lacas empleadas.

HEMALUMBRE-PICROCARMIN DE INDIGO.

REACTIVOS. Hemalumbre de Masson (9);

Picrocarmin de indigo de Calleja (13).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con hemalumbre de 2 a 5 minutos.
3. Lavar con agua corriente hasta que vire adquiriendo una tonalidad azul-negrucza (de 2 a 5 minutos).
4. Teñir durante 30 segundos, con picrocarmin de indigo.
5. Deshidratar directamente con alcohol absoluto.
6. Montar.

ADVERTENCIA. El hemalumbre se emplea en este caso como tinción progresiva. El proceso es regresivo cuando los cortes permanecen en el colorante 30 minutos y sigue una diferenciación en alcohol clorhídrico (ácido clorhídrico al - - 0.25% en alcohol absoluto). Este método no ofrece ninguna ventaja sobre el método progresivo.

RESULTADOS. Los núcleos y los citoplasmas basófilos se tiñen de color pardo; los citoplasmas acidófilos y nucleolos de amarillo o verde; de azul las fibras colágenas; los eritrocitos de amarillo. Algunas secreciones (principalmente las glucoproteínas) se tiñen de pardo; otras de amarillo o verde.

8.8.- TINCION POLICROMICA CON EMPLEO DE MORDIENTE O DI FERENCIACION.

TRICROMICO DE RAMON Y CAJAL.

Es uno de los pocos métodos tricrómico que puede hacerse después de cualquier tipo de fijación.

FIJACION. Pueden emplearse todos los fijadores, pero el modo de empleo difiere según la presencia o ausencia de tetróxido de osmio en el líquido fijador.

REACTIVOS. Fucsina de Ziehl (8) diluida con agua destilada en una proporción de 1/5; esta dilución se hace en el momento de usarla.

Picrocarmin de índigo (13)

Solución acuosa de ácido acético al 0.2%

MODO DE EMPLEO: Cuando los fijadores usados no contienen tetróxido de osmio.

1. Desparafinar, (colodionar), hidratar.
2. Teñir con fucsina de Ziehl durante 10 minutos.
3. Lavar con agua corriente.
4. Lavar con agua acética hasta que se elimine el exceso de fucsina.

5. Teñir durante 10 minutos, en un frasco borrel, con picrocarmín de indigo.
6. Lavado prolongado con agua acética (10 minutos).
7. Deshidratar con alcohol absoluto hasta que cese de eliminarse el rojo.
8. Montar.

Cuando los fijadores contienen tetróxido de osmio es - preferible teñir en caliente (60°C) con fucsina de Ziehl. - Cuando la fijación ha sido muy larga, es conveniente alargar el tiempo de tinción hasta 45 minutos. La duración de - la tinción con picrocarmín de indigo, por el contrario, será reducida a un minuto o 30 segundos. Los tiempos de las - etapas 1, 3, 4, 6, 7 y 8 quedan invariables.

ADVERTENCIA. Es indispensable que el picrocarmín de indigo sea de buena calidad.

RESULTADOS. Los núcleos y los citoplasmas basófilos se tiñen de rojo; los citoplasmas acidófilos quedan en verde o gris, en azul las fibras de colágena; los gránulos de secreción quedan teñidos de verde, azul o rojo; las mucinas de naranja o de violeta.

VARIANTE. La fucsina de Ziehl, puede ser sustituida -

por el magenta (12). El modo de empleo y los resultados son idénticos.

CAPITULO IV

SISTEMA NERVIOSO

De todas las células del organismo, las que componen el tejido nervioso son las que tienen más desarrolladas las propiedades de excitabilidad y conductibilidad. La mayor parte de los tejidos que integran el sistema nervioso son de origen ectodérmico. Casi todos derivan del tubo neural y de las crestas neurales del embrión. La función del sistema nervioso es recibir estímulos y enviar impulsos de una parte a otra del organismo. De esta manera se coordinan e integran las funciones de los distintos órganos y partes del cuerpo.

TEJIDO NERVIOSO.

El tejido nervioso está formado por células nerviosas o neuronas y células de sostén, la neuroglia o células gliales.

Neuronas. Las neuronas son las unidades estructurales básicas del sistema nervioso. Están especializadas en las propiedades fisiológicas de irritabilidad y conductibilidad. Por irritabilidad nos referimos a la capacidad de la célula de responder a la estimulación por medio de un cambio en su estructura y actividad en el punto donde es estimulada. La

difusión de esta actividad se llama conducción; la actividad, un estímulo autopropagado fisicoquímicamente, constituye el impulso nervioso.

Una neurona está compuesta de un cuerpo celular (pericarion) y sus prolongaciones.

Pericarion. Esta porción de la neurona contiene el núcleo y cierta cantidad de citoplasma. Es principalmente un centro trófico, pero también tiene función receptora. El pericarion de la mayoría de las neuronas recibe numerosas terminaciones nerviosas que transportan estímulos excitatorios o inhibitorios generados en otras células nerviosas.

Núcleo. En la mayoría de las neuronas el núcleo es esférico y aparece poco teñido en las preparaciones histológicas, ya que sus cromosomas se encuentran poco condensados. Cada núcleo tiene por lo general un nucleolo único, grande y central.

Reticulo endoplasmático granular. Es muy abundante en las células nerviosas y forma agregados de cisternas paralelas entre las cuales hay numerosos ribosomas libres, generalmente formando rosetas. Estas formaciones sugieren que el pericarion sintetiza proteínas tanto del tipo "exportación" como del tipo estructural. Cuando estos conjuntos de

cisternas y ribosomas son teñidos convenientemente, se presentan al microscopio óptico como manchas basófilas esparcidas por el citoplasma. Se denominan corpúsculos de Nissl.

Aparato de Golgi. Se localiza exclusivamente en el pericarion, en torno al núcleo. Consta de membranas lisas que constituyen vesículas aplanadas dispuestas paralelamente entre sí, formando grupos que a su vez son paralelos a la membrana nuclear. Además de las vesículas aplanadas, se encuentran también vesículas de menor tamaño y esféricas.

En las preparaciones por impregnación argéntica u ósmica, técnicas clásicas para demostración del aparato de Golgi, éste aparece como una red de filamentos irregulares. Este aspecto es consecuencia de la impregnación de las membranas del aparato de Golgi y su deformación por la técnica empleada.

Mitocondrias. Existen en pequeñas cantidades en las dendritas y axones, son un poco más abundantes en el pericarion y están presentes en gran cantidad en el telodendrón.

Neurofilamentos y microtúbulos. Son fibrillas huecas de 10 nm de diámetro, abundantes tanto en el pericarion como en las prolongaciones. En ciertas preparaciones efectuadas con impregnación de plata, estos neurofilamentos se - -

aglutinan y sobre ellos se forma un depósito de plata metálica, apareciendo así las neurofibrillas visibles al microscopio óptico. En condiciones apropiadas, estas neurofibrillas pueden observarse en neuronas vivas mantenidas en cultivo de tejido; probablemente ésto se debe a la disposición paralela y muy próxima de los neurofilamentos, cuyo diámetro está por debajo del límite de resolución del microscopio óptico. El citoplasma del pericarion y de las prolongaciones contiene también microtúbulos de 24 nm de diámetro, semejante a los encontrados en otros tipos celulares.

Inclusiones. En determinados sitios de SNC los pericarion contienen gránulos de melanina, pigmento de significado funcional aún desconocido en este tipo de células. Otro pigmento encontrado a veces en los cuerpos celulares es el lipocromo, de color pardo y conteniendo lípidos. Este pigmento se acumula con el transcurso de la edad y consta probablemente de residuos de material parcialmente digerido por los lisosomas. Es frecuente la presencia de gotitas lipídicas en los pericariones.

Las prolongaciones son extensiones citoplasmáticas, semejantes a hilos, de dos tipos, dendritas y axones. Las dendritas reciben y conducen impulsos hacia el cuerpo celular. Usualmente contienen todas las estructuras que se encuentran en el cuerpo celular. Puede haber una o muchas --

dendritas, y varían tanto en tamaño como en forma y extensión en sus ramificaciones.

Los axones (cilindroejes) conducen impulsos fuera del cuerpo celular y por lo regular se denominan fibras nerviosas. Hay solamente un axón en cada neurona, pero por lo general, originan varias ramificaciones llamadas colaterales. Los axones son de diámetro uniforme y contienen neurofibrillas y mitocondrias, pero no cuerpos o grumos de Nissl. En su punto de origen, a nivel del cuerpo celular hay un área elevada, el cono axónico, el cual también está desprovisto de cuerpos de Nissl. En sus extremos libres los axones se ramifican y terminan en los órganos efectoras, tales como el tejido muscular o glándulas, o hace contacto con las dendritas y cuerpo celular de otra neurona para formar una sinapsis, un área de continuidad funcional entre dos o más neuronas.

Los axones pueden estar cubiertos con una o dos vainas: una interna, relativamente gruesa, la vaina miélnica o medular; y una externa delgada, la vaina celular o neurilema. La vaina miélnica no es una cubierta continua, sino que es tá estrangulada a intervalos, formando segmentos separados, entre los cuales hay interrupciones, los nódulos de Ranvier. Los segmentos entre los nódulos se denominan internodulares. En base a ésto, las fibras se clasifican como miélnicas --

(medulares) o amielínicas (no medulares).

Las fibras mielínicas se encuentran en el sistema nervioso central, donde dan un color blanquecino o amarillento a las áreas en las cuales están concentradas, de ahí lo de sustancia blanca. Las vainas mielínicas de las neuronas centrales son más continuas, teniendo sólo por lo común, nódulos donde se ramifican. Las vainas mielínicas con nódulos a intervalos regulares se encuentran en los nervios periféricos. Las fibras amielínicas se hallan en el sistema nervioso autónomo y en algunas áreas grises del sistema central.

El neurilema (vaina de Schwann) se encuentra en las fibras del sistema periférico y probablemente en aquellas del sistema nervioso central. Está compuesto de una sola capa de células aplanadas, una célula por internódulo en fibras mielínicas y se continúa en los nódulos de Ranvier. En las fibras amielínicas el neurilema es difícil de distinguir de los axones sobre los cuales descansa, excepto por la presencia de sus núcleos. Una tinción especial para las fibras, - tal como una tinción de plata que las tiñe de negro, hará - que las fibras contrasten con el neurilema. Este puede contribuir a la regeneración de las fibras nerviosas lesiona--das, pero cuando es el cuerpo neuronal el lesionado sobre--viene la degeneración de toda la neurona, pues las células nerviosas no se reproducen.

Clasificación de las neuronas. A menudo las neuronas se clasifican como multipolares, bipolares y unipolares. Las neuronas multipolares son aquéllas con muchas prolongaciones celulares. Son las más comunes y son las neuronas efectoras o internunciales del sistema central. Las neuronas bipolares con dos prolongaciones separadas sólo se encuentran en los ganglios del nervio vestibulococlear, en los receptores olfatorios y en una capa de la retina del ojo. Las neuronas unipolares, aquéllas que tienen una prolongación, se encuentran en los ganglios sensitivos espinales y en ciertos nervios craneales sensoriales. Su única prolongación se divide en ramos central y periférico muy cerca del cuerpo celular a la manera de una T.

Neuroglia. La neuroglia, un término tomado del griego que significa liga nerviosa, sirve como tejido de sostén al sistema nervioso central. Hay tres tipos de células: astrocitos, oligodendrocitos y microglia (microgliocitos). A menudo los dos primeros se denominan macroglia y son de origen ectodérmico, los microgliocitos se derivan del mesodermo.

Los astrocitos son células relativamente grandes con muchas prolongaciones radiadas cuyas porciones terminales pueden tener expansiones que se fijan en la piamadre o en los vasos sanguíneos. Hay dos clases de astrocitos: fibro-

Los astrocitos son células que se encuentran principalmente en la sustancia blanca y que tienen fibras que corren a través del citoplasma de sus cuerpos celulares; y protoplasmáticos, que se localizan principalmente en la sustancia gris. Los astrocitos contribuyen a los procesos de reparación del SNC y brindan soporte al tejido nervioso.

Los oligodendrocitos (oligodendroglia) son más pequeños que los astrocitos y tienen menos prolongaciones. Se encuentran en estrecha asociación con los pequeños vasos sanguíneos y con las grandes células nerviosas, y en la sustancia blanca se localizan entre los haces de fibras. Frecuentemente sus prolongaciones abrazan las fibras nerviosas. Los oligodendrocitos son las células satélites de las células nerviosas y pueden servir en la formación y preservación de las vainas miélicas de las fibras del SNC, asumiendo así el papel del neurilema de los nervios periféricos.

Los microgliocitos (microglia) se encuentran a lo largo de toda la sustancia gris y blanca del sistema nervioso. Son células pequeñas cuyas dos ó más prolongaciones están finamente ramificadas dando un aspecto plumoso. Son fagocitos y sirven para eliminar los tejidos muertos y las sustancias extrañas.

Las células gliares frecuentemente dan origen a tumores del SNC. Estos pueden ser malignos, de crecimiento rápido, lento o benignos. Los últimos a menudo son susceptibles de extirparse quirúrgicamente.

Nervios. Los nervios pueden definirse como haces de fibras nerviosas que viajan juntos hacia afuera del SNC. Se mantienen unidos por medios de vainas de tejido conectivo bien organizado, las cuales les dan protección y resistencia, de otra manera serían estructuras muy débiles y por lo tanto, vulnerables. Debido a las vainas de tejido conectivo los delgados axones (fibras) pueden viajar grandes distancias en el cuerpo para inervar músculos y otras estructuras. Una fina vaina de fibras reticulares de tejido conectivo laxo, que constituyen el endoneuro, cubre individualmente a las fibras nerviosas. Muchas de estas fibras nerviosas están reunidas en fascículos (haces) debajo de una envoltura externa de tejido areolar laxo llamada perineuro. Varios haces juntos constituyen un nervio, tienen una vaina externa llamada epineuro. Los elementos del tejido conectivo de estas diversas vainas se continúan unos con otros. En las vainas se encuentran vasos sanguíneos y linfáticos en proporción al tamaño del nervio.

Los nervios establecen comunicación entre los centros nerviosos y los órganos de la sensibilidad y los efectores

(músculos, glándulas). Poseen fibras aferentes y eferentes, en relación al SNC. Las primeras llevan a los centros las - informaciones procedentes del organismo y del medio ambiente. Las fibras eferentes transmiten impulsos de los centros nerviosos a los órganos efectores, controlados por estos - centros.

Los nervios que sólo poseen fibras de sensibilidad - - (aferentes) se llaman sensitivos y los que están formados - sólo por fibras que transmiten mensaje de los centros a los efectores son los nervios motores. La mayoría de los ner- - vios poseen fibras de los dos tipos, por lo tanto nervios - mixtos.

Sistema nervioso autónomo. Se llama sistema nervioso - autónomo la parte del sistema nervioso relacionada con el - control de la musculatura lisa, con el ritmo cardíaco y la secreción de algunas glándulas. Su función es la de regular ciertas actividades del organismo, a fin de mantener la -- constancia del medio interno (homeostasis).

El término autónomo puede causar la impresión de que - esta parte del sistema nervioso funciona a modo completamen- te independiente, lo que no es cierto. Las funciones del - sistema nervioso autónomo sufren constantemente la influencia de la actividad consciente del SNC.

El concepto de sistema nervioso autónomo es primordialmente funcional. Anatómicamente está formado por aglomerados de células nerviosas localizadas en el sistema nervioso central, por fibras que salen del mismo a través de los nervios craneales o espinales, y por los ganglios nerviosos situados en el curso de estas fibras.

El sistema nervioso autónomo está formado por dos partes, diferentes por su anatomía y por su función: el sistema simpático y el parasimpático.

Sistema simpático. Sus núcleos formados por grupos de células nerviosas están localizados en las porciones torácicas y lumbar de la médula espinal, y las fibras que dejan estas neuronas (fibras preganglionares) salen por las raíces anteriores de los nervios de estas regiones, por ello, el sistema simpático se llama también parte toracolumbar del sistema nervioso autónomo. Los ganglios del sistema simpático forman la cadena vertebral y plexos situados cerca de las vísceras. El mediador químico de las fibras postganglionares es la noradrenalina.

Sistema parasimpático. Tiene sus núcleos en el encéfalo y en la porción sacra de la médula espinal. Las fibras de esas neuronas salen por cuatro nervios craneales y por los nervios sacros. El parasimpático se denomina también de

división craneosacra del sistema autónomo. La segunda neurona del sistema parasimpático se encuentra en ganglios menores que los del simpático y siempre se localiza cerca de los órganos efectores. Con frecuencia estas neuronas están situadas en el interior de los órganos como ocurre en la pared del estómago e intestino. En estos casos las fibras preganglionares penetran en los órganos y ahí entran en sinapsis con la segunda neurona de la cadena.

El mediador químico liberado por las terminaciones nerviosas preganglionares y posganglionares del parasimpático, es la acetilcolina. Esta sustancia se destruye rápidamente por la acetilcolinesterasa, siendo ésta una de las razones por la cual los estímulos parasimpáticos son de acción más discreta y más localizada que los del simpático.

Sinapsis: Unión entre neuronas. Los ramos terminales de las neuronas se ponen en contacto con los efectores o con otras neuronas. El área de continuidad funcional entre las neuronas es la sinapsis. Entre otras funciones, la sinapsis determina la dirección del recorrido de los impulsos nerviosos en el sistema nervioso.

Cada extremo de las múltiples ramificaciones terminales de un axón forma un bulbo terminal o botón terminal, que entra en contacto con las dendritas y el cuerpo celular

de la siguiente neurona o neuronas en la vfa nerviosa. Este contacto no es un punto de continuidad estructural entre las neuronas ni el impulso pasa en forma directa de una a otra neurona. Más bien, la llegada de un impulso a un bulbo terminal causa algún cambio o condición que sirve para estimular a la siguiente neurona o en algunos casos, hacerla, dentro de ciertos niveles, susceptible a la estimulación proveniente de los bulbos terminales de otra neurona que se encuentra en la misma área sináptica. Se ha probado que la excitación o inhibición resultante es efectuada por la liberación de agentes químicos, aunque no se excluyen otros mecanismos. La acetilcolina y sustancias semejantes a la adrenalina se ha obtenido de las áreas sinápticas en el sistema autónomo, así como en las uniones entre ciertos nervios eferentes y sus efectores. Evidencias recientes indican que estas sustancias se están continuamente formando en las uniones neuromusculares y que un impulso nervioso no inicia esta secreción, pero sí cambia el porcentaje de la misma. Tomando en cuenta que las dendritas no tienen esta capacidad de secretar sustancias en la sinapsis, mientras que los axones sí, podemos entender ahora que las sinapsis sirven para establecer la dirección de la conducción en el sistema nervioso intacto.

Dependiendo del tipo de neurona, pueden encontrarse también terminales sinápticas en contacto con un cuerpo ce-

lular; en la porción proximal de un axón antes de que la capa de mielina empiece; así como asociaciones sinápticas entre bulbos terminales de diferentes neuronas. Por su formación las sinapsis pueden ser: axodendríticas, axosomáticas, y axoxónicas. Dependiendo del papel funcional de la célula nerviosa principal y de la naturaleza del mediador químico en la sinapsis, la influencia de un bulbo terminal en las subsecuentes neuronas puede ser de excitación o de inhibición. Las sinapsis axodendríticas son generalmente excitatorias, en tanto que, las sinapsis axosomáticas y las axoxónicas tienden a ser inhibitorias.

La estructura de la sinapsis se ha podido conocer mejor con el concurso del microscopio electrónico; en él se ha observado que hay una discontinuidad entre la terminación nerviosa presináptica y la neurona postsináptica, a la que se ha llamado grieta sináptica, que ha de ser atravesada por la señal nerviosa. La presencia de mitocondrias en la parte terminal presináptica, indica un alto nivel de actividad metabólica habiendo además gran número de vesículas sinápticas, que contienen la sustancia transmisora, responsable de la transmisión del impulso nervioso a través de la sinapsis.

Ganglios nerviosos. Los acúmulos de neuronas localizadas fuera del sistema nervioso central reciben el nombre de

ganglios nerviosos. En su mayor parte los ganglios son órganos esféricos, protegidos por cápsulas conjuntivas y asociadas a nervios. Algunos ganglios se reducen a pequeños grupos de células nerviosas situadas en el interior de ciertos órganos, principalmente en la pared del tubo digestivo, constituyendo los ganglios intramurales.

Hay dos tipos de ganglios nerviosos: Los ganglios cerebroespinales (sensitivos) unidos a las raíces posteriores de los nervios espinales y algunos nervios craneales. Y los ganglios del sistema nervioso autónomo, unidos a los nervios simpáticos y parasimpáticos. Todos los ganglios intramurales forman parte del parasimpático.

Sustancias blanca y gris. En el SNC se distingue la sustancia blanca y gris. La primera está formada por fibras mielínicas, oligodendrocitos, astrocitos fibrosos y células de microglia. En la sustancia gris hay cuerpos de neuronas, fibras amielínicas en gran cantidad y algunas fibras mielínicas, astrocitos protoplasmáticos, oligodendrocitos y células de microglia. El color característico de la sustancia blanca es consecuencia de su riqueza en fibras que contienen mielina.

La disposición de las dos sustancias varía según la parte del sistema nervioso considerada. En cortes transver-

sales de la médula espinal, la sustancia blanca se localiza externamente y la gris internamente, adoptando forma de H.

En el cerebelo se distinguen dos hemisferios unidos por una parte central, el vermis. En la superficie del cerebelo se extienden depresiones perpendiculares al vermis, que divide al órgano en lóbulos. En cada lóbulo hay pliegues formados por un parte superficial de la sustancia gris y un eje central de sustancia blanca. Además de constituir la corteza (capa superficial) cerebelosa, la sustancia gris también está presente formando núcleos en el interior de la sustancia blanca.

La corteza del cerebelo tiene tres capas que de dentro hacia afuera son las siguientes: capa granulosa, capa de las células de Purkinje y capa molecular. Las células de la capa granulosa son las neuronas más pequeñas del cuerpo humano (diámetro alrededor de 5 micrometros), con estructura atípica. Cada célula granulosa (granos del cerebelo) contiene de tres a seis dendritas y, como las demás neuronas, un único axón. La capa de células de Purkinje está formada por una única hilera de estas células, que son muy grandes y poseen dendritas que se subdividen profusamente en un mismo plano, formando una especie de abanico. La capa más externa de la corteza cerebelosa es la capa molecular que contiene pocas neuronas y muchas fibras nerviosas amielínicas.

Meninges. El sistema nervioso central está contenido y protegido por la caja craneana y por el conducto vertebral, estando envuelto por membranas de tejido conjuntivo llamadas meninges. Las meninges están formadas por tres capas - que desde fuera hacia dentro son: duramadre, aracnoides y - piamadre. La primera se conoce también como paquimeninge. - La aracnoides y la piamadre se encuentran unidas entre sí, siendo consideradas por muchos autores como una membrana - única, la piaaracnoides o leptomeninge.

Duramadre. Es la meninge más externa, constituida por tejido conjuntivo denso, continuo con el periostio de los - huesos de la caja craneana. La duramadre, que envuelve la - médula espinal, está separada del periostio de las vértebras, formándose entre las dos el espacio epidural. Este espacio contiene venas de pared muy delgada, tejido conjuntivo laxo y tejido adiposo. En toda su extensión, la duramadre está - separada de la aracnoides formándose entre las dos el espacio subdural. La superficie interna de la duramadre y, en - la duramadre del canal raquídeo, también la externa, están revestidas por un epitelio simple plano de origen mesenquimatoso.

Aracnoides. Presenta dos partes, una en contacto con - la duramadre y bajo la forma de membrana, otra constituida por trabéculas que, partiendo de la aracnoides, une ésta -

con la piamadre. Las cavidades entre las trabéculas conjuntivas forman el espacio subaracnoideo, que contiene líquido cefalorraquídeo y no tiene comunicación con el espacio subdural. La aracnoides está formada por conjuntivo carente de vasos sanguíneos y todas sus superficies están revestidas por el mismo tipo de epitelio simple plano, de origen mesenquimatoso, que cubre la duramadre. La aracnoides de la médula espinal contiene un menor número de pilares de unión con la piamadre, de modo que ambas membranas se destacan mejor aquí que en el encéfalo. En ciertos sitios la aracnoides forma expansiones que perforan la duramadre y van a terminar en senos venosos contenidos en ella, se llaman vellocidades aracnoideas. Su función es transferir líquido cefalorraquídeo a la sangre.

Piamadre. Está muy vascularizada y es la membrana más próxima al tejido nervioso, aunque no está en contacto directo con células o fibras nerviosas. Entre la piamadre y los elementos nerviosos se sitúan prolongaciones de células de la neuroglia que, formando una capa muy delgada, se unen firmemente a la cara interna de la piamadre. La piamadre sigue todas las irregularidades de la superficie del sistema nervioso central y penetra en el tejido nervioso por cierta extensión, juntamente con vasos sanguíneos. Su superficie externa está revestida por células aplanadas, que provienen del mesénquima.

Plexos coroides. Los plexos coroides δ , más exactamente, las telas coroideas, son pliegues e invaginaciones de la piamadre muy vascularizadas que se proyectan al interior de los ventrículos. Forman el techo del III y IV ventrículos y parte de las paredes de los ventrículos laterales. Histológicamente, los plexos coroides están formados por conjuntivo laxo de la piamadre, revestido por un epitelio cúbico simple o cilíndrico derivado del tubo neural. Su principal función es secretar líquido cefalorraquídeo, el cual, a pesar de su pobreza en sólidos y su riqueza en agua, es producido por el trabajo activo de las células epiteliales que recubren los plexos coroides.

Líquido cefalorraquídeo. Llena las cavidades de los ventrículos, el canal central de la médula, el espacio subaracnoideo y los espacios perivasculares.

CAPITULO X

TECNICAS PARA TEJIDO NERVIOSO

DEMOSTRACION DE LOS GRUMOS DE NISSL.

El estudio estructural del sistema nervioso puede iniciarse a nivel de los orgánulos celulares que aparecen con bastante nitidez después de aplicar las técnicas de tinción de los grumos de Nissl. La mayor parte de los métodos formados por colorantes básicos son propicios para estos estudios. Para los cortes de material incluido en celoidina, se aconseja seguir la técnica de Gothard 1898.

Método de Gothard (para cortes en celoidina).

Reactivos:

- Azul policromo de Unna (6)

Diferenciador:

- creosota de haya	50 ml
- esencia de Cayepot	40 ml
- xilol	50 ml
- alcohol absoluto	160 ml

MODO DE EMPLEO:

1. Emplear cortes de material incluido en celoidina y fijarlos en alcohol de 95°.

2. Recoger los cortes en alcohol de 70°
3. Teñir con el azul policromo durante 24 horas.
4. Lavar rápidamente con alcohol de 80°
5. Diferenciar al microscopio hasta que no haya eliminación del colorante.
6. Lavar con alcohol absoluto.
7. Transparentar con esencia de Cayepot.
8. Montar en bálsamo.

Resultados. Los núcleos y los grupos de Nissl se tiñen de azul.

PARA LA OBSERVACION DE LOS SOMAS CELULARES Y SUS PROLONGACIONES.

Tinción vital o posvital del sistema nervioso con el azul de metileno (aplicación "in toto" o en bloque).

El azul de metileno disuelto en una solución isotónica de cloruro sódico se inyecta en el organismo y de una manera selectiva se fija en las células nerviosas y en sus prolongaciones en forma de leucoderivados, el cual, al poner los tejidos en contacto con el aire, se oxida y vuelve a adquirir su tonalidad. Los elementos nerviosos teñidos de esta manera pueden observarse directamente o después de la -

"fijación", de la tinción y el montaje.

El método original de Ehrlich presenta diversas variantes que principalmente difieren en el mecanismo de introducción de la solución colorante en el organismo.

Reactivos:

- Solución de azul de metileno (del 0.1% hasta saturación) en una solución isotónica de cloruro sódico.
- Solución acuosa de molibdato amónico al 10%.

MODO DE EMPLEO: En el método original de Ehrlich se "lava" el sistema vascular del animal inyectándole líquido fisiológico calentado a la misma temperatura que el animal y seguidamente se introduce, por perfusión, la solución colorante calentada suavemente.

En la técnica de Meyer se inyecta varias veces la solución colorante subcutáneamente, hasta conseguir la muerte del animal. En ambos casos se extraen inmediatamente los centros nerviosos, y cuando han adquirido suficiente tonalidad azul, debido al contacto con el aire, se fijan unos 10 minutos en molibdato amónico y después se lavan.

La tinción puede hacerse por inmersión de órganos pe-

queños o sección de órganos en la solución colorante; también puede hacerse aplicando soluciones concentradas de azul de metileno en la superficie del órgano.

Después de la tinción de los elementos nerviosos y de su fijación en molibdato amónico, los tejidos se lavan rápidamente, se deshidratan y montan in toto.

Crítica del método. Este método es más sencillo y rápido que las técnicas de impregnación argéntica; hay que tener en cuenta que su aplicación a un material desconocido puede ir precedido de una serie de fracasos.

Método con cromato argéntico. (Aplicación en bloque). Tiene la particularidad de teñir un número restringido de neuronas por cada preparación. En principio se trata el tejido nervioso con una solución de bicromato potásico introducido en el fijador y después se aplica una solución de nitrato de plata. En algunas neuronas se forma un precipitado de cromato de plata.

Técnica de Golgi.

Reactivos:

- Mezcla ácido ósmico-bicromato:
 - Bicromato potásico al 3% 20 vol.
 - Tetróxido de osmio al 1% 6 vol.

- Solución acuosa de nitrato de plata al 0.50 ó 0.75%.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar pequeños fragmentos de órganos por una mezcla de tetróxido de osmio-bicromato durante 24 a 56 horas a una temperatura de 20° a 25°C (el tiempo debe determinarse experimentalmente).
2. Pasar rápidamente por agua destilada.
3. Tratar durante 24 horas a varios días, según los casos, con nitrato de plata.
4. Deshidratación rápida e incompleta con alcohol.
5. Aplicar parafina fundida en una de las caras de la pieza.
6. Sujetarla sobre el portabloques de un micrótopo. Hacer cortes gruesos mojando constantemente, entre corte y corte, la cuchilla y la superficie a cortar con alcohol de 95° hasta efectuar las manipulaciones siguientes.
7. Pasar los cortes por tres baños sucesivos de alcohol de 95° (en total una hora). Transparentar el material mediante esencia de girasol, pasar por xileno y montar los cortes en resina dammar disuelta en xileno. Proceder como en el caso de montaje en bálsamo oxidado; después de haber obtenido una capa -

dura de resina, se recubrirá con una gota de bálsamo de Canadá y con el cubreobjetos.

Critica del método. Variantes: A pesar de esta aparente sencillez, numerosos factores, el principal de ellos es el tiempo de permanencia en el tratamiento inicial con mezcla cromo-ós mica, influyen en el resultado obtenido. El inconveniente más grave del método es la presencia del precipitado en las regiones superficiales de las piezas. Cuando la aplicación de este método no ha dado el resultado buscado, pueden someterse los mismos bloques a los primeros tratamientos (tratando con la mezcla tetróxido de osmio, bicromato, lavado, tratamiento con nitrato de plata); puede hacerse también la doble impregnación tras varios días de permanencia en nitrato de plata se secan las piezas con papel de filtro y se ponen de nuevo en una mezcla de teróxido de osmio-bicromato recién preparada, pero con mayor proporción de bicromato (6%). Las manipulaciones siguientes son las mismas que en el método simple.

Método con el bicloruro de mercurio (aplicado en bloque).

Técnica de Cox.

Reactivos:

- Líquido de Cox

- bicromato potásico al 5% 20 vol

Solución 1

- cloruro de mercurio al 5% 20 vol

- agua destilada 40 vol

Solución 2

- cromato potásico al 5% 16 vol

Diluir la solución de cromato al 5% (solución 2) y mezclar las dos soluciones en el momento de usar.

Para aumentar el contraste: Solución acuosa de carbonato sódico al 5%.

MODO DE EMPLEO:

1. Tratar los fragmentos de órganos con el líquido de Cox durante 2 a 4 meses.
2. Lavar con alcohol de 90° durante 30 minutos.
3. Incluir y cortar como en el caso del método al cromato de plata.
4. Lavar los cortes con agua destilada.
5. Tratar los cortes con la solución acuosa de carbonato sódico al 5% para conseguir mayor contraste.
6. Lavar con agua destilada.

7. Deshidratar y montar los cortes como en el método - al cromato de plata.

Critica del método. Este método tiene la ventaja de no provocar la formación de precipitados superficiales, En cambio presenta dos inconvenientes considerables: es un proceso de larga duración y sólo aplicable a mamíferos.

PARA LA OBSERVACION DE LAS NEUROFIBRILLAS.

Las neurofibrillas se ponen de manifiesto mediante la impregnación argéntica.

Método con la plata amoniaca de Bielschowsky (aplicable a los cortes por congelación). Después de la fijación por el formol y someter al material a la acción de una solución de nitrato de plata, que actúa de mordiente, se consigue la impregnación de las neurofibrillas por reducción de un complejo de plata amoniaca. Los pasos de este método - pueden hacerse sobre los bloques o sobre los cortes obtenidos por congelación. La técnica de Gros-Schultze, es aplicable exclusivamente a cortes hechos por congelación.

Técnica de Gros-Schultze.

Reactivos:

- Mezcla de Golgi (para fijar rápidamente).
 - solución acuosa saturada de
 - ácido arsénico 1 vol.
 - formol neutro al 20% 1 vol.
 - alcohol de 96° 1 vol.
- Solución acuosa de nitrato de plata al 20%
- Complejo de plata amoniacal (7), pero empleando una solución de nitrato de plata al 20%
- Agua acética al 0.2%
- Solución para virar:
 - hiposulfito sódico 3 g
 - sulfocianuro amónico 3 g
 - agua destilada 100 ml
 - solución acuosa de cloruro de oro al 1% 1 a 10 ml

Fijación: Procedimiento lento: fijar con formol neutro al 20% durante un período que puede oscilar de los 8 días a varios años.

Procedimiento rápido: Fijar durante 1 hora con la mezcla de Golgi y pasar directamente a formol neutro al 20%, - en el que las piezas permanecerán de 2 a 3 días.

MODO DE EMPLEO:

1. Cortar por congelación.
2. Si el material ha sido fijado por el procedimiento lento, se dejará durante una hora en nitrato de plata, que actúa de mordiente; si se fijó por el procedimiento rápido, se dejará menos de una hora.
3. Pasar por varios baños sucesivos de formol diluido hasta que no quede ninguna aureola alrededor de los cortes.
4. Impregnar los cortes con el complejo de plata amoniacal al que se le habrá añadido antes de emplear un 10% de amoníaco. La impregnación debe seguirse con el microscopio; si es demasiado rápida, se aumentará la concentración de amoniaco del complejo argéntico; en caso contrario, habrá que disminuir dicha concentración.
5. Tratar los cortes con amoniaco diluido durante menos de un minuto.
6. Pasar por agua acética.
7. Virar con una solución de cloruro de oro.
8. Pueden teñirse los núcleos con el hemalumbre de Masson (9).
9. Lavar, montar en medio acuoso o bien deshidratar y montar en bálsamo.

Método al proteínato de plata. (Aplicable a cortes en parafina). Estos métodos permiten impregnar las neurofibrillas en cortes finos de parafina; con lo que es posible someter los cortes seriados alternativamente a impregnaciones argénticas y a otras tinciones.

Técnica de Bodian.

Reactivos:

- Baño de impregnación:

- protargol 1 g
- cobre metálico 4 a 6 g
- agua destilada 100 ml

(Esta solución sólo puede usarse una vez)

Reductor:

- hidroquinona 1 g
- sulfito sódico, anhidro 5 g
- agua destilada 100 ml

Solución de viraje:

- cloruro de oro 1 g
- agua destilada 100 ml
- ácido acético 3 gotas

Solución acuosa de ácido oxálico al 2%

Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%

Fijación. Este método es aplicable después de haber fijado el material por diversos métodos. Deben evitarse los líquidos fijadores que contengan tetróxido de osmio. Después de la fijación con el Helly y la poscromización se tratarán las piezas durante 24 horas por una solución acuosa de sulfito ácido de sodio al 5%.

La siguiente mezcla da excelentes resultados:

- | | |
|------------------|-------|
| - formol | 5 ml |
| - ácido acético | 5 ml |
| - alcohol de 80° | 90 ml |

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar con agua destilada.
2. Dejar los portaobjetos durante 12 a 48 horas en un baño de impregnación a 37°C.
3. Lavar con agua destilada.
4. Reducir con hidroquinona de 5 a 10 minutos.
5. Lavar varias veces con agua destilada.
6. Tratar los cortes con la solución de viraje hasta que se decoloren (algunos minutos).
7. Lavar con agua destilada.

8. Tratar con ácido oxálico hasta que los cortes vuelven a adquirir coloración (algunos minutos).
9. Lavar con agua destilada.
10. Fijar durante 5 minutos con hiposulfito sódico.
11. Lavar con agua destilada.
12. (Posible tinción de contraste con el azán).
13. Deshidratar.
14. Montar.

Crítica del método. La ventaja que representa poder hacer la impregnación de cortes seriados es contrarrestada por la inconstancia de los resultados que se obtienen con este método, que depende en gran parte de la calidad del protargol empleado.

Método con nitrato de plata. (Aplicación en cortes). - La impregnación de las neurofibrillas puede hacerse con el nitrato de plata; en este caso, a diferencia de lo que ocurre con el método del proteinato de plata, los resultados no dependen de la calidad, dudosa a veces, del reactivo. La técnica de Holmes (1947) puede aplicarse en los cortes de parafina, celoidina u obtenidos por congelación e incluso, para bloques pequeños, puede hacerse in toto.

Técnica de Holmes.

Reactivos:

- Solución acuosa de nitrato de plata al 20%
- Baño de impregnación a pH 8,4 (preparación antes de usar).
- solución acuosa de ácido bórico
al 12,4 g/l 55 ml
- solución de borato sódico
(10 H₂O) a 19 g/l 45 ml
- agua destilada hasta completar los 494 ml
- solución acuosa de nitrato de
plata al 1% 1 ml
- solución acuosa de piridina al 10% 5 ml

(Agitar esta solución que sirve una sola vez).

Reductor:

- Hidroquinona 1 g
- Sulfito sódico cristalizado 10 g
- Agua destilada 100 ml

Baño de viraje:

- Solución acuosa de cloruro de oro al 0,2%
- Solución acuosa de ácido oxálico al 2%
- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%

Fijación: Puede emplearse la mayor parte de los fijadores, salvo los que contengan tetróxido de osmio ó bicromato potásico. La presencia de sublimado en el tejido es favorable.

El formol sublimado es un excelente fijador:

- | | |
|-----------------------------------------|-------|
| - Formol | 10 ml |
| - Solución acuosa saturada de sublimado | 90 ml |

El Halmi resulta interesante para el estudio de las correlaciones entre el sistema nervioso y algunas glándulas endocrinas.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, hidratar y, si se ha fijado a base de sublimado, habrá que eliminar los posibles precipitados.
2. Tratar con nitrato de plata, en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 12 horas.
3. Lavar tres veces sucesivas con agua destilada.
4. Someter el material al baño de impregnación a 37°C, de 12 a 36 horas.
5. Secar los cortes.
6. Tratar con el reductor a 25°C durante 2 min.

7. Lavar con agua corriente durante 3 minutos.
8. Pasar por agua destilada.
9. Virar con el oro hasta que los cortes queden decolorados (unos 3 min. aproximadamente).
10. Lavado rápido con agua destilada.
11. Tratar con ácido oxálico, de 2 a 10 minutos hasta que los axones queden teñidos de azul negro.
12. Lavar con agua destilada.
13. Pasar por el hiposulfito sódico durante 5 minutos.
14. Lavar con agua corriente.
15. Deshidratar.
16. Montar.

Método de doble impregnación (nitrato de plata proteínato de plata) aplicable en cortes (Fitzgerald, 1964). El método debe aplicarse, por el proteínato de plata, y a continuación, el protargol.

Reactivos:

- Solución acuosa de nitrato de plata al 10%
- Baño de impregnación de protargol, debe prepararse antes de cada uso: solución acuosa al 2% de protargol 5 o de proteínato de plata.

Reductor:

- Hidroquinona 1 g
- Sulfito sódico cristalizado 10 g
- Agua destilada 100 ml

Baño de viraje:

- Cloruro de oro 0.5 g
- Agua destilada 100 ml
- Acido acético 1 gota

Alcohol anilado:

- Alcohol de 50° 100 ml
- Anilina 3 gotas
- Solución acuosa de ácido oxálico al 2%
- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%

Fijación. La elección del fijador debe hacerse según los elementos que interese impregnar.

Para los nervios periféricos:

- Solución saturada de ácido pícrico
en alcohol de 90° 70 vol.
- Formol comercial 25 vol.

- Acido acético 5 vol.

Para el sistema nervioso central:

- Solución saturada de ácido pícrico
en alcohol de 90° 70 vol.

- Formol comercial 25 vol.

- Acido tricloracético 5 g.

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, no colodionar, hidratar durante 20 a 30 minutos con agua destilada.
2. Impregnar con la solución de nitrato de plata a 56°C. Durante 1, ½ a 2 horas para los nervios periféricos. Y durante 4 horas para el sistema nervioso central, órganos de los sentidos o embriones.
3. Lavar los cortes en 3 baños sucesivos de agua destilada de 1,5 minutos cada uno.
4. Doble impregnación mediante un baño en protargol a 37°C durante 18 horas.
5. Lavar con agua destilada de 5 a 10 segundos.
6. Reducir durante 3 a 5 minutos.
7. Lavar 10 minutos con agua corriente.
8. Lavado rápido con agua destilada.

9. Tratar el material por el baño de viraje durante 10 minutos.
10. Lavar dos a tres minutos.
11. Aumentar la "tinción" durante 30 segundos en alcohol anilina (para los nervios periféricos) o en ácido oxálico durante 4 a 5 minutos (para el sistema nervioso central, órganos de los sentidos y embriones)
12. Lavar durante uno o dos minutos.
13. Pasar por el hiposulfito.
14. Lavar.
15. Deshidratar.
16. Montar.

Crítica del método. Esta técnica ha sido empleada principalmente en mamíferos, y proporciona resultados más constantes que con el método de Bodian; las imágenes que se obtienen son comparables a las obtenidas en condiciones óptimas con la técnica de Bodian.

Método de Ramón y Cajal con nitrato de plata (aplicable en bloque). Este método y sus variantes deben aplicarse en bloques. El depósito de plata metálica a nivel de las neurofibrillas se consigue con una impregnación con nitrato de plata seguida de una reducción llevada a cabo por un revelador fotográfico.

Método de la plata amoniaca.

Reactivos:

- Solución acuosa de nitrato de plata al .1,5%

Reductor:

- Hidroquinona o ácido pirogálico 1 g
- Agua destilada 100 ml
- Formol 10 ml

Baño de viraje (facultativo):

- Solución acuosa de cloruro de oro al 2%
- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%

Fijación: Fijar durante 24 horas en la mezcla siguiente:

- Alcohol de 95° 50 ml
- Amoniaco 4 ó 5 gotas en general; en el caso del cerebro y terminaciones nerviosas son sólo 2 ó 3 - gotas.

MODO DE EMPLEO PARA LA IMPREGNACION:

1. Después de 24 horas de fijación, lavar rápidamente los bloques.

2. Impregnar con nitrato de plata a 37°C, de 5 a 7 días
3. Lavar rápidamente con agua destilada.
4. Tratar con el reductor durante 24 horas.
5. Lavar con agua destilada.
6. Puede someterse el material a viraje durante 3 a 5 minutos en cloruro de oro, lavar rápidamente con agua destilada y fijar durante 1 minuto con el hipo sulfito sódico seguidamente lavar.
7. Deshidratar.
8. Montar.

Crítica del método. La tinción de las neurofibrillas es muy selectiva; pero a veces resulta incompleta, sobre todo cuando se trata del sistema nervioso periférico.

DEMOSTRACION DE LAS VAINAS DE MIELINA.

La localización de las vainas de mielina en los vertebrados y en determinados moluscos constituye un método de estudio estructural del sistema nervioso, teniendo en cuenta que, gracias a ciertas particularidades químicas, este método permite reconocer las fibras nerviosas en degeneración.

Método de Woelcke (1942).

Fijación: Fijar en formol, de 6 a 15 días.

Reactivos:

- Solución acuosa de alumbre férrico al 2,5%
- Hematoxilina litinada de Weigert:
 - solución alcohólica madurada de hematoxilina (10) al 10% 10 vol.
 - agua destilada 90 vol.
 - solución acuosa saturada de carbonato de litio 7 vol.

(Preparar antes de usar). Agitar fuertemente la solución antes de su empleo.

- Solución acuosa saturada de carbonato de litio.
- Aclarante de Río-Hortega (5).

MODO DE EMPLEO:

1. Desparafinar, colodionar e hidratar los cortes en parafina, previamente pegados a los portaobjetos con albúmina, o bien emplear cortes en celoidina.
2. Tratarlos durante 12 horas con alumbre férrico, que actúa de mordiente.
3. Lavado rápido con agua destilada (2 baños).

4. Tratar los cortes con hematoxilina de Weigert, como mínimo durante 5 horas, agitando los portaobjetos - cada hora.
5. Observación de los cortes: si ha habido un exceso - de tinción, se puede amortiguar tratando los cortes con el carbonato de litio, de 30 a 60 minutos; sin lavado previo, trasladar los cortes a la hematoxilina durante 30 minutos.
6. Lavado rápido con agua destilada (2 baños).
7. Lavado con alcohol de 80° hasta que deje de elimi-- narse colorante.
8. Pasar a alcohol de 95° y después rápidamente por alcohol absoluto.
9. Aclarar con el líquido de Río-Hortega.
10. Montar en bálsamo.

Resultados. Las vainas de mielina quedan teñidas en - azul-negro.

Tinción selectiva de las vainas de mielina en degeneración waleriana. Método de Marchi. Cuando las vainas de mielina de nervios en degeneración se tratan con una solución de tetróxido de osmio más un oxidante, sufren un enegreci-- miento que no se manifiesta en las vainas de los nervios sa

nos; en este principio se basa el método de Marchi, destinado a aplicar en bloque.

Método de Marchi.

Reactivos:

- Líquido de Müller (4)
- Solución acuosa de tetróxido de osmio al 1%

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar las piezas en el líquido de Müller, de 3 a 5 días.
2. Lavar con agua corriente durante varias horas.
3. Tratar durante 5 a 14 días con la siguiente mezcla, preparada antes de usar:

- solución de tetróxido de osmio	1 vol.
- líquido de Müller	2 vol.
4. Incluir en celoidina.

Critica del método. Los resultados obtenidos con el método de Marchi son de delicada interpretación, ya que no todos los elementos teñidos en negro presentan forzosamente los "corpúsculos granulados", formaciones características de la degeneración; este método sólo es aplicable en el caso de que el estado de degeneración sea bien definido. Si -

se aplica en un estado demasiado avanzado, los resultados obtenidos son negativos y los cordones degenerados sólo pueden detectarse mediante las técnicas clásicas de tinción de la mielina; también hay que tener en cuenta que antes de la aparición de los corpúsculos granulosos (tercera semana), el estudio de la degeneración mielínica requiere otras técnicas especiales.

Método de Donaggio. En la fase que precede a la aparición de los corpúsculos granulosos, las fibras mielínicas poseen metacromasia. Los posibles métodos a emplear para observarlas difieren por la naturaleza del colorante empleado. A continuación se describirá el método que emplea el azul de toluidina.

Método de Donaggio.

Reactivos:

- Líquido de Müller (4)
- Solución acuosa de azul de toluidina al 0,5%
- Solución acuosa de molibdato amónico al 4%, añadiéndole antes de emplear, 4 gotas de ácido clorhídrico por 100 ml de solución.
- Solución de permanganato potásico al 1% en agua destilada.

- Líquido para blanquear, preparado antes de su

empleo:

- | | |
|--------------------|--------|
| - Acido oxálico | 1 g |
| - Sulfito potásico | 1 g |
| - Agua destilada | 200 ml |

MODO DE EMPLEO:

1. Emplear materiales fijados con el líquido de Müller o con bicromato potásico al 3%, como mínimo durante tres meses.
2. Incluir en celoidina. Obtener cortes de 15 micras.
3. Pasar los cortes en agua destilada.
4. Teñir durante 1 hora con azul de toluidina.
5. Pasar rápidamente por agua destilada.
6. Tratar durante 1 minuto con molibdato amónico.
7. Lavar con agua destilada durante 2 minutos.
8. Diferenciar con permanganato potásico.
9. Lavar con agua.
10. Tratar con el líquido blanqueador.
11. Observar los resultados de la diferenciación y, si es conveniente, someter de nuevo el material al tratamiento con permanganato.

12. Lavar con agua destilada.

13. Deshidratar.

14. Montar.

Resultados. Las fibras en degeneración presentan una metacromasia púrpura.

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA NEUROGLIA.

El tejido de relleno de los centros nerviosos o neuroglia, está íntimamente mezclado con las neuronas. Los métodos histológicos clásicos permiten estudiar algunos de sus componentes (núcleos, etc.); pero para diferenciar las diversas categorías de células de neuroglia, es preciso conocer su morfología celular, y para ello aplicar métodos de impregnación bastante específicos.

Indicaremos algunos de los métodos existentes para poner de manifiesto las células de macroglia (astrocitos protoplasmáticos, astrocitos fibrosos), las células gliares perivasculares, distinguiéndolas de las células de microglia, o de oligodendroglia.

Métodos de Río-Hortega (para cortes por congelación).- La impregnación de la neuroglia puede conseguirse empleando

el carbonato de plata amoniacal, previo al tratamiento de los cortes con bromuro amónico, que actúa de mordiente y que se introduce en el fijador.

Entre las diferentes técnicas propuestas por Rio-Hortega, citaremos dos que están aplicadas: una de ellas, para poner de manifiesto los astrocitos, y la otra, para la demostración de los elementos de la glia perivascular y de la neuroglia. Ambas técnicas difieren en el grado de dilución del baño de impregnación.

Reactivos:

Reductor:

- Formol neutro (2) al 1%

Baño de viraje:

- Solución acuosa al 0,2% de cloruro de oro.

- Solución acuosa de hiposulfito sódico al 5%

- Solución acuosa de amoniaco al 1,7%

- Solución de carbonato de plata amoniacal:

Solución débil y solución concentrada preparadas de la siguiente manera:

	solución débil	solución concentrada
- solución acuosa de nitrato de plata al 10%	50 ml	100 ml
- solución acuosa saturada de carbonato de litio	150 ml	0
- solución acuosa al 5% de carbonato sódico	0	300 ml
- recoger el precipitado formado y lavarlo 3 veces con agua destilada y <u>redissolver</u> lo añadiendo la cantidad <u>exactamente necesaria</u> de amoníaco concentrado.		
- finalmente añadir agua destilada	750 ml	100 ml

a) Para poner de manifiesto los astrocitos.

Fijación. Fijar pequeños fragmentos del material en bromo-formol de Ramón y Cajal:

- formol neutro (2) 15 ml
- bromuro amónico 2 g
- agua destilada 85 ml

La duración de la fijación es de 2 a 10 días para los astrocitos protoplasmáticos y de 3 semanas a varios meses, para los astrocitos fibrosos.

Hay que efectuar inmediatamente la "hiperbromización", tratando los materiales con bromo-formol durante 10 minutos en caliente.

Cortes: Cortar por congelación (espesor: 20 a 25 micras).

MODO DE EMPLEO:

1. Pasar los cortes obtenidos por congelación a una solución amoniacal; se dejarán en la misma de 5 a 10 minutos.
2. Lavar los cortes con 3 ó 4 baños de agua destilada.
3. Impregnar con carbonato de plata (solución débil) - previamente calentado a 45°; dejarlos en este baño de impregnación hasta que adquieran una tonalidad pardo oscura (de 3 a 5 minutos aproximadamente). La selectividad de este método puede incrementarse añadiendo unas gotas de piridina en el baño de carbonato de plata.
4. Lavar rápidamente con agua destilada.

5. Reducir con formol, sin agitar, durante unos dos minutos.
6. Lavar rápidamente con agua destilada.
7. Virar con el cloruro de oro; primero, en frío y después a una temperatura de 40° a 50°C, hasta que los cortes adquieran una tonalidad violácea.
8. Pasar por el hiposulfito durante un minuto.
9. Lavar con agua destilada.
10. Deshidratar.
11. Montar.

b) Para poner de manifiesto la glia perivasculare y la microglia.

Fijación. Fijar pequeños fragmentos del material en bromol-formol de Ramón y Cajal, de 1 a 3 días.

Efectuar la "hiperbromización" como en la técnica anterior.

Cortes: Obtención de cortes por congelación (20 a 25 micras).

MODO DE EMPLEO:

1. Pasar los cortes por una solución amoniaca! durante 5 a 10 minutos.
2. Pasar los cortes a la siguiente solución:
 - piridina 1 vol.
 - amoniaco 1 vol.
 - agua destilada 1 vol.dejar los cortes en esta solución de 1 a 24 hrs.
3. Lavar muy rápidamente en dos baños de agua destilada (3 a 5 segundos), sin eliminar completamente la piridina.
4. Impregnar con carbonato de plata (solución concentrada) pasando los cortes por 2 ó 3 baños, de 2 a 5 minutos.
5. Lavar muy rápido en agua destilada (3 a 5 segundos)
6. Seguir el proceso como en el caso anterior, a partir de la reducción (etapa 5 del modo de empleo).

Método de Ramón y Cajal con sublimado de oro, para los astrocitos protoplasmáticos.

Fijación. Fijar pequeños fragmentos del material con bromo-formol, de 2 a 6 días aproximadamente, un mes como máximo.

Cortes: Obtención de cortes por congelación (20 a 25 - micras).

Reactivos:

Baño de impregnación, a preparar antes de usar:

- Bicloruro de mercurio
cristalizado 0.5 g
- Solución acuosa de cloruro
de oro al 1% 10 ml
- Agua destilada 50 ml

Disolver el bicloruro de mercurio en caliente y después añadir la solución del cloruro de oro. Es imprescindible - que los reactivos sean de calidad excelente.

Baño de fijación:

- solución acuosa de hiposulfito
sódico al 10% 20 ml
- solución normal de bisulfito
sódico 5 gotas

MODO DE EMPLEO:

1. Lavar los cortes con agua destilada.

2. Impregnar los cortes en la oscuridad hasta que adquieran una tonalidad uniforme púrpura.

El éxito de la impregnación depende a la vez del tiempo y la temperatura. Aparte de estos factores, la impregnación óptima dependerá de la región del sistema nervioso y de la especie animal. La permanencia de los cortes en el baño de impregnación puede oscilar de las 4 a las 8 horas y la temperatura puede ser de los 18° a los 25°C. Para material procedente de invertebrados, las temperaturas adecuadas pueden elevarse hasta alcanzar los 32°C. A partir de la cuarta hora de permanencia de los cortes en el baño de impregnación, ésta deberá vigilarse con el microscopio: Se sacarán periódicamente los cortes y se pondrán provisionalmente en agua destilada para hacer la observación.

3. Lavar cuidadosamente los cortes con agua destilada.
4. Pasar por el baño de fijación, de 5 a 10 min.
5. Lavar con alcohol de 70°, pegar los cortes al portaobjetos y secarlos.
6. Deshidratar.
7. Transparentar los cortes con esencia de orégano.
8. Montar.

Resultados. Los astrocitos protoplasmáticos quedan teñidos de rojo púrpura; las neuronas, de rosa o violeta claro y las fibras nerviosas permanecen incoloras.

Método de Golgi-Río-Hortega, con cromato de plata, para poner de manifiesto la oligodendroglia (en bloque). Este método es una variante del método de impregnación con el cromato de plata de Golgi, la única diferencia está en la mezcla fijadora.

Fijación. Fijar pequeños fragmentos del material durante 2 a 3 días con la siguiente mezcla:

- bicromato potásico	3 g
- hidrato de cloral	2 a 5 g
- formol al 10%	50 ml

Hay que renovar el fijador diariamente.

Reactivo:

- Solución acuosa de nitrato de plata al 1,5%

MODO DE EMPLEO:

1. Después de la fijación, lavado rápido del material en agua destilada.
2. Impregnación con la solución de nitrato de plata, de 2 a 5 días.

3. Deshidratación rápida, cortar y montar, como ya se ha indicado a propósito del método original del cromato de plata.

Método de impregnación para células de Purkinje de Cajal.

Reactivos:

- Nitrato de plata piridinado.
 - nitrato de plata al 2% 15 cc
 - piridina 6 a 8 gotas
- Baño reductor
 - hidroquinona pura 0.3 g
 - formol 30 cc
 - agua destilada 70 cc

MODO DE EMPLEO:

1. Las piezas de cerebelo, fijadas normalmente, se pasan en formol al 14%, por cuatro días o más. Pueden servir piezas fijadas hasta de un año.
2. Hacer cortes gruesos por congelación, entré 30 y - 40 micras.
3. Recoger los cortes en agua formálica.
4. Lavar dos veces en agua destilada.

5. Sumergir los cortes inmediatamente en una solución de nitrato de plata piridinada, de 4 a 8 horas, a la temperatura ordinaria, o algunos minutos bajo el calor de la lámpara, hasta que tomen un color ta bajo oscuro.
6. Colocar los cortes en alcohol de 96°, de dos a tres segundos.
7. Trasladar los cortes al baño reductor y lavar abundantemente.
8. Deshidratar en alcohol de 96°
9. Aclarar con creosota.
10. Cubrir con bálsamo de Canadá ó resina.

Resultados. Las células de Purkinje se tiñen de café - oscuro, y el fondo queda amarillento con otros elementos di fusos.

Método de impregnación al cloruro de oro de Ruffini pa ra terminaciones nerviosas.

1. Sumergir fragmentos frescos de tejido en una solución al 20% de ácido fórmico, agitando con frecuencia hasta que adquieran transparencia, aproximadamente de 10 a 30 minutos; el tiempo depende del gro

- sor del fragmento. Del acierto de la exacta permanencia en este baño depende el éxito de la reacción.
2. Secar los fragmentos, primero en papel filtro y luego en un paño limpio.
 3. Colocar los fragmentos en cloruro de oro al 1% por 20 ó 30 minutos, protegiéndolos de la acción de la luz directa.
 4. Secarlos en un paño limpio.
 5. Introducirlos en ácido fórmico al 20% en la oscuridad por 24 horas. La cantidad de líquido debe ser la estrictamente precisa para cubrir deficientemente las piezas.
 6. Secar las piezas en un paño limpio.
 7. Sumergirlos en glicerina, durante 8 días, expuestos a la luz difusa.
 8. Hacer la disociación del tejido en un portaobjetos.
 9. Cubrir con glicerina.

Resultados. Las terminaciones nerviosas se tiñen de negro.

Notas:

- a) Para trabajos en animales en época fetal, o verte-

brados inferiores, se rebaja la concentración del ácido fórmico al 10 ó 15%.

b) En caso de impregnación excesiva se decolora en solución acuosa de ferrocianuro de potasio al 1%, diluido en glicerina, después lavar abundantemente en agua.

c) Se puede contrateñir con carmín.

d) Da magníficos resultados en terminaciones de pelo, músculo y periostio.

Método de la plata hiperfuerte de Llombart para terminaciones nerviosas y corpúsculos sensitivos.

Reactivo:

- Carbonato de plata hiperfuerte:

Mezclar nitrato de plata al 10% con carbonato de sodio a saturación hasta que dejé de formarse precipitado. Lavar repetidas veces el precipitado con abundante agua destilada hasta que el agua quede limpia (mínimo 3 veces). Disolver el precipitado añadiendo amoníaco gota a gota y evitando su exceso. Añadir agua destilada hasta que la solución quede aproximadamente al 10%. Hacer con una pequeña cantidad de plata (1 g), lo indicado en los dos primeros pasos, y el precipitado lavado se añadirá al carbonato anteriormente preparado, asegurando así la neutralización del amoníaco

que pueda haber en exceso. La utilización del carbonato de plata hiperfuerte exige filtrado previo.

MODO DE EMPLEO:

1. Fijar en formol al 10%, de 8 a 15 días.
2. Hacer cortes por congelación.
3. Lavar 3 veces en agua destilada.
4. Sumergir los cortes en agua destilada con piridina (60 a 70 cc de agua con 20 ó 30 gotas de piridina), durante 15 minutos o más.
5. Lavar abundantemente en agua destilada, 3 ó 4 veces.
6. Sumergir los cortes en nitrato de plata al 20% por 24 horas, a temperatura ambiente.
7. Pasar los cortes de uno en uno por formol al 25%, - dispuesto en varios pocillos, hasta que dejen de - formarse nubes blancas de precipitado. La operación de cambiar los pocillos se realiza con rapidez, pa- - rã evitar el precipitado sobre los cortes; usar - - tres o cuatro pocillos, con 10 a 25 cc de formol -- neutro en proporción de una parte de agua corriente por dos o tres de agua destilada (dependiendo de la sobrecarga cálcica del agua ordinaria).
8. Pasar los cortes a la plata hiperfuerte de la si- - guiente manera: Una vez que los cortes están en for

mol transparente se pasan a la plata hiperfuerte recién filtrada y dispuesta en dos pocillos, a los que se añadió amoniaco en la siguiente proporción: 5 cc de plata hiperfuerte más tres gotas de amoniaco en el pocillo 1; 5 cc de plata hiperfuerte más dos gotas de amoniaco en el pocillo 2. Con el objeto de evitar que los cortes arrastren exceso de formol se escurren brevemente en papel filtro. Se pasan los cortes del pocillo 1 al 2 cuando comienzan a adquirir tono amarillo vivo, y permanecen en éste un tiempo variable, que oscila entre 2 minutos, y 2 horas (con aconsejable control microscópico).

9. Lavar ligeramente con agua destilada.
10. Diferenciar en una solución débil de ácido acético en 2 pocillos, conteniendo ambos 10 cc de agua más 20 gotas de ácido acético.
11. Lavar rápidamente en agua destilada.
12. Sumergir los cortes en cloruro de oro al 1x500 con una gota de ácido acético por cada cc de cloruro de oro.
13. Fijar en hiposulfito de sodio al 3%, de 10 a 15 segundos.
14. Lavar abundantemente con agua destilada.
15. Deshidratar con alcohol de 96°
16. Aclarar con creosota.

17. Cubrir con bálsamo de Canadá o resina.

Resultados. Los corpúsculos sensitivos y nervios se ti
ñen de negro.

A P E N D I C E

REACTIVOS GENERALES PARA LAS TECNICAS HISTOLOGICAS
Y SU PREPARACION.

(1) Líquido de Baker:

- | | |
|--------------------------------------------------------|-------|
| - formol neutro (2) | 10 ml |
| - solución acuosa de cloruro
cálcico anhidro al 10% | 10 ml |
| - agua destilada | 80 ml |

(2) Formol neutro:

El Formol neutro" forma parte de numerosos líquidos fijadores.

La solución de formaldehído es inestable y el ácido fórmico que resulta de esta inestabilidad debe neutralizarse con unas gotas de una solución de sosa o carbonato sódico.- La neutralización se comprueba con papel indicador de pH.

La conservación de la solución neutralizada es mejorada considerablemente en presencia de un exceso de carbonato cálcico.

(3) Líquido de Gendre:

- alcohol de 95° saturado de

ácido pícrico	80 ml
- Formol	15 ml
- Acido acético	5 ml

(4) Líquido de Müller:

- bicromato potásico	2,5 g
- sulfato sódico	1 g
- agua destilada	100 ml

Tiene que prepararse en el momento de usarla y no se conserva.

(5) Aclarante de Río-Hortega:

- toluol	80 ml
- creosota de haya	10 ml
- ácido férrico	10 ml

(6) Azul policromo:

(fórmula de Roques y Jude)

(se prepara en frío).

Mezclar en un mortero:

- alcohol metílico puro	100 ml
- azul de metileno	0,4 g
- eosina hidrosoluble	0,4 g

Dejar esta solución en reposo durante 24 horas y después añadir 100 g de glicerina.

Advertencia. Hay soluciones comerciales de excelente calidad.

(7) Complejo de plata amoniacal.

(Fórmula de Fontana)

(preparación en frío):

Se hace precipitar una solución acuosa de nitrato de plata al 5%, añadiéndole amoniacal; se va añadiendo más amoniacal hasta que el precipitado se redisuelva; entonces se añadirán unas gotas de nitrato de plata al 5% en solución acuosa hasta que haya un enturbiamiento persistente; la solución no debe tener olor a amoniacal. Dejar reposar la solución antes de emplear.

Advertencia importante. La preparación de este reactivo requiere de ciertos cuidados; hay que agitar suavemente la solución y añadir gota a gota los diversos reactivos, de manera que no se sobrepase la cantidad óptima.

En frío y en la oscuridad puede conservarse varios meses.

(8) Fucsina de Ziehl.

(preparación en frío):

1. Preparación de la solución madre:

Machacar en un mortero:

- fucsina básica	1 g
- ácido fénico	5 g
- alcohol de 95°	10 ml

añadiendo progresivamente:

- agua destilada	90 ml
------------------	-------

Dejar sedimentar durante una hora y filtrar.

Conservación ilimitada.

Advertencia. Existen soluciones comerciales.

2. Preparación de la solución diluida:

- fucsina de Ziehl, solución madre	30 ml
- agua destilada	70 ml

No se conserva.

(9) Hemalumbre (fórmula de Masson)

(preparación en caliente):

- hematefna	0,2 g
- alumbre potásico	5 g
- agua destilada	100 ml

Hacer hervir, dejar enfriar y filtrar;

añadir:

- ácido acético 2 ml

Se conserva alrededor de un mes.

(10) Hematoxilina solución madre

(preparación en frío):

- hematoxilina 10 g

- alcohol de 95° 100 ml

Esta solución debe "madurar" (envejecer) durante - unos tres meses; cuando la solución ha madurado demasiado, - puede corregirse este exceso por adición de una solución - más recientemente preparada. También es posible hacer madu- - rar artificialmente una solución añadiéndole exactamente - 0,2 g de yodato potásico por gramo de hematoxilina (procedi- - miento de Mayer).

(11) Hematoxilina de Regaud

(preparación en frío):

- solución madura de
hematoxilina (10) 10 ml

- glicerina 10 ml

- agua destilada 80 ml

Conservación indefinida.

(12) Magenta

(preparación en frío):

- solución saturada de magenta
en alcohol de 95° 20 ml
- agua destilada 80 ml

Conservación ilimitada.

(13) Picroindigocarmin (líquido de Calleja)

(preparación en frío):

- Carmin de indigo 0,2 a 0,4 g
- solución acuosa saturada
de ácido pícrico 100 ml

Dejar sedimentar y después filtrar.

Se conserva unos 6 meses.

REACTIVOS GENERALES PARA LOS METODOS DE PLATA.

Los reactivos que se utilizan en los métodos argénticos son comunes a la mayoría de ellos. Se describe aquí la preparación de los reactivos más usados.

Carbonato de plata amoniacal

a) solución débil:

- nitrato de plata al 10%	5 cc
- carbonato de sodio al 5%	15 cc
- amoníaco	5 a 10 gotas aproximadamente
- agua destilada	55 cc

b) solución mediana:

- nitrato de plata al 10%	5 cc
- carbonato de sodio al 5%	15 cc
- amoníaco	5 a 10 gotas aproximadamente
- agua destilada	20 cc

c) solución fuerte:

- nitrato de plata al 10%	5 cc
- carbonato de sodio al 5%	15 cc
- amoníaco	5 a 10 gotas aproximadamente

Las soluciones de carbonato de sodio al 5% y nitrato de plata al 10%, se preparan por separado.

Es conveniente que el carbonato de sodio sea una solución vieja (más de tres meses) y el nitrato de plata reciente,

Nitrato de plata al 10%

- nitrato de plata	1,5 g
- agua destilada	10 cc

Carbonato de sodio al 5%

- carbonato de sodio anhidro o monohidratado	1,5 g
- agua destilada	30 cc

Para usar, se mezclan las dos soluciones en un frasco ámbar, resultando un precipitado blancuzco que se disolverá añadiendo amoníaco gota por gota, sin excederse, el reactivo no debe oler a amoníaco, para asegurarse puede dejarse un poquito de precipitado y usar solamente la solución. Se agrega la cantidad de agua necesaria para preparar la solución débil, mediana o fuerte.

Nota: Cuando no se indique otra cosa el carbonato que se emplea es el mediano.

Nitrato de plata al 2%

- nitrato de plata	1 g
- agua destilada	50 cc

Hiposulfito de sodio al 5%

- hiposulfito de sodio	50 g
- agua destilada	1000 cc

Cloruro de oro al 1x500 (para métodos de rutina)

- cloruro de oro amarillo	1 g
- agua destilada	500 cc

Lavar con agua destilada la cápsula en donde viene el cloruro de oro, abrirla como ampolleta e introducirla completa a una botella color ámbar que contenga 500 cc de agua destilada, agitar suavemente. Puede guardarse por mucho tiempo filtrándolo antes de usarlo.

Cloruro de oro al 1% (para métodos especiales)

- cloruro de oro amarillo	1 g
- agua destilada	100 cc

Se prepara como el anterior.

Agua amoniacal

- agua bidestilada 40 cc
- amoníaco 4 gotas

Oxido de plata amoniacal

- nitrato de plata al 10% 30 cc
- hidróxido de sodio al 40% 15 gotas
- agua destilada 50 cc
- amoníaco lo necesario
- agua destilada para completar 150 cc

Al mezclar el nitrato de plata con el hidróxido de sodio se formará un precipitado que se lava de 10 a 12 veces con agua destilada (aproximadamente 11). Se añaden 50 cc de agua destilada y se disuelve el precipitado con amoníaco, - agitando con una varilla de cristal, sin excederse. Se completa con agua destilada un volumen de 150 cc. Se guarda la solución en un frasco ámbar en la oscuridad.

REGLAS GENERALES PARA LOS METODOS DE PLATA.

Los métodos de impregnación argéntica son poco utilizados no obstante su gran utilidad, sobre todo porque requieren de una serie de precauciones que no todos conocen o que no se siguen estrictamente.

A continuación se dan las reglas indispensables para el manejo de los métodos argénticos.

1. Emplear siempre agua destilada o bidestilada.
2. El manejo de los cortes será siempre con asas de vidrio.
3. Tener los pocillos limpios y perfectamente secos antes de usarlos.
4. El nitrato y el carbonato de plata, así como el cloruro de oro, se colocan siempre en pocillos de Rio-Hortega (10 cc).
5. Para permanganato de sodio, ácido oxálico, hiposulfito de sodio y alcohol, emplear vasos de 40 ó 50 cc.
6. El agua destilada y el formol al 1 ó 10% deben colocarse en cajas de Petri.
7. Se deben comprobar sobre fondo blanco y negro que -

las soluciones de plata están libres de precipitados, antes de poner en ellas los cortes.

8. Nunca se deben pasar las asas de vidrio del ácido oxálico, hiposulfito de sodio o permanganato de potasio a las soluciones de oro y plata, se deben lavar antes o de lo contrario se formará precipitado.
9. El nitrato y el carbonato de plata se deben tapar siempre que se calienten o deban permanecer algún tiempo en los pocillos, para evitar la formación de precipitados.
10. Cuando se tapa un pocillo que contenga soluciones de plata, se utiliza un vidrio de reloj, llenando el pocillo de manera que sólo quede una burbuja de aire entre el vidrio y el pocillo, para poder agitar sin necesidad de destapar.
11. Nunca se debe calentar demasiado, los pocillos no deben quemar al tomarlos con los dedos, la lámpara no debe estar exactamente debajo del pocillo sino hacia un lado, para evitar el calor directo de la flama.
12. Los pocillos deberán lavarse personalmente, para asegurarse que no se usaron durante el lavado sustancias corrosivas, en caso de hacer uso de ellas, tener especial cuidado en enjuagar muy bien.

Mezcla crómica.

La mezcla crómica se utiliza para la limpieza del material de cristalería que está sumamente sucio o manchado. Esto ocurre con frecuencia con el uso de los reactivos de plata o colorantes.

Mezcla crómica:

- bicromato de potasio	100 g
- agua destilada	1000 cc
- ácido sulfúrico concentrado	100 cc

Se disuelve en caliente el bicromato en el agua destilada cuando se ha enfriado se le agrega, gota a gota los 100 cc de ácido sulfúrico.

Cuando la cristalería está muy sucia se puede dejar 1 a 3 días en la mezcla, después se lava con agua y se sumerge en sosa o potasa diluida, durante un día; se lava bien con agua caliente, después con alcohol de 96° y finalmente se deja secar.

Método- Fijación sin poscromización:

1. Fijar piezas de 3 mm de grosos como máximo, durante 12 horas; si se ha fijado con líquido de Regaud, pueden estar 24 horas.

2. Lavar durante 24 horas las piezas en agua; este lavado puede efectuarse en tubos lavadores. Las piezas se colocan en tubos de vidrio abiertos por los dos extremos: uno se cierra con un tapón de corcho y el otro con un tul sujeto por un aro de caucho. Los tubos permanecerán en un cristizador con agua corriente (circulante); el tapón de corcho servirá de flotador. Si las mallas del tul son suficientemente grandes, la renovación de agua será correcta.

Si se tiene la precaución de renovar frecuentemente el agua (cada cuarto de hora en la primera hora, cada media hora durante las horas sucesivas) hasta que no quede, vestigios de bicromato, el lavado puede llevarse a cabo en un frasco. En los últimos lavados, el agua debe quedar totalmente incolora.

Sea cual fuere el procedimiento seguido, lo importante es que el lavado sea minucioso.

3. Lavar las piezas con agua destilada durante una hora, renovada varias veces.

Método- Fijación con poscromización:

1. Fijar como en el caso anterior.
2. Lavar rápidamente las piezas con agua destilada.
3. Dejar las piezas en una solución acuosa de bicromato potásico al 3%, a temperatura ambiente. Retirar por separado las piezas cada 24 horas, para tener una gama de tiempos de poscromización lo más completa posible.
4. Lavar las piezas como se ha indicado anteriormente: primero, con agua corriente; después, con agua destilada.

En ambos casos las piezas lavadas se conservan en formol salado, o bien se deshidratan con alcohol, empezando por un baño de alcohol de 70°.

C O N C L U S I O N E S

Las técnicas histológicas deben seguirse siempre de manera crítica, buscando las condiciones más adecuadas para cada caso particular, hasta lograr un resultado exitoso, considerando que son una herramienta científica que nunca ha sido estática y que siempre ofrece las posibilidades de evolucionar. Sin embargo, hay que evitar hacer variaciones supérfluas, tomando en cuenta que el autor de cada técnica ha comprobado a fondo las operaciones esenciales de su método.

Con frecuencia vemos fracasados nuestros intentos al realizar alguna técnica histológica obtenida de un libro o guía de técnicas, aún cuando nos apeguemos estrictamente a la metodología seguida por el autor; esto se debe en gran parte al desconocimiento de las condiciones y procedencia del material vivo, así como de los reactivos en diferente presentación y con diversos grados de pureza y esto representa el primer obstáculo para la obtención de buenos resultados, pues en general, ningún autor aclara la marca, y aun que lo hiciera, no están disponibles siempre, en todo tiempo y lugar idénticos productos. De manera que cualquier técnica que se intente por primera vez debe someterse a una serie de pruebas de ensayo y error, hasta obtener resultados

satisfactorios, y no caer en el error de condenar al primer intento la técnica.

R E S U M E N

El presente trabajo es una investigación bibliográfica, en el cual la información obtenida fue procesada usando como base el Método Científico.

Se verificaron las variables existentes en las Técnicas Histológicas, haciendo una correlación de datos; de los resultados obtenidos, de las Técnicas Histológicas, se seleccionaron aquellas más relevantes, ordenándolas y clasificándolas de la manera más conveniente para su fácil comprensión.

Además se uncluyó información general sobre el Tejido Nervioso, con el objeto de que se pueda profundizar en las técnicas.

Este manual permitirá a sus usuarios emprender con facilidad investigaciones de relativa dificultad.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Ann Preece, H. T. (ASCP) A Manual for Histologic Technicians, Thrid Edition 1972. United States of America.
- 2.- Armando A. Valencia Luna. 1982. Neuroanatomía, Neurofisiología Bases Biológicas de la Conducta. Editorial - - CECSA.
- 3.- Arthur C. Guyton. 1972. Anatomía y Fisiología del Sistema Nervioso. Primera Edición en Español. Nueva Editorial Interamericana. México.
- 4.- Claude A. Villee. 1981. Biología. Séptima Edición. Interamericana. México.
- 5.- Disbrey/Rack. 1970. Histological Laboratory Methods - - Edinburgh London, E.S. Livigstone.
- 6.- Elvira Estrada Flores-Leonor Peralta Zamora-Patricia Rivas Manzano. 1982. Manual de Técnicas Histológicas. Primera Edición. AGT Editor, S.A. México.
- 7.- Gretchen L. Humason. 1979. Animal Tissue Techniques. Fourth Edition. W. H. Freedman and Company, San Francisco.

- 8.- Gonzalo Gaviño/Juárez/Figueroa. 1982. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y Campo. Sexta Edición. - Limusa. México.
- 9.- José Luis Arévalo. 1972. Manual de Histología Humana. Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.
- 10.- Ham Arthur W. 1975. Tratado de Histología. Séptima Edición. Interamericana. México.
- 11.- L. C. Junqueira/J. Carneiro. 1981. Histología Básica. Segunda Edición. Salvat, S.A. México.
- 12.- Leeson y Leeson. 1982. Atlas de Histología. Interamericana. México.
- 13.- Moore L. Keith. 1983. Embriología Clínica. Segunda Edición. Interamericana. México.
- 14.- R. Martoja y M. Martoja-Pierzon. 1970. Técnicas de Histología Animal. Primera Edición. Tóray-Masson, S.A. España.
- 15.- Richard F. Thompson. 1982. Fundamentos de Psicología. Séptima reimpresión. Editorial Trillas. México.

- 16.- S. Ramón y Cajal/J.F. Tello y Muñoz. 1955. Elementos - de Histología Normal y de Técnica Micrográfica. Duodécima Edición. Editora Nacional. México.

- 17.- Weichert/Presch. 1981. Elementos de Anatomía de los Cordados. Segunda Edición. McGRAW-HILL. México.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 682/86

Srita. Marisela Plascencia Cruz
Presente. -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "Manual de Técnicas Histológicas para Tejido Nervioso" para obtener la Licenciatura en Biología con Orientación Recursos Naturales.

Al mismo tiempo informo a usted que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el M.V.Z. Miguel Carbajal Soria.



FACULTAD DE CIENCIAS

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 7 de 1986

El Director

Dr. Carlos Astengo Osuna

El Secretario

Dr. José Manuel Copeland Gardiel.

c.c.p. El M.V.Z. Miguel Carbajal Soria, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente de la alumna.

mjsd

BOULEVARD A TLAQUEPAQUE Y CORREGIDORA, S. R.,
GUADALAJARA, JAL.

TELEFONOS 17-58-29 Y 17-48-17

Al contestar este oficio muestre clar fecha y número

DR. CARLOS ASTENGO OSUNA
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
P R E S E N T E :

Estimado Dr. Astengo Osuna:

Por este medio comunico a usted que la SRITA MARISELA FLASCENCIA CRUZ, pasante de la Licenciatura en Biología, ha concluido satisfactoriamente el proyecto de tesis titulado:

" MANUAL DE TECNICAS HISTOLOGICAS PARA TEJIDO NERVIOSO"

Así mismo, le informo que he revisado el manuscrito de la tesis y considero que cumple con los requisitos establecidos por la Facultad y lo presentamos a su consideración.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Guadalajara, Jal., 27 de Abril de 1968

A T E N T A M E N T E



M.V.Z. MIGUEL CARBAJAL SORIA