

TÉCNICA SOBRE SISTEMA NERVIOSO

Con el fin de ilustrar á los alumnos acerca de los diferentes procedimientos que deben seguirse para las investigaciones sobre el sistema nervioso, procuraré exponerlos en líneas generales, abreviando por este medio, la tarea.

Extracción del cerebro en el adulto. — Hallándose el cadáver de espaldas, se coloca un zócalo escavado debajo de la nuca y por medio de un cuchillo fuerte se hace una incisión hasta el hueso, que comience justamente por encima de la inserción del pabellón auricular del lado derecho y termine en el punto simétrico opuesto. El colgajo anterior, se disecciona hasta el hueso y se echa sobre la región orbitaria, y el posterior, por el mismo procedimiento, hacia la nuca. Un corte circular horizontal divide á los músculos temporales y facilita el funcionamiento de la sierra de mano — la que á nuestro modo de ver es preferible al martillo — ó movida por la electricidad, que permite separar la calota, dejando al descubierto, la dura madre la que, á su vez, se corta con bisturí ó tijera siguiendo el plano de la incisión ó sea primera, así como al nivel de su inserción en la apófisis cristagalli. Se echa hacia atrás el colgajo formado por la dura madre y se procede al desprendimiento del encéfalo maniobrando en el orden siguiente: Una vez levantados ligeramente los lóbulos frontales y después de seccionadas las escasas venas que lo adhieren á la dura madre parietal, aparecen los llamados nervios olfatorios, los ópticos, vástago pituitario, carótida interna, los motores oculares comunes, los patéticos ⁽¹⁾ que se incinden con tijeras largas en ese orden. Para poder continuar con comodidad, es necesario cortar la tienda del cerebelo comenzando desde su inserción en las apófisis clinoides y siguiendo luego por el borde superior del peñasco hacia el occipital. Se continúa seccionando el trigémino, motores oculares externos, faciales, auditivos, glossofaríngeos y paquete del noveno, décimo y undécimo nervios, terminando la maniobra con la sección del bulbo y de las dos arterias vertebrales y con la pesada del órgano.

En el niño pequeño y en los viejos, existen adherencias entre la cara interna del hueso y la dura madre que dificultan la extracción del encéfalo. En estos casos se corta con tijeras la dura madre al nivel de la separación practicada por medio del serrucho y se desprenden juntos. Si se trata de embriones se usa, en vez de sierra la tijera; pero como en estos casos el tejido nervioso, muy blando, se destruye fácilmente, es de aconsejar el uso previo de una inyección de formol que obra rápidamente y que da ya á las 24 horas ó antes, según sea cerebro ó medula, una consistencia y fijación que permite extraerlos cómodamente y apto para su estudio, porque así, conserva mejor la configuración que tiene en el cráneo.

Si queremos extraer la medula, la operación también varía, ya se trate de un adulto ó de un embrión. En el primer caso se practica por el lado del

(1) Es menester no obrar con violencia porque estos nervios se cortan á la menor tracción que se les haga.

dorso una incisión longitudinal mediana que parta de la protuberancia occipital externa al coxis y separa piel y masa muscular de cada canaleta vertebral. Se seccionan las láminas vertebrales con un raquíotomo ordinario que es el que siempre hemos usado con resultado (1), se separan las apófisis espinosas por medio de pinzas (davier) y queda entonces la medula en descubierto. Para sacar el órgano hay que tomarlo con una pinza á diente al nivel de la dura madre y con ayuda de un escalpelo se disecciona cortando las raíces, ya sea antes de su confluencia ó bien cuando ya forman nervio, periférico, según se quiera ó no conservar los ganglios.

Cuando se trate de embriones ó de recién nacidos, se usará preferentemente, el escalpelo y la pinza, ó bien tijeras á extremidades romas.

Una vez extraído el sistema nervioso, debe colocarse inmediatamente, sin lavar, en el líquido fijador, que puede ser cualquiera de los recomendados (véase más adelante); pero insistiré antes sobre un punto importante: cuando se desee poseer el material del sistema nervioso en sus relaciones preexistentes que permitan un estudio histológico normal (y con más razón patológico) exacto de territorios importantes ó por cortes seriados, nunca deberán hacerse secciones del tejido al estado fresco sino después de fijado y endurecido, porque en aquel caso se operan retracciones, malformaciones, que desvían el cuadro de lo normal; pero si el interés del investigador recae sólo sobre una región pequeña determinada, podrá extirparse ésta con tijeras ó bisturí y pasarla en seguida al reactivo. En el primer caso debemos dar la preferencia al formol (10 % ó 15 % ó 20 % en agua destilada según el volumen del órgano), fijador que reúne ventajas como más adelante demostraremos; en el segundo, se podrá utilizar una serie de fijadores.

Estas indicaciones que se refieren al hombre así como las que más abajo daremos, pueden generalizarse á los vertebrados comunes que están á nuestro alcance (vaca, caballo, ratón, etc.), que nos servirán para cierta clase de investigaciones histológicas y de morfología, si bien es cierto que en estos casos, la técnica (extracción) puede sufrir algunas modificaciones cuando se trate de los primeros sobre todo.

El sistema nervioso es un tejido que se altera con la mayor facilidad. En ciertas lesiones del cerebro (tumores, por ejemplo) se precipitan, más rápidamente durante la época de verano; los fenómenos de desintegración, en las primeras horas después de la muerte, disminuyen su consistencia y hacen que el órgano se aplaste al colocarlo sobre la mesa de autopsia.

Si se trata de embriones humanos, es doloroso pensar en la gran cantidad de material tan importante que se remite á los laboratorios y que hay que inutilizar, porque su estado de descomposición — imputable ora á que la muerte se ha producido antes de su expulsión ó bien á que la técnica preparatoria es mala — no permite su aprovechamiento.

De esto se deduce que debe ser condición primordial el material fresco, recientemente extraído; y esta es una de las razones que obligan á los experimentadores á dirigir sus investigaciones hacia los embriones de las especies antes citadas muertas en el momento (ovejas, ratones, etc.), especialmente cuando se quiere estudiar la textura fina del sistema nervioso.

Fijación. — El estudio del sistema nervioso puede hacerse de dos maneras: primero al estado fresco, operando sobre una pequeña porción de tejido que se disgrega por medio de agujas en una gota de solución fisiológica de cloruro de sodio, de suero iodado, de alcohol al tercio, etc.; pero este procedimiento que da tan buenos resultados en histología general,

(1) Existen otros de Brunetti, etc.

tiene grandes inconvenientes si se trata de células nerviosas, por ejemplo, ruptura de prolongaciones protoplasmáticas, etc., que obligan á desecharlo.

En cambio, cuando se quiere determinar la forma de las células, la topografía de cada grupo, el trayecto de los haces, las relaciones de los componentes entre sí, es imprescindible recurrir á la influencia de reactivos que obren sobre las substancias albuminoideas del tejido, ya sea coagulándolas, ya precipitándolas, haciéndolas insolubles y colocándolas en condiciones de inalterabilidad y de consistencia relativa, de tal manera que impidan su dislocación y al mismo tiempo dejen que actúen cuerpos de fórmula química compleja, que muestran predilección por tal ó cual componente celular, dándonos cuadros coloreados que permitan revelarnos la anatomía microscópica é integridad ó alteraciones de las partes.

Estos agentes elevan los índices de refracción de los componentes de los tejidos á diversos grados, de manera que hacen visibles partes que al estado natural no se destacaban en el mismo medio (Bolles Lee y Henneguy).

Los primeros son denominados fijadores.

Como se habrá notado, cité anteriormente el formol. En efecto, á pesar de las críticas dirigidas por algunos histólogos de nota pero que más bien tendrán razón de ser en histología general, creo que es el fijador que presta mayores servicios en la técnica histológica del sistema nervioso. Reune la ventaja de penetrar rápidamente aún en cerebros enteros; es muy fiel fijador, produce al mismo tiempo, un grado considerable de endurecimiento, no es caro, y los tejidos influenciados por él, pueden ser pasibles de las coloraciones más delicadas: Weigert, neuroglia, método de Golgi.

Un punto importante es la manera cómo debe colocarse el tejido nervioso en los fijadores. Si consideramos primeramente al encéfalo del hombre, será menester sumergirlo con la convexidad dirigida hacia abajo dentro un recipiente que contenga tres litros de solución de formol⁽¹⁾ al 15 ó 20 %, en cuyo fondo se halle un poco de algodón hidrófilo. Si su consistencia fuera disminuída, es indicado separar por medio de un bisturí el cerebro del cerebelo, protuberancia y bulbo, seccionando al nivel del istmo. Debe estar libre y no tocar, por consiguiente, las paredes del recipiente. A los 8 ó 10 días el órgano tiene la suficiente consistencia y fijación, y como todas las relaciones se conservan perfectamente, de esta manera se le puede utilizar, ya sea para su morfología como para el estudio histológico por medio de los cortes seriados sin perder una sola región. Es en este momento que deberá procederse á sacar fotografías del órgano y no antes.

Si se trata de la medula, procederemos de la manera siguiente: Una vez extraída del canal medular, se la coloca á lo largo sobre una mesa y con ayuda de una pinza y tijera se hace una incisión longitudinal mediana en la dura madre al nivel del surco mediano anterior (entre ambas raíces anteriores en otras palabras); luego, se separan suavemente los labios de la incisión y se fijan con ayuda de alfileres pequeños sobre una madera cepillada, de 5 á 6 centímetros de ancho por 0^m,60 de largo y dos de espesor, teniendo cuidado de no estirarlos mucho á fin de evitar el aplanamiento que se operaría en la medula por retracción bajo la influencia del fijador. No se hace después más intervenciones y se pone el madero de modo que nade dentro de un recipiente rectangular con la cara que tiene la medula hacia abajo, recipiente que contendrá una solución de formol al 10 %⁽²⁾. Cuando la pieza es fresca, ya se ha operado la fijación á los 4 ó 5 días ó

(1) Como formol, consideraremos la solución comercial que contiene 40 % de aldehído fórmico.

(2) Es conveniente anotar con lápiz el día de la inmersión.

antes, al cabo de los cuales uno se decidirá por el temperamento á seguir; se dejará indefinidamente en formol débil (1 %) si se desearé guardar el órgano para estudiar su anatomía descriptiva ó bien se pasará al alcohol á 70 donde puede quedar mucho tiempo (para examen de células solamente) cuidando de cambiarlo cuando tome una coloración amarilla y se vean depósitos blancos y brillantes (mielina).

Estas últimas consideraciones son igualmente aplicables al cerebro del hombre, así como al sistema nervioso de todos los vertebrados.

Pero si se desearé solamente examinar una porción limitada de tejido nervioso: una parte de circunvolución ó un trozo de segmento medular, etc., bastará aislar la porción que interese y colocarla en abundante cantidad de fijador al 10 %, descansando sobre algodón ó papel de filtro.

Además del formol existen otros fijadores de aplicación en histología general y entre ellos hay algunos que poseen á semejanza de aquél, la facultad de dar una consistencia relativa mayor y por eso se les designa como indurantes (bicloruro de mercurio, alcohol, ácido crómico, éste último especialmente indicado para embriones, etc.).

El alcohol á 96 es un excelente fijador de las células, preconizado especialmente por el neuropatólogo Nissl. Dicho autor recomienda colocar pequeñas porciones de tejido nervioso de casi un centímetro de espesor sobre algodón de vidrio en una atmósfera de alcohol igual á 40 ó 50 veces el volumen de la pieza. El alcohol deberá cambiarse cada veinticuatro horas—ó antes si se enturbia—y por el espacio de cinco días, al cabo de los cuales las secciones quedarán conservadas definitivamente en alcohol á 80.

Un principio parece reinar en el empleo de los fijadores: que el líquido debe tener una reacción ácida y ser formado por mezcla de varios á la vez. Basado en ese juicio se recomienda el líquido de Zenker, las mezclas de Flemming, etc., muy buenos; pero requieren algunos cuidados, mucha vigilancia, y salvo indicaciones especiales—que no entran en nuestro programa—son más bien, como decía anteriormente, del resorte de la histología general.

Deshidratación.—Hemos visto que los fijadores tenían también la propiedad de dar más consistencia al tejido, de endurecerlo, en una palabra, lo que facilita el examen por medio de cortes sin inclusión, método que como veremos luego, es recomendado exclusivamente por Nissl, cuando se trata de investigaciones sobre células nerviosas.

Pero, en general, hay que recurrir á un medio que nos presente al material fijado en condiciones tales que podamos cómodamente aprovecharlo en todas sus partes y que resista á las manipulaciones ulteriores. Esto que se designa con el nombre de inclusión va precedida de otro proceso: la deshidratación, cuyo objeto es sacar el agua de los tejidos y al mismo tiempo aumentar su consistencia. Para este fin se usan los alcoholes de título ascendente (50, 70, 90, 95 y absoluto: 100) que se dejarán actuar 24 horas cada uno (para piezas pequeñas).

Cuando los trozos del tejido han salido del alcohol á 95, es muy conveniente rectificar las superficies con un cuchillo bien afilado á fin de presentar más tarde, á la navaja un plano bien uniforme.

Inclusión.—Esta operación consiste en hacer penetrar por los intersticios del tejido una masa que al solidificarse nos permita reducir á cortes finísimos el material—valiéndonos de aparatos especiales—y puedan ser cómodamente sometidos á la influencia de colorantes, etc. (1)

(1) Como en este trabajo sólo expondré la técnica que nosotros seguiremos en el laboratorio, si se desearé mayores detalles, pueden consultarse las obras sobre histología.

Disponemos de dos grandes métodos de inclusión: el de la parafina y el de la celoidina.

Método de la parafina.—Cuando se desean obtener cortes finísimos de un tejido, sueltos ó en serie, es la parafina indiscutiblemente, el gran método.

Después de deshidratados los trozos con alcohol absoluto, se aleja éste valiéndonos de líquidos denominados aclarantes los que al mismo tiempo, disuelven y facilitan la penetración de la parafina.

Los aclarantes son muchos (benzina, aceite de cedro, xilol, toluol, cloroformo, etc.) pero no deben pasar á ellos los trozos de tejido sino de una manera lenta, gradual, es decir, quitando poco á poco el alcohol y substituyéndolo por el otro. Se aconseja usar primero una mezcla de partes iguales de xilol, etc., con alcohol absoluto, luego $\frac{2}{3}$ partes del aclarante y una de alcohol y, por fin, aclarante puro.

Siguiendo el ejemplo de Bolles Lee y Henneguy, uso preferentemente la esencia de cedro preparada por Grüber, la que á más de no ser nociva para los componentes del tejido aunque permanezca en ella mucho tiempo, tampoco aumenta su consistencia. Hago caer al fondo del frasquito de boca ancha y de poca capacidad que contiene al tejido en alcohol absoluto una cantidad pequeña de aceite de cedro, ya sea deslizándola por la pared inclinada ó bien llevándola directamente abajo por medio de una pipeta. Se forman dos capas perfectamente separadas: la superior más liviana constituida por el alcohol con los cortes y la inferior más densa representada por el aceite. En un lapso de tiempo variable (una ó dos horas) los trozos caen al aceite y se puede ya retirar el alcohol por medio de una pipeta.

El xilol es quizás el penetrante más usado en los laboratorios y con buenos resultados, pero debe vigilarse la permanencia de las piezas. Sacados los trozos del alcohol absoluto (1) van á una mezcla de partes iguales de éste con xilol, luego al xilol puro.

La misma práctica puede seguirse con el toluol, benzina y cloroformo, buenos disolventes todos de la parafina.

Del aceite de cedro se trasladan á una mezcla de parafina y de aceite, partes iguales — preferentemente dentro de un cristizador con tapa — que se mantenga líquida con la temperatura de la parte superior externa, de una estufa toda metálica como la de Adnet, para parafina, por ejemplo, ó en su defecto de Lautenschläger. De aquí van á la parafina blanda 36° y, finalmente, á la parafina de punto de fusión elevado. Tratándose de un clima como el nuestro, con temperatura en invierno no comparables en cuanto á rigor á las de ciertas regiones de Europa, creo que debemos elegir una parafina de 50° á 52°. En cambio, durante los meses de verano utilizaremos las de 55° y 58°, porque hay que tener presente que cuanto más dura es una parafina tanto más delgados salen los cortes. (2)

Cuando han permanecido las piezas el tiempo conveniente en la parafina, hay que proceder á su enfriamiento con el objeto de obtener una masa que pueda cortarse bien. A fin de obtenerla homogénea se debe obrar rápidamente, es decir, enfriarla lo más pronto posible, con lo que se evitará que cristalice, fenómeno éste que impide la obtención de cortes buenos.

Generalmente se usan en los laboratorios unas cajas metálicas en forma de L (de Leuckart), que se articulan á voluntad formando cuadra-

(1) En este caso el alcohol debe ser más anhidro que cuando se emplee el aceite de cedro.

(2) Esas parafinas convienen cuando se quieren obtener cortes seriados; pero para uso diario mejor es recurrir á otra de punto de fusión más bajo: 45° ó 48° para invierno y verano respectivamente.

dos ó rectángulos ó bien cajas de papel, vidrios de reloj, etc., sobre las que se echan primero parafina dura fundida y en seguida la pieza, enfriando el todo después.

Yo creo que con este método uno se expone á mayor trabajo y á que se cristalice la parafina más fácilmente. En cambio, procederemos de la manera siguiente: he hallado en el comercio, unas cápsulas sin tapa, de porcelana, en forma de embudo poco pronunciado, redondas, de diferentes tamaños, según sea necesario, y dentro de ellas coloco la parafina dura fundida y los trozos. Cuando juzgo que han estado el tiempo suficiente, procedo á su orientación con una aguja de histología calentada y en seguida las sumerjo rápidamente en un recipiente con agua natural durante el invierno ó á la que agrego unos pedazos de hielo en verano, cuidando de acelerar la solidificación soplando la superficie. Luego dejo en el fondo del agua á la cápsula y después de una ó más horas se ve aparecer sobre la superficie al block de parafina de aspecto uniforme, transparente casi, aprisionando al trozo ó cuando son varios á todos equidistantes. A veces acontece que cuando la temperatura del agua es muy baja y el punto de fusión de la parafina alta, se formen grietas en el block y también que no se desprenda espontáneamente aquél de la cápsula, una vez enfriada. En este caso se podría evitar lo último, pincelando con glicerina las paredes del vasito antes de echar la parafina fundida; pero, si á pesar de todo no se separa, bastará calentar suavemente la superficie de la porcelana para obtenerlo libre.

Nunca debe tirarse la parafina después de usada porque parece que cuanto más vieja es, tanto más difícilmente cristaliza; pero hay que tener presente que tampoco debe sobrepasar la temperatura de la estufa á la del punto de fusión de la parafina porque entonces exigirá más calor para fundirse otra vez. He observado que por lo general, se mantiene líquida aún con una cifra menor de grados que la que traen inscriptos los envases y que rarísima vez cristaliza con esa temperatura cuando se saca el vasito y se lo sumerge en seguida dentro del agua muy fría.

Si en lugar del aceite usamos el xilol, etc., puede seguirse la misma técnica con sus variaciones como expondremos más abajo.

Así incluídas las piezas, pueden permanecer indefinidamente sin alterarse.

Lubarsch recomienda un método rápido de inclusión en parafina para investigaciones de anatomía patológica especialmente y que puede llevarse á cabo pocas horas después de extraer el material, ya sea de la autopsia como del enfermo.

Trozos no mayores de 3 á 5 milímetros de espesor.

1º Formol al 10 0/0, á la estufa (50 á 55º) por 10 á 15 minutos y cambiado una ó dos veces;

2º Alcohol á 90 ó 95, 10 ó 15 minutos y una vez renovado;

3º Alcohol absoluto, 10 minutos y dos veces cambiado;

4º Aceite de anilina por 10 ó 20 minutos;

5º Xilol por 10 ó 20 minutos (hasta que quede claro);

6º Parafina por 10 minutos, una hora ó más (á 50 ó 55º).

Por este método se producen encogimientos celulares y no se puede hacer un estudio profundo de la estructura del tejido (Lubarsch). Pueden ensayarse todas las coloraciones.

Stein y Gutmann siguen poco más ó menos el mismo procedimiento.

En el año 1905 Henke y Zeller introdujeron la acetona en la técnica y A. Brunsk la reconoce estas ventajas: fijar (medianamente) y deshidratar.

Este autor sigue el procedimiento siguiente:

1º Pasaje de los trocitos de tejido á la acetona que contenga sulfato de cobre, á objeto de acelerar la acción deshidratante, é interposición de papel de filtro sobre el que descansará la pieza. Permanencia 20 á 50 minutos, ó mejor dicho, hasta que la consistencia sea igual en todas sus partes;

2º Xilol por 5, 10 ó más minutos;

3º Parafina 15 á 20 minutos.

Duración del procedimiento: 40 á 80 minutos.

Brunsk recomienda mucho la acetona para los tejidos fibrosos y osteoides. Según él la acetona no presenta el inconveniente de encoger al tejido y el tiempo es abreviado porque se evita el uso de los alcoholes de título ascendente.

Pueden fijarse las piezas en formol antes de pasar á la acetona y dan resultado las coloraciones comunes, tanto para células, etc., como para bacterios.

Inclusión en celoidina. — Este método presta mayores servicios que el anterior sobre todo cuando se trabaja con grandes piezas y en determinadas coloraciones, como veremos más abajo, aunque si bien es cierto que los cortes obtenidos por este medio, no son tan delgados.

Duval fué quien introdujo el colodio en la técnica histológica substituido más tarde por la celoidina recomendada por Merkel y Schiefferdecker. En el comercio se presentan como placas lechosas ó bien bajo la forma de virutas que contienen un poco de agua. Para usarla debe cortarse en pequeños trozos y ponerla á desecar en la estufa retirándola cuando tome un tinte amarillo. Se preparan luego, tres soluciones en alcohol y éter, más ó menos en esta proporción (Busse). Número 1, 10 partes de celoidina por 150 partes de la mezcla antes citada (1); número 2, 10 partes de celoidina por 105 de alcohol y éter; y número 3, 10 partes de celoidina por 80 de la mezcla (consistencia siruposa).

Veamos ahora cómo debe procederse á la inclusión.

El tratamiento de los cortes hasta llegar al alcohol absoluto, es el mismo que si se tratara de parafina. Una vez deshidratados pasarán á la celoidina nº 1 por un tiempo largo (unos ó varios días tratándose de trozos pequeños y hasta semanas con piezas mayores), porque lo importante es conseguir una penetración segura de esta celoidina; se decanta aquella y se echa la nº 2, y por fin la 3ª substituyendo á aquélla. Después de esto hay que proceder al endurecimiento de manera que nos permita obtener cortes con la navaja. Antes de pasar las piezas á la celoidina 3ª recomendando retirar aquellas de los frasquitos donde se había operado la penetración con los números 1 y 2 y sumergirlas, recién en la espesa, aparte, en un cristizador con tapa, bien seco, cuidadosamente orientados, quiero decir, de tal manera ordenados que presenten la superficie á cortarse dirigida hacia abajo. Se dejan los cristalizadores 2 ó 3 días en reposo absoluto y si se nota que el nivel de la celoidina baja, se agrega una nueva cantidad. Cuando se calcula que al reducirse la masa por evaporación lenta del alcohol y éter no quedarán en descubierto los trozos y que ya una capa algo consistente de varios milímetros los cubre, se toca rápidamente con la yema del dedo la superficie de la celoidina: si presenta una regular consistencia, resistente, y no adhiere al dedo se hacen incisiones laterales con un bisturí y fácilmente queda libre el pequeño block de celoidina encerrando al tejido. De antemano se tienen preparados tacos de

(1) Como la celoidina desecada tarda mucho tiempo en disolverse en la mezcla, se la puede poner antes en el volumen correspondiente de alcohol por 24 horas y luego se agrega el éter, con lo que se apresura la disolución (Elschnig).

madera muy dura, bien lavados en alcohol para eliminar la materia colorante que al disolverse teñirían las piezas, ó bien de una pasta denominada *stabilit*, y una vez perfectamente desecados se echa una delgada capa de celoidina nº 1 sobre la cara que tiene estrechos surcos (á objeto de consolidar el block) y sobre ésta, y rápidamente, se coloca la inclusión por medio de pinzas, y no de los dedos, con la superficie que antes miraba hacia abajo en el cristizador dirigida arriba, ejerciendo una ligera presión. Se dejan las inclusiones montadas debajo de una campana de vidrio ⁽¹⁾ y después de 15 minutos ó media hora, tratándose de piezas pequeñas, se colocan en alcohol á 85 % con el objeto de endurecer al block, condición que se obtiene después de 12 ó 24 horas. Si se desean conservar indefinidamente podrán dejarse en alcohol algo más diluido (70 %).

Este procedimiento de montaje da excelentes resultados cuando el aire es seco, pero si el estado higrométrico es elevado, el block se pone lechoso y no endurece más. Para evitar esto es preferible entonces pasar directamente la pieza envuelta en celoidina nº 3, — cuando ha permanecido en ella el tiempo suficiente — al taco y ponerlo debajo de la campana como en el anterior procedimiento.

Manera de hacer los cortes. — Primer caso: inclusión con parafina. Cuando el block ha sido bien enfriado se corta la parafina dejando solamente una capa de algunos milímetros al rededor de la pieza. Se calienta el soporte metálico del micrótopo y aplica la inclusión y con un bisturí caliente se funde un poco de parafina en el punto de unión de su base con el soporte á fin de hacer más segura la adherencia.

Inclusión y aparato de sostén van al agua corriente por unos minutos, al cabo de los cuales se adapta el todo al micrótopo (después de secarlo bien) de Minot, que es de manejo sencillo y que da muy buenos resultados.

Después de haber cortado perfectamente paralelas al filo de la navaja las caras superior é inferior de la parafina, se da comienzo á los cortes. Cuando la inclusión ha sido bien hecha se obtienen cortes seriados en bandas, que se colocan cuidadosamente sobre una mesa y en el orden en que se han sacado.

Para un estudio ulterior, es necesario fijarlos al porta-objeto de modo que puedan manejarse fácilmente y muchos á la vez. Para esto se calienta agua corriente (preferentemente) en un recipiente de dos litros más ó menos hasta una temperatura inferior en 5 ó más grados (en razón inversa al espesor del corte) al punto de fusión de la parafina — cosa que se obtiene más segura por medio de un termómetro. Con una pinza se colocan con cuidado los cortes aislados ó en cadena de dos ó más sobre la superficie del agua y después de uno ó varios minutos, quedan bien distendidos. Es en este momento que se sumerge casi totalmente el porta-objetos, muy bien limpio, dirigido primero perpendicularmente á la superficie del líquido, luego se lo oblicúa y coloca debajo del corte ó cortes que nadan. Ahora bien, si no se ha agitado al líquido no resta sino levantar al porta-objeto haciéndole conservar la misma oblicuidad y el corte es extraído fácilmente. Se elimina el exceso de agua, inclinando al porta-objeto, se sujeta y orienta al corte ó cortes con una aguja y se ponen á desecar á la estufa á 37°. Si los porta han sido bien limpiados los cortes deberán correr libremente por toda su superficie; si la inclusión es perfecta estos se adherirán además en todas sus partes al vidrio y una vez desecados su color se aproximará al de la goma en solución; en el caso contrario se

(1) Puede colocarse al lado una cápsula con cloroformo cuyos vapores precipitan el endurecimiento del block.

libertan durante las maniobras á que serán sometidos y su coloración es más bien blanca. Si se han hecho series, se enumeran los porta-objetos con un diamante. En ese estado, cuidadosamente protegidos de la tierra esos cortes pegados pueden guardarse todo el tiempo que se desee antes de colorearlos.

Cuando se ha procedido bien al *collage* al agua corriente, es el método más general y que da excelente resultado.

Para casos especialísimos, sin embargo, se usa la misma agua con clara de huevo, ó bien la mezcla pura de Mayer, la que también contiene albúmina; pero, repito aquél metodo es preferible, porque aún recurriendo á la albúmina en los casos delicados, nos presenta por otra parte, el inconveniente de que esta substancia se coagula y colorea al mismo tiempo que el tejido, lo que no deja de incomodar, porque podría producir imágenes artificiales.

2º Caso, *a*; inclusión con celoidina para estudio de células. Cuando la inclusión se halle bien endurecida en alcohol, pasará á la pinza del micró-tomo que lo sujeta, y con la navaja dirigida lo más oblicuamente posible, se harán los cortes; pero en lugar de ser en seco se humedecerá la navaja y la pieza con alcohol á 70. Se consigue esto último mejor por medio de un pincel tratando de no mojar demasiado la navaja con el objeto de evitar que los cortes se doblen. A medida que se obtienen, son levantados con una pinza tomándolos de la celoidina periférica y pasan al alcohol á 70 en una cápsula. Como la estadía prolongada en alcohol es nociva para el estudio de las células, debe procederse en el acto á su coloración.

Si se desee hacer cortes seriados, véase más abajo (estudio de los haces).

2º Caso, *b*; inclusión en celoidina para fibras.

Lo mismo que en el caso de la inclusión para células, se usa aquí, el micró-tomo con navaja dirigida oblicuamente pequeño modelo (Becker, Sartorius, etc.); pero si deseamos obtener cortes de cerebro entero, hay que recurrir al modelo grande de Schanze.

Cuando las piezas han permanecido el tiempo suficiente en bicromato (véase el método de Weigert, Pal etc.) y están deshidratadas y bien incluidas como en los casos de celoidina, se ponen los tacos en la pinza del micró-tomo. Podríamos hacer los cortes con la ayuda solo del alcohol; pero en este caso se rompen fácilmente, porque la sal crómica los hace muy quebradizos. Hay que recurrir entonces á un medio que asegure la integridad de los cortes y esto se consigue con lo que se denomina celoidinaje superior.

Cuando la inclusión se halla en estado de poderse cortar, se deseca rápidamente su superficie soplando con una jeringa de goma, y sin perder tiempo se la cubre con una delgada capa de celoidina nº 1 pasando un pincel fino moderadamente imbibido. Sin demorar, se sopla nuevamente la inclusión, se humedece en seguida la navaja con alcohol á 70 y se hace el corte que quedará bien estirado. Por medio de una pinza se los lleva á un cristizador que contenga alcohol del mismo título, procurando no tomarlos sino de la celoidina periférica.

Pero, si deseamos tener cortes seriados de una región cualquiera será menester recurrir al método de Darkschewitsch, muy cómodo, sencillo, operando de la siguiente manera. Se consigue un block de papel de filtro redondo, de tamaño deseado (para cortes grandes es preferible tomar hojas rectangulares) como los que se expenden para los trabajos de laboratorio. Se enumera cada hoja con lápiz blando, de uno adelante, y por medio de una tijera se hace un corte de algunos centímetros, maniobra ésta que nos

indicará el punto de reparo donde debemos colocar el primer corte, pudiendo elegirse el lado derecho ó el izquierdo de la sección, pero cuidando siempre de seguir el mismo ordenamiento en todas las hojas. Luego, se coloca la hoja con la cara que lleva la numeración hacia abajo y sobre ésta las demás superpuestas. Una vez terminada la numeración y el corte y hecha la pila calculada se invierte á ésta, de modo que el número 1 que se hallaba debajo aparezca arriba: el primero de la serie. Cada hoja se moja en alcohol antes de depositar sobre ella los cortes.

Descompuesta así la pieza en numerosos cortes dispuestos en el mismo orden en que fueron hechos, se puede sacar uno cada cinco ó cada diez, teñirlos y conservarlos montados con la inscripción hecha sobre el portaobjeto y que indique respectivamente el número de la serie á que pertenecen. El resto se conserva dentro de un frasco, constantemente mojado con alcohol para otras series; y así pueden durar muchísimo tiempo sin alterarse.

FÓRMULAS

Fijadores.

Formol.....	20 c ³
Agua destilada.....	80 c ³

Formol.....	10 c ³
Agua destilada.....	90 c ³

Acido ósmico.....	1 gr.
Agua destilada.....	100 c ³

(Protegidos de la luz y del polvo, especialmente del último).

VAN GIESON

Fucshina ácida.....	0 gr. 10
Solución saturada de ácido pícrico.....	100 c.c.

Hemalumbre.

(Disolver en 20 volúmenes de agua destilada).

Acido crómico.....	1 gr.
Agua destilada.....	100 »

(En frascos color caramelo).

LÍQUIDO DE FLEMMING (solución débil).

Acido crómico.....	0 gr. 25
Acido ósmico.....	0 » 10
Acido acético g ^l acial.....	0 » 10
Agua destilada.....	100 c ³

(en frascos color caramelo).

LÍQUIDO DE ZENKER

Líquido de Müller.....	100 c ³
Bicloruro de mercurio.....	5 gr.

(En un frasco color caramelo) al que se agregará en el momento de usar:

Acido acético glacial.....	5 c ³
----------------------------	------------------

ALCOHOLES TITULADOS

A 50, 70, 90. Se preparan ya sea por medio de tablas ó mejor con el alcoholómetro de Gay-Lussac.

Resumen de la inclusión en parafina. (Trozos de menos de un centímetro de espesor).

1° Fijación;

2° Deshidratación (alcoholes á título ascendente: 50, 70, 90, 95, 100: 24 horas en cada uno de ellos).

Se eligirá entre los siguientes métodos:

<i>Giesbrecht (u. Israel)</i>	<i>P. Meyer</i>	<i>Apáthy</i>	<i>Israel</i>
1—Alcohol absoluto.	Alcohol absoluto.	Alcohol absoluto.	Alcohol absoluto.
2—Alcohol absoluto y cloroformo, en dos capas, (á voluntad agréguese éter.)	Benzina (1 ó 2 veces cambiada). Benzol-parafina (hasta 18 horas).	Aceite de cedro debajo del alcohol (1 hora). Aceite de cedro (hasta muchos días).	I parte alcohol absoluto + de xilol. Xilol — Xilol + parafina (12 á 24 horas).
3—Cloroformo (24 horas).	Benzol-parafina (calentada lentamente y agregado de parafina).	Parafina cubierta de cloroformo.	Parafina (en la estufa)
4—Cloroformo-parafina (estufa).	Parafina pura en la estufa.	Cloroformo-parafina (1 á 3 horas: estufa)	
5—Parafina pura en la estufa.		Parafina (1/2 á 2 horas).	

Nosotros podríamos usar el siguiente que se aproxima más al de Apáthy. (Trozos de menos de un centímetro de espesor).

Fijación; alcoholes ascendentes.

1° Alcohol absoluto;

2° Alcohol absoluto y debajo aceite de cedro puro. (Se dejan las piezas hasta que caigan á la segunda capa y luego se retira el alcohol con una pipeta);

3° Permanencia en el aceite de uno á varios días;

4° Aceite de cedro-parafina (líquida en 37°) por dos ó más horas;

5° Parafina blanda 36° (2 ó más horas);

6° Parafina dura, 45°, 48°, 52°, 55° (según el objeto y temperatura ambiente), 1 á 2 horas.

INCLUSIÓN EN CELOIDINA

(Trozos de un centímetro ó más de espesor).

1° Fijación;

2° Alcoholes de título ascendente: 24 horas cada uno;

3° Celoidina I^a (1 ó varios días);

- 4º Celoidina IIª (1 ó varios días);
- 5º Celoidina IIIª (en un cristizador por varios días, durante el verano, ó en el mismo frasco si hay humedad);
- 6º Montaje ya sea del block hecho ó bien de la pieza con celoidina espesa aún no solidificada:
- 7º Conservación definitiva en alcohol á 85 ó á 70 respectivamente.

Coloración de células. Método de Nissl. — Nissl en el año 1883 ha dado á conocer un método, que luego en parte modificó, caracterizado por la coloración de los cortes sin inclusión.

Por medio de tijeras ó de bisturí bien afilados, se sacan pequeñas porciones de tejido nervioso muy fresco y se colocan sobre algodón de vidrio ó papel de filtro dentro de un frasco que contenga alcohol á 96 en la proporción de 40 á 50 veces el volumen del trozo, y si son varios en la misma relación deberá estar el fijador. Cada 24 horas se cambia el alcohol ó antes si enturbia y ya al quinto día las piezas tienen la suficiente consistencia para poderlas cortar. Como las membranas constituyen un impedimento para la confección de cortes finos, deberán sacarse al 3º ó 4º día, y esto se consigue fácilmente. Al mismo tiempo con una navaja bien afilada se rectifica un plano de la pieza á fin de que pueda descansar uniformemente sobre el taco. Cuando han pasado cinco días se distiende una delgada capa de solución espesa de goma arábiga, preparada de antemano, sobre la superficie de un soporte de stabilit ó si es de madera cuando haya secado, después de una larga estadía en alcohol que substraerá al colorante; en seguida se deposita el trozo ejerciendo con una espátula suave presión y, finalmente, taco y pieza pasan al alcohol á 96º. Después de media hora ó antes, la goma se pone blanca, siendo este el momento propicio para la obtención de los cortes, debiendo colocarse la navaja lo más oblicuamente posible cortando en la dirección de los haces. Como la navaja se cubre con una pequeña cantidad de alcohol los cortes quedarán distendidos, pero si se doblan, se estiran con un pincel fino. Para sacar el corte de la navaja se le superpone una hoja de papel de filtro, seco, delgado y haciéndolo deslizar horizontalmente lo arrastrará bien adherido á ella; luego se pone la hoja en un cristizador grande que contenga poco alcohol á 80 procurando que se liberten y no se doblen. Procédese inmediatamente á su coloración y para ello recomienda Nissl la mezcla jabón-azul de metileno cuya fórmula es: azul de metileno 3 gr. 75, jabón Venecia 1 gr. 75, agua destilada 1.000.

El procedimiento manual consiste en llevar los cortes con la espátula y depositarlos cuidadosamente sobre la superficie del colorante contenido en una cápsula que repose sobre un trípode por intermedio de tela metálica y los cortes nadan por el alcohol que llevan. Debajo se coloca un mechero con llama pequeña y se aleja cuando aparecen las primeras burbujas de aire. Desde este momento la coloración está terminada y deben trasladarse los cortes siempre sobre la espátula— que se inclinará y descansará sobre un trozo de papel de filtro para que absorba el excedente de colorante— á la mezcla diferenciadora, contenida dentro de un cristizador: 10 partes de aceite de anilina por 90 de alcohol á 96, renovándola siempre que la tinta sea muy azul. La operación ha llegado á su límite cuando el ojo percibe puntos azulados bien netos, sobre fondo casi blanco, debiendo retirarse entonces los cortes y llevarlos, siempre distendidos, al porta-objeto y colocarles una ó más gotas de aceite puro de esencia de cajeput (aclarante) vigilando que aquellos no queden al descubierto para lo cual hay que inclinar al porta-objeto y tratar que la corriente de esencia lo envuelva completamente. Después de dos ó tres minutos cuando el corte se ha hecho bien transparente, hay que alejar el exceso de esencia, primero, inclinando y enju-

gando al vidrio y después pasándole papel de filtro que al mismo tiempo lo distiende y sujeta al porta-objeto (1). Si se presentan puntos blancos en el preparado desaparecerán calentándolo suavemente. Pero siempre debemos tener presente esta necesidad: alejar todo rastro de esencia porque de lo contrario existe el peligro de una completa decoloración. Esto se consigue haciendo caer abundante cantidad de benzina, por gotas, para impedir que se desprenda el corte y cuando toda sospecha sobre la existencia de aclarante ha desaparecido se hacen caer una ó dos gotitas de resina Dammar (Nissl recomienda el colofonio disuelto en xilol) preparada con xilol también, de consistencia algo espesa y luego se coloca el cubre.

El líquido conservador debe desecarse lo más rápidamente posible y en vista de esto Nissl calienta ligeramente al porta objeto al mismo tiempo que ejerce una presión moderada sobre el cubre-objeto; de la periferia del último se ve sobresalir colofonio líquido que se aleja con un trapito embebido en xilol, se repite la operación por segunda ó tercera vez y cuando ya no se ve aquél aparecer — hallándose bien cubierto por él el corte — la preparación está en condiciones de conservarse. Nissl dice que algunas preparaciones se pierden porque decoloran; pero con este método se inutilizan más preparados que con el uso de la tionina.

Aunque Nissl sea gran defensor de su método no deja, sin embargo, de recomendar la celoidina como medio de inclusión para casos especiales: cuando se desea estudiar el estado de las meninges, en casos de reblandecimiento, etc.; pero nosotros podemos instituirlo como método general.

En efecto, así como Nissl toma por tipo para las investigaciones el *preparado de equivalencia*, es decir, un preparado que obtiene de material proveniente de animales sanos muertos de cierta manera (por suspensión, punción del bulbo) ó bien del hombre normal, fijado en alcohol, no incluido, coloreado con su mezcla jabón-azul de metileno, etc., etc., y lo compara con otro preparado de material humano patológico ó de animales que de antemano ha sometido á experiencias, extraído, fijado, etc., etc. como el anterior, nosotros igualmente podremos guiarnos por otro preparado también de equivalencia obtenido por diferente método, el de Lenhossek, modificación del anterior y confrontarlo con el que se obtenga de material nervioso humano ó de animales tratados de la misma manera. Este método reúne una doble ventaja: comodidad y mayor duración del preparado.

Método de Nissl, modificado por Lenhossek

- 1º Fijación (formol). Trozos con sus membranas, de 1 c. á 1 c. 5 espesor;
- 2º Deshidratación y endurecimiento (alcoholes ascendentes, alcohol absoluto);
- 3º Celoidinas: 1ª, 2ª y 3ª;
- 4º Montaje en tacos que pasan al alcohol á 85°.

Practicados los cortes, son sometidos en seguida á la coloración por medio de la tionina al 1 % (ó más concentrada) de procedencia alemana (Grübler), que da la tinta más durable y de la manera siguiente:

- 1º Filtración del colorante y que caiga dentro de una cápsula de porcelana;

(1) A veces he notado que el corte se distiende espontáneamente y adhiere al porta-objeto cuando se le echa la esencia, con lo que se evita la intervención del papel.

- 2º Pasaje de los cortes (pocos) con espátula á la superficie de la solución y elevar ligeramente la temperatura (30 ó 35°). Permanencia: algunos minutos.
- 3º Traspaso inmediato de los cortes á la mezcla diferenciadora ya citada antes, después de breve lavado en agua destilada; agitar bien los cortes como en el método de Weigert y renovación de la mezcla cuando su color sea azul intenso. La operación está terminada si vemos destacarse focos ó cordones color violeta (células, etc.) sobre fondo blanco que encierra los núcleos en general (1). (Esta observación hay que hacerla bajo el microscopio en casos de medula, por ejemplo, tomando un corte que se aclara y monta).
- 4º Pasaje al aclarante compuesto de xilol y esencia de cajeput, partes iguales, contenido en un cristizador (ó sobre el porta-objeto), secamiento del corte sobre el vidrio con papel de filtro ejerciendo una ligera presión. Puede emplearse esencia pura y alejarla con bencina.
- 5º Resina Dammar disuelta en xilol.

Por lo general no se recomienda colocarles cubre-objeto; pero cuando las células han retenido el colorante y el fondo es blanco, rara vez se decoloran los cortes coloreados con tionina. Por lo demás, evítese la luz porque pueden palidecer.

Ahora veamos qué se colorea por este procedimiento y con qué intensidad.

En la constitución del sistema nervioso entran dos clases de elementos: uno que encontramos acompañando al resto de los elementos nobles de nuestro organismo, que le sirve de sostén (tejido conjuntivo, fibroso y elástico, y aquí podríamos colocar la glía) y al mismo tiempo es portador de los vasos que lo penetran, y otro la célula nerviosa, específica, dotada de una afinidad electiva por ciertas substancias químicas derivadas de la anilina. Esta propiedad basiofilia, fué descubierta por Nissl en 1883 y le ha servido de base para su método.

Es por medio de los colorantes básicos (azul de metileno, tionina, azul policromo, etc.) que se tiñen preferentemente el nucleolo y las granulaciones del cuerpo celular que Nissl llamó substancia tigreide, notables especialmente en las células motrices de los cuernos anteriores de la médula. También se colorean los núcleos del resto de las células en general: glía, vasos, tejido conjuntivo.

Según el método de Nissl ó bien en el modificado por Lenhossék se colorean los componentes del sistema nervioso con las siguientes gradaciones: nucleolo en general y granulaciones de Nissl de las células motrices en azul intenso ó violeta, la membrana nuclear y los gránulos basiófilos de los núcleos gliomatosos en azul medianamente intenso, los núcleos del endotelio vascular azul pálido, y el cuerpo de casi todas las células gliomatosas apenas visible.

Según Chr. Jakob, la diferenciación puede ser de dos grados. Uno poco marcado con el objeto de mostrar distintamente los núcleos de la glía y de los vasos, los núcleos y protoplasma de las células plasmáticas, y otro más intenso para hacer especialmente visibles las granulaciones de Nissl.

El aclarante obra tanto más enérgicamente cuanto más viejo es y se puede acelerar la diferenciación pasando alternativamente los cortes del aclarante al alcohol (Chr. Jakob).

(1) En este método como en el de Nissl, la buena coloración se consigue cuando la mezcla diferenciadora obra rápidamente.

Coloración de la vaina de mielina.—El primero que halló un método representativo de una parte de la fibra nerviosa fué Exner en 1880; pero dicho autor no creía seguramente que fuera teñida la vaina de mielina como se demostró después, sino más bien la vaina córnea de Ewald-Kühne. Consistía ese procedimiento, en endurecer y fijar los trozos muy pequeños de sistema nervioso central con ácido ósmico, cortarlos sin inclusión, después de pegarlos con lacre sobre tacos y montaje en glicerina ligeramente amoniacal.

Este procedimiento aunque muy bueno porque mostraba hasta las más finas fibras de la corteza tenía algunos inconvenientes: no poder operar sino en trozos demasiado pequeños de tejido, las alteraciones que sufrían las demás partes del sistema nervioso con las manipulaciones, la poca duración de los cortes y el precio elevado del ácido ósmico (Weigert).

En el año 1882, Weigert, después de una serie de trabajos encaminados á buscar un medio cómodo, poco oneroso y seguro para conseguir la tinción de la mielina (1) observó que era una condición necesaria la intervención de un mordiente, es decir, de una substancia, que por una parte estuviera unida á la mielina y por otra al colorante. Como mordiente usó una sal crómica super-oxidada, el bicromato de potasio, bajo forma de licor de Müller, y después de numerosos ensayos respecto á colorantes eligió una hematoxilina especialmente preparada, de manera que pudiera combinarse directamente con la mielina previamente mordida con la sal bicrómica; y como el colorante, debía estar maduro antes de usar, Weigert le agregaba un poco de carbonato de litina. Sobrecoloraba con hematoxilina los cortes salidos del bicromato, diferenciaba con ferrocianuro de potasio alcalinizado con bórax, lo lavaba durante 24 horas, deshidratava, aclaraba con su carbol xilol y montaba; pero como la confiesa Weigert no podía obtener así, representadas las fibras más finas de la corteza cerebral (supraradiadas).

Puso entonces en práctica una segunda mordición por medio de la laca de cobre que la hacía obrar antes de la coloración, y á fin de evitar los depósitos agregaba sal de Seignette (partes iguales de una solución de esta sal al 10 % y de otra, saturada al frío de acetato de cobre neutro). Más tarde usó cromo-fluor y ácido acético, resultando la anterior fórmula así modificada: 5 % de acetato neutro de cobre, 2.5 % de cromo-fluor — 5 % de ácido acético.

Resumiendo el método de Weigert se le puede dividir en las siguientes manipulaciones:

- 1º Endurecimiento y mordición del tejido con bicromato de potasio (muchos meses);
- 2º Inclusión en celoidina;
- 3º Pasaje de aquéllos á la mezcla de acetato de cobre, sal de Seignette y cromo-fluor, ó á ésta modificada, por 24 ó 48 horas según el tamaño, renovándola una ó dos veces. Pasaje al alcohol á 80;
- 4º Confeción de los cortes. Celoidinaje superior;
- 5º Coloración con hematoxilina: solución A: 93 c.³ de agua destilada adicionada de 7 c.³ de solución saturada de carbonato de litina; solución B; 1 gramo de hematoxilina disuelta en 10 c.³ de alcohol absoluto. Lavaje en agua.
- 6º Diferenciación con ferrocianuro de potasio 2 gr. 50, bórax 2 gramos, agua destilada 200 gramos. Lavaje por 24 horas en agua.
- 7º Deshidratación, aclaración en carbol-xilol (1 × 2 respectivamente). Montaje con cubre-objeto.

(1) No toda la mielina se colorea sino el protagón contenido en ella (Hlassa-Weigert).

Este método debido puramente á Weigert y que le costó trece años de continuos ensayos sufrió modificaciones que han recaído sobre cada una de las partes esenciales que lo constituyen, es decir, sobre la 1ª mordición, la segunda, la coloración y diferenciación.

Como la primera mordición requería muchos meses era necesario buscar un procedimiento que abreviara esta parte del método y el mismo Weigert llegó á obtenerlo por dos caminos: acelerando la cromización con ayuda de la estufa y substituyendo el bicromato por otra substancia, ó bien suprimiéndola.

Respecto á la conveniencia de colocar en una estufa los trozos y mordientes, está demostrado después de los trabajos de Sahli y por los resultados de la práctica que es un procedimiento á desecharse, siendo de preferir la acción lenta y progresiva del bicromato.

Los otros líquidos propuestos por el mismo Weigert: el de Erlicki, modificado por Kultschitzki agregándole alcohol y ácido acético, el de Zenker, etc., dan resultados inferiores á los que se obtienen con el bicromato (engomamiento, etc), según el método clásico.

Weigert suprimió la primera mordición. Hacía obrar sobre las piezas el formol por 4 ó 5 días y recién el bicromato, añadido de cromo-fluor hasta que el tinte fuera pardo, y por fin los llevaba al bicromato puro donde tomaban una coloración amarilla. J. Gudden hace morder los cortes fijados en formol, con ácido crómico á 0.55 %.

Pero si la primera parte del método es la única que no debe sufrir alteración alguna no sucede lo mismo con la segunda mordición. A la mezcla de acetato, tartrato doble, cromo-fluor, etc., Wolters la ha substituído ventajosamente por el mismo bicromato de potasio (licor de Müller).

Los colorantes que han sido también recomendados en lugar de la hematoxilina: extracto de palo de campeche, madera de Pernambuco, etc., parecen ahora abandonados. Sin embargo, Weigert recomienda en su último trabajo,—del que he sacado mucho de lo que más nos interesa— el líquido colorante siguiente: A—4 c.³ de licor sesquiclorato de hierro oficial en 96 c.³ de agua destilada; B—10 c.³ de la solución alcohólica de hematoxilina al 10 % en 90 c.³ de alcohol á 96. Partes iguales de ambas antes de usar y se sacuden bien.

Según Weigert se colorean las fibras más finas sobre fondo completamente claro.

En lo que se refiere á la diferenciación, el procedimiento ha sufrido de parte del profesor Pal, una modificación, que consiste en usar el permanganato de potasio en lugar del ferricianuro, substancia empleada anteriormente por Lustgarten en cortes sobrecoloreados con violeta de metilo. Después de la segunda mordición pasan los cortes al permanganato de potasio al 1/2 % y luego á una mezcla de ácido oxálico y sulfito de soda: partes iguales 1 gramo por 200 de agua destilada.

Pasaré ahora á detallar el método de Weigert modificado por Holters y Pal y que nosotros emplearemos en el laboratorio.

Tomemos primeramente el caso de un cerebro humano cuya anatomía de haces deseamos estudiar.

Como dijimos más arriba, deberá ser lo más fresco posible y pasar entero (encéfalo mejor dicho) directamente á abundante solución de formol al 15 ó 20 % en un recipiente de cristal ó vidrio, con tapa, que se mantenga reposando sobre algodón sin tocar las paredes. Después de 8 ó 10 días el tejido nervioso en totalidad, estará fijado y endurecido, pero no lo suficiente para practicar los cortes macroscópicos.

Sin lavar, se trasladará al líquido endurecedor y mordiente. Usando pri-

mero el formol se evitará la putrefacción de la substancia blanca central, y por otra parte, si solo se desee examinar una región las demás quedarán en condiciones de poderse utilizar para otra clase de investigaciones (células, etc.)

El líquido endurecedor y primer mordiente contendrá bicromato de potasio solo al 2.5 0/0, ó bien la conocida fórmula de Müller que contiene sulfato de soda, cuya presencia parece superflua. En una vasija grande de 8 á 10 litros de capacidad se coloca el cerebro y llena con la solución de bicromato (al abrigo de la luz y en un paraje fresco), cuyo cambio deberá hacerse más ó menos en la siguiente forma:

Cada 24 horas durante 15 días.

Cada 48 » por otros quince.

Este es el momento más indicado para seccionar el órgano en trozos de 2 ó 3 centímetros de espesor sin temor de que más tarde la superficie de sección se haga irregular, con lo que se perdería material. Para obtener cortes perfectos pueden servir los micrótomos especiales, ó bien fijar bien el órgano sobre parafina de bajo punto de fusión y cortar con un cuchillo de hoja bien templada de poco espesor y de 4 á 5 centímetros de ancho por 30 ó algo más de largo. Las membranas pueden quedar ó no, según se desee, tratándose de un cerebro normal; pero si es patológico (reblandecimiento, tumores, etc.), hay que respetarlas.

Practicada la anterior maniobra vuelven los trozos obtenidos al bicromato cuya fórmula debe ser modificada, aumentando paulatinamente $\frac{1}{2}$ gramo hasta llegar á 5 0/0.

Cambiar cada 3 por el espacio de 21 días.

»	»	4	»	»	»	»	»	24	»
»	»	5	»	»	»	»	»	25	»
»	»	6	»	»	»	»	»	30	»
»	»	7	»	»	»	»	»	35	»

Hasta terminar (10, 12 meses) se mudará el líquido cada 8 ó 10 días.

Cuando se ha llegado al punto necesario de endurecimiento y mordición el color del tejido será verde obscuro, muy duro y quebradizo.

Si se tratase de una medula entera se la colocará dentro de un frasco de capacidad de un litro y medio, después de practicadas dos ó tres secciones á fin de reducir su volumen y cuando haya sido fijada en formol al 10 0/0 (véase más arriba).

El líquido de Müller ó la solución simple de bicromato de potasio tendrán la misma fórmula que indiqué para el cerebro.

Los cambios se harán más ó menos en esta forma:

Cada 24 horas durante 15 días.

»	48	»	»	16	»
»	3 días	»	»	15	»
»	4	»	»	16	»
»	5	»	»	30	»
»	6	»	»	30	»
»	7	»	hasta terminar	(6 á 7 meses).	

Cuando ha permanecido un mes en el bicromato se practicarán los cortes definitivos. Si se espera más tiempo, cuando el endurecimiento ha avanzado, las secciones ya sean del cerebro como de la medula destruyen las piezas.

La influencia del bicromato ha terminado cuando la substancia gris toma un color bronce y la blanca el verde obscuro.

Como las piezas se hacen cada vez más frágiles no se sacarán (las grandes) del frasco, debiendo retirarse el líquido por medio de un tubo de goma (Chr. Jakob). Es de recomendar también el procedimiento que usa el mismo de agregar bicromato en substancia á la solución vieja en lugar de cambiarla, ó bien disolverla previamente á caliente en un poco de agua.

Con el objeto de evitar el desarrollo de hongos, se agregará á cada frasco, unos trozos de timol, cuando el líquido no deba renovarse sino cada 7 ó más días.

Los trozos pasarán luego á los alcoholes; primero al de 70, conservados en frascos, que se preservarán de la luz, debiendo cambiarse todos los días al principio, porque de lo contrario se formarán depósitos borrosos que cubrirán á las piezas.

Quando el alcohol á 70 no extrae más materia colorante, puede servir de líquido conservador; pero si se deseara estudiarlos habrá que practicar la deshidratación con los otros alcoholes de título ascendente (90, 95 absoluto y celoidina, etc.)

No puede precisarse el tiempo de estadía de las piezas en el alcohol: depende del tamaño, pudiendo durar meses. Esta última consideración puede hacerse extensiva á la celoidina.

Coloración de la mielina.—Hechos los cortes con ayuda del celoidinaje superior (véase parágrafo anterior) pasarán momentáneamente al alcohol á 70 y de aquí á la hematoxilina de fórmula: hematoxilina 1 gramo, alcohol absoluto 10 c.³, agua destilada 90, solución que se dejará unos días á la luz antes de usar y hasta que tome un color vino Oporto. Conseguido esto, se guardará en frascos color caramelo, en la obscuridad; y en esas condiciones he observado que su aspecto no varía y que no se forman esos precipitados tan comunes en los frascos transparentes expuestos á la luz, precipitados que por lo demás se disuelven cuando están los cortes en la estufa á 30 ó 35°; pero en estos casos su poder tintorial no es tan intenso como cuando se usa hematoxilina transparente.

Para coloraciones comunes bastará poner el cristizador con los cortes y colorante á la estufa por uno ó dos días; pero si queremos examinar corteza cerebral ó bien el estado de mielinización de un embrión, será necesario cambiar la hematoxilina y dejar los cortes en la estufa por lo menos 3 ó 4 días. Se retira luego el cristizador, decanta el colorante y echa licor de Müller, renovándolo hasta que el color negro desaparezca y se espera por 15 minutos, media hora ó más. Después de lavados en agua destilada se echa el permanganato de potasio (diferenciador) al $\frac{1}{2}$ ‰, haciendo girar continuamente los cortes por medio de movimientos de inclinación dirigidos á la cápsula ó cristizador sostenida por ambas manos, y si los cortes son voluminosos se levantará y bajará suavemente el recipiente por un lado para agitar siempre al diferenciador. (1) Después de dos ó tres minutos se decanta el permanganato y vierte ácido hiposulfúrico de fórmula conocida y recientemente preparado, (2) procurando también en este momento, mover sin cesar el recipiente para sacar bien el diferenciador. El ácido deberá, obrar por diez ó más minutos y si la operación ya estuviera terminada — hecho que sería sumamente raro — se lavan repetidas veces los cortes en agua para alejar el ácido y se dejan 24 horas en la misma. En este caso habría contraste entre substancia blanca y gris: la primera se presenta de un color negro y la segunda casi blanca, atravesada por

(1) Cuando se trabaja con embriones ó corteza cerebral es preferible hacer diluciones mayores del permanganato de potasio y más bien repetir las maniobras á fin de evitar su acción tan enérgica (varios días).

(2) Su olor no deberá ser muy irritante.

fibras más ó menos visibles. Pero como por lo general después de permanecer los cortes en el ácido hiposulfúrico 15 ó más minutos conservan una coloración difusa negra ó por zonas algo amarillentas también, es necesario, después de bien lavados, volverlos al diferenciador, pero usando una nueva solución de permanganato y más diluida; luego se vierte ácido hiposulfúrico—que puede ser el mismo antes usado siempre que sus vapores impresionen aun nuestras mucosas—se saca á éste y lavan los cortes con abundante agua. Si á pesar de esta segunda manipulación quedan cortes no del todo diferenciados, se la repite nuevamente.

Hallándose bien marcada la diferenciación y después de una estadía no menos de 24 horas en agua, se deshidratan los cortes, aclaran con carbol-xilol y montan en resina Dammar ó bálsamo, poniéndoles cubre-objeto de vidrio si son pequeños, ó bien de mica si su tamaño es considerable.

Con este procedimiento se colorean solamente las fibras con mielina en negro, así como los hematíes, sobre fondo blanco ó ligeramente amarillo.

Puede darse al fondo una coloración de contraste eligiendo el carmín al alumbre; pero en este caso se escogerán los cortes más delgados y de la manera siguiente: Después de lavados 24 horas en agua los cortes diferenciados se llevan á la estufa á 30 ó 35° dentro de un cristizador con una solución de carmín por 2 ó 3 días. Como este colorante no produce sobrecoloración bastará con lavarlos en agua destilada, deshidratarlos y montarlos como anteriormente. A más de las vainas de mielina, negras, se tiñen en rojo los núcleos en general (neuroglia, conjuntivos) y las células nerviosas.

Puede usarse también la fuchsina ácida (0g. 10 en 100 de agua destilada) que da una bella coloración roja al tejido conjuntivo (vasos, membras) y á la neuroglia, y menos marcada á las células nerviosas, etc.

Del agua destilada pasan los cortes á la solución colorante por uno ó dos minutos, se lavan en agua, deshidratan, aclaran y montan. Cuando se trabaja en cortes grandes, de un hemisferio, por ejemplo, aconseja Chr. Jakob tres grados de diferenciación en el método de Weigert. Uno más marcado para hacer resaltar sobre fondo claro los haces de fibras más gruesas y compactas (piramidal, radiaciones de la cápsula en general, etc.); otro de mediana intensidad para poner de manifiesto fibras como las radiantes, láminas medulares, del tálamo, etc., en cuyo caso el fondo es algo amarillento; y el tercero, más superficial, practicado cuidadosamente con el fin de poner en evidencia las finas fibras de la corteza cerebral, quedando el fondo igualmente con una tinta amarillenta. Y como á veces sobre esos cortes grandes se depositan cristales incómodos cuando permanecen en el ácido hiposulfúrico, recomienda alejarlos agregando unas gotas de alcohol clorhídrico al agua.

Método de Golgi.—Entre los diferentes métodos que se han aplicado al estudio del sistema central, es el descubierto por Golgi en el año 1873, aquél que más contribuyó á revelar su estructura, permitiéndonos descubrir la forma celular, su tamaño, los diversos tipos que pueden presentarse, el largo trayecto de su expansión principal, la propiedad que poseen ciertas células de enviar un prolongamiento central y otro periférico, el desprendimiento de colaterales, la manera cómo el cilindro-eje se pone en contigüidad con el cuerpo celular inmediato, etc., detalles todos que no sólo nos han hecho conocer la anatomía microscópica de ese tejido sino que pueden servirnos para explicar su mecanismo funcional.

Por ese método además de las células nerviosas completas y neuroglia, se ponen en evidencia los vasos y tejido conjuntivo (me refiero al sistema nervioso).

Ahora bien, si todos esos componentes aparecieran impregnados, obtendríamos una imagen tan confusa que poco nos ilustraría acerca de su organización, pero es precisamente por lo caprichoso del método que hemos llegado á los conocimientos que en la materia poseemos debidos al mismo Golgi, á Kallius, Sehwald y especialmente á los trabajos de Ramón Cajal.

Hay preparados que sólo dejan ver una ó varias células distintamente, pero con todos sus prolongamientos, pudiéndose á veces seguir al cilindro-eje hasta su terminación.

Para obtener cuadros de células nerviosas completas se debe elegir sistema nervioso muy fresco y en un período cuando la vaina de mielina aún no ha aparecido. De manera que habrá que recurrir á embriones, pero como ya lo manifesté en otro capítulo, dada la dificultad de conseguir ese material del hombre, nos vemos obligados á obtenerlo proveniente de animales (ratón, cobaye, etc.).

Por este método primero se impregnan las células de neuroglia, luego los cilindro-ejes y, por último, la célula nerviosa.

Existen dos métodos de Golgi: el de nitrato de plata y el de sublimado. Sólo nos ocuparemos del primero.

Dos procesos importantes debe sufrir el tejido nervioso: endurecimiento é impregnación. El primero se obtiene con el bicromato de potasio (líquido de Müller) en soluciones cada vez más concentradas, y el segundo por medio del nitrato de plata, según la fórmula común: 0 gr. 75 % que se cambiará siempre que tome una coloración roja ó amarilla.

Los cortes pueden hacerse con ó sin inclusión. Si se incluyeran es á la celoidina que recurriremos, pero abreviando la estadía en cada uno de los reactivos, porque el agua como el alcohol son muy nocivos para la impregnación.

He aquí el procedimiento que se adapta á las diferentes formas del método á partir del momento en que las piezas han sido impregnadas.

- 1º Deshidratación rápida de los trozos de tejido por los alcoholes ascendentes renovando al absoluto dos veces (en total $\frac{1}{4}$ á 2 horas, según tamaño);
- 2º Celoidina líquida por igual tiempo;
- 3º Celoidina espesa $\frac{1}{4}$ de hora;
- 4º Desecación al aire y endurecimiento en alcohol á 80.

Los cortes podrán hacerse á la hora, pero como es menester montarlos inmediatamente, se colocarán á medida que se obtengan en alcohol á 95 ó 100, por segundos, luego en el aclarante (carbóil-xilol ó xilol respectivamente) y pueden quedar en estos líquidos algo más de tiempo. Se secan y estiran con papel de filtro y después de cubrirlos con una capa de resina ó bálsamo son examinados sin ponerles cubre-objeto y conservados en la obscuridad.

Puede también hacerse un montaje superficial en parafina después de deshidratados.

Para poder cortar las piezas no incluídas se pegan directamente sobre un taco de madera dura con lacre, ó se mantienen entre dos trozos de medula de sauco, ó también con el micrótopo refrigerante.

Puede modificarse el aclarante como lo hace Cajal, sustituyendo el carbóil-xilol por la esencia de clavos que luego aleja con abundante xilol.

Respecto al proceso químico que se opera en este método, los unos creen que se trata del depósito de cromato doble de plata; para otros (Kallius) estaría formado de una combinación de albúmina con el bicroma-

to y la plata, verificándose primero la combinación de los dos que cité antes y luego á aquella se uniría la plata coloreándose así la célula, etc.

Como por este método se presentan frecuentemente depósitos incómodos que impiden el examen microscópico se ha ensayado proteger los trozos durante la impregnación con papel de filtro (Martinotti), gelatina (Sehrwald) que se aleja con agua caliente para poder practicar los cortes. Cajal usa el suero coagulado que no ataca la navaja.

De tres maneras podemos obtener la reacción de Golgi: 1º por el método lento; 2º por el método rápido y 3º por el combinado ó mixto.

Método lento

(Detalles sacados de la importante publicación del profesor E. Kallius, de Göttingen)

El material muy fresco pasa directamente al líquido endurecedor de Müller al 2 0/0 que se cambiará cada 24 horas durante 8 días; luego se sigue aumentando cada semana la dosis de bicromato hasta llegar á 5 gramos por ciento. La dificultad consiste precisamente en encontrar el punto suficiente de endurecimiento. Durante el verano puede obtenerse á los 30 ó 40 días; pero en invierno la permanencia de los trozos deberá ser mayor (3 meses ó más). Cuando la temperatura reinante es elevada y la estadía en el bicromato ha durado el tiempo indicado antes, se harán ensayos cada 3 ó 4 días pasando una ó dos piezas á la solución de plata cuya fórmula conocemos pudiéndose dejar al frasco ya á la luz ó bien en la obscuridad por 2, 3 ó 4 días; pero una influencia más prolongada no es nociva y tampoco da mejores resultados (Kallius). Una vez retirados del nitrato se cortan, ya sea con inclusión ó bien sin ella, procediendo de la manera expresada antes. Si en ese momento se observasen impregnados algunos elementos, pasaremos el resto de las piezas al nitrato de plata y los cortaremos; en caso contrario, las dejaremos más tiempo en bicromato. Cuando nos hallemos en invierno, los ensayos deberán hacerse después de los 3 meses más ó menos y con intervalos de 8 ó 10 días al principio. Algunos aconsejan inyectar una solución de bicromato de potasio previamente.

Método rápido

Como su nombre lo indica, el tiempo de la fijación es acortado.

En este método se usa una mezcla endurecedora compuesta de bicromato de potasio al 3 0/0, 2 partes, ácido ósmico al 1 0/0, 1 parte, que se dejará obrar dos ó tres días al cabo de los cuales podrá pasar la pieza á la solución de nitrato de plata donde se dejarán 5, 6, 8 ó 10 días. Después del 5º día se ensaya con una pieza por vez y si notamos células, etc., que nos interesen, reduciremos á cortes al resto del tejido; si nada se viera, hay que esperar algunos días ó bien tomaremos el temperamento que aconseja Cajal (véase más adelante).

El montaje, etc., es igual al anterior.

Método combinado ó mixto

Este como los anteriores pertenece á Golgi.

Según este autor y Kallius, es el mejor método y más cómodo por los siguientes motivos, que el primero invoca: la seguridad, las gradaciones que nos permite obtener, el tiempo largo de que disponemos para que se opere

la reacción, la posibilidad de acelerar el proceso traspasando á voluntad los trozos del bicromato á la mezcla osmiobicrómica.

Las piezas van al líquido de Müller donde quedan de 3 á 30 días. Cuando han permanecido 3 ó 4, podemos pasar algunas de aquéllas á la mezcla osmiobicrómica donde quedarán de 3 á 8 días. De esta manera se prepara una segunda serie de trozos que pasarán de á uno ó dos á la solución de nitrato y serán examinados en seguida, pudiéndose obtener así gradaciones en la impregnación.

El método de Golgi ha sufrido numerosas modificaciones y solamente citaré las más prácticas.

En efecto, R. Cajal ha indicado como muy conveniente una fórmula de líquido de Müller que contiene 3.5 % de bicromato de potasio, usado generalmente; pero una de las más importantes modificaciones que se han introducido en el método clásico es la titulada doble ó triple impregnación del sabio español.

Cuando por la primera impregnación no se ha obtenido resultado, Cajal aconseja pasar otra vez la pieza á la solución osmiobicrómica ya usada, ó si se recurre á una nueva diluida, es decir, agregar á una parte de solución ósmica al 1 %, 20 á 30 partes de líquido de Müller. Después de una estadía de algunos días en la mezcla, son transportados los trozos durante 24 horas por lo menos, á la solución de plata (Lenhossék los deja en la mezcla dos días y varios en el nitrato). Esta operación puede repetirse una ó dos veces.

En la práctica indicaremos pequeñas modificaciones que variarán según la clase de animal, edad y región de tejido que se examine.

Entre las diferentes variaciones del método existe una importante debida á Kopsch que tiende á substituir el ácido ósmico por el formol. Recomendamos el siguiente procedimiento: 10 c³ de formol comercial que se mezclan con 40 c³ de una solución de bicromato de potasio al 3.5 % momentos antes de usar. Se colocan los trozos y cambiará la solución. A las 24 horas se reemplaza aquél líquido por una solución de bicromato de potasio al 3.5 % donde quedarán 2 á 6 días y luego van á la solución argentina. Por este procedimiento se evitan en gran parte, los depósitos molestos.

Método del nitrato de plata reducido. — Coloración de las neuro-fibrillas por el método de Cajal, modificado por Lenhossék. (Neurologisches Centralblatt, von M. v. Lenhossék).

A diferencia de los otros métodos que existen para la representación de las neuro-fibrillas (de Bethe, Bielschowsky, Apáthy, criticado el último por maestros tan eminentes como Retzius y Lenhossék), de manejo difícil y complicado, poseemos uno debido á R. Cajal, simplificación de otro anterior de Simarro. Según este investigador, se pueden representar las neuro-fibrillas en las células nerviosas y sus terminaciones tratando los tejidos con plata que luego se reduce de acuerdo con los principios que se siguen en fotografía; pero las manipulaciones á que se someten los animales son tan largas y deben practicarse bajo condiciones tan determinadas que su aplicación no se ha generalizado. En cambio, el método de Cajal posee estas ventajas: puede aplicarse tanto á los vertebrados como invertebrados, con sistema nervioso completamente desarrollado ó al estado embrionario y aún no del todo constituido (Lenhossék).

1º Trozos frescos de espesor no mayor de 3 á 4 mm. se ponen en una solución al 3 % de nitrato de plata durante 4 á 6 días en la estufa para parafina á 30.35° resguardados de la luz; toman un color blanco primero y luego dorado. Si se secciona el trozo se observa que la substancia gris ha tomado un tono más obscuro que la substancia blanca y el resultado es

bueno cuando ese contraste persiste; pero si la coloración es regular, uniforme, no se obtendrán buenos cuadros de neurofibrillas.

El título de la solución de plata, que puede servir para uso general, es de 3 ‰; para ciertos animales: invertebrados, gusanos, 6 ‰; cuando se trate de embriones, fetos y animales recién nacidos, retina, etc., la proporción será 1.5 ‰, 1 ‰, 0.5 ‰. Con soluciones débiles no se produce sobre-coloración periférica pero, por otra parte, se favorecen así, alteraciones celulares y fibrillares por la lenta penetración del fijador; de manera que cuando se trabaje con piezas grandes debe darse la preferencia á las soluciones más concentradas. Según R. Cajal, se usará tanta plata disuelta como peso tenga él ó los objetos.

2º Después de 4 á 6 días, se retiran los trozos del baño de plata, se lavan rápidamente con agua destilada y se colocan en la siguiente solución reductora, por 24 horas, á la luz del día y á la temperatura de la pieza:

Acido pirogálico	1 gramo
Formol	5 á 15 c. c.
Agua destilada	100 c. c.

3º Se endurecen en alcohol á 96 ‰, se incluyen de preferencia en parafina y después de las maniobras conocidas se conservan en la obscuridad.

Las porciones más periféricas y centrales del trozo no son apropiadas; sólo sirve la parte media que presenta una coloración café diferenciándose de la externa negra y de la interna amarilla.

Un discípulo de Lenhossék, Bakay, agregó al procedimiento, un baño de oro. Cuando los cortes se sacan del agua destilada pasan á una solución débil de cloruro de oro (4 c³ de solución al 1 ‰ en 150 c³ de agua destilada), de 10 minutos á una hora según el tamaño. El color amarillo pasa al gris acero, cambio que se nota á simple vista, pero que es preferible observarlo debajo del microscopio. Las fibrillas se destacan por su color negro intenso, el resto de la célula, con exclusión del nucleolo, permanece incoloro ó con un tono ligeramente violeta. Si esto se comprueba, bastará dejar por 5 minutos en hiposulfito (150 ‰) y por 10 en agua corriente ó dentro de un cristalizador que se renovará muchas veces. Se aclara y monta en bálsamo, etc.

Examinando la preparación, se observa que la substancia fundamental de las células nerviosas y sus dendritas, que antes mostraban un color amarillo, parecen casi incoloras; se ven las neurofibrillas como si estuviesen libres, extracelulares, de un color intensamente negro, tanto las gruesas como las finas, que por el anterior método casi no se veían. Según Lenhossék es en la zona situada entre las capas interna y externa que se encuentran las mejores representaciones de neurofibrillas.

En vista de los resultados parciales que se obtienen, no se trata de un método que pueda aplicarse á investigaciones anátomo-patológicas, porque es imposible sacar deducciones sobre el resto del tejido no influenciado por el nitrato de plata.

MANUEL BEATTI.

(De la Universidad de La Plata).