

# ALGUNAS PRECISIONES SOBRE EL PROCEDER DE FORMOLBROMURO Y PLATA AMONIACAL, PARA LA COLORACIÓN DE LA GLIA Y MICROGLIA PATOLÓGICA, SINGULARMENTE DE LA PARALISIS GENERAL

POR

**S. R. y Cajal.**

Hace tiempo publicamos un método (1) sencillo derivado de los bien conocidos de Fajerstajn y de Bielschowsky para la coloración de la macroglia y microglia. Esta técnica, sumamente cómoda, es aplicable a la neuroglia de todos los vertebrados y da los mejores resultados en el hombre.

Nuestra labor durante los últimos meses ha consistido en fijar las condiciones determinantes del buen éxito y establecer una fórmula que sea aplicable, con leves variantes, a todos los casos normales y patológicos (macroglia y microglia).

Sin entrar aquí en disquisiciones históricas acerca de los muchos procederes imaginados en estos últimos años, por estimar tal reseña impropia de una nota preliminar (bástenos citar los nombres de Weigert, Nissl, Alzheimer, Held, Da Fano, Achúcarro y Del Río-Hortega) expongamos sumariamente los diversos momentos técnicos.

1. Piezas lo más frescas posibles se induran en nuestro fijador al formolbromuro:

Bromuro de amonio.....	2 grams.
Agua.....	85 c. c.
Formol.....	15 —

En este líquido permanecen los bloques desde tres días a dos meses.

---

(1) Cajal: «Una modificación del método de Bielschowsky para la impregnación de la neuroglia común, mesoglia, etc.» *Trab. del Lab. de Investig. Biol.*, tomo XVIII, 1920.

2. Secciones de 20 a 30  $\mu$  obtenidas en el micrótomo de congelación y recogidas en el baño fijador. Para casos especiales pueden aprovecharse cortes de 40  $\mu$ .

3. Si el objeto destinado a la coloración es difícil (conejo, batracios, reptiles, ciertos estados patológicos, etc.), sumérgense los cortes por cuatro o más horas en este baño reforzador:

Agua.....	70 c. c.
Bromuro de amonio.....	3 gramos.
Formol neutro.....	30 c. c.

Nosotros empleamos este reforzador casi constantemente, porque facilita la impregnación del cuerpo de las células y en los casos en que no es necesario, podemos fácilmente descartar el exceso de formol y de bromuro insistiendo en los lavados.

4. Lavado rápido por algunos segundos, lo más medio minuto, en tres aguas, la última destilada.

5. Inmersión de las secciones en este baño:

Disolución de óxido de plata amoniacal....	10	c. c.
Agua.....	10 a 12	—
Piridina.....	7 a 10	gotas.

Permanecerán las secciones en este líquido, a la temperatura ordinaria, diez minutos, procurando removerlos para que se empapen por igual del óxido que constituye la sustancia activa. Después se llevan a la lámpara puestos en un pequeño cristizador, hasta que adquieran color marrón oscuro, sin llegar al tono pardo negro. Cuando se trate de piezas patológicas del hombre, el matiz será de tabaco claro.

6. Lavado rápido (cuatro a diez segundos) en dos cristalizadores con agua destilada.

7. Reducción en el formol neutro al 5 por 100. Si el formaldeido encerrara algo de ácido se neutraliza previamente con carbonato de cal puro.

8. Al cabo de tres a cinco minutos se extraen los cortes del formol, se lavan y se someten a un virado de cloruro de oro amarillo puro al 1 por 300 o 400. El virado durará veinticinco minutos a la temperatura ordinaria y diez a quince en la estufa a 35°, a menos que no se desee vigorizar notablemente lo teñido (preparaciones pálidas), en cuyo caso se abandonarán los cortes en la incubadora durante una hora.

9. Hiposulfito de sosa al 5 por 100 con algo de bisulfito y un poco de alcohol, para aclarar las secciones.

10. En fin, lavado y montaje, según las reglas.

Con esta fórmula preséntanse las células neuróglícas del cerebro, cerebelo, médula espinal, etc., intensamente impregnadas. Si se deseara una coloración del *tipo fibrilar* (a semejanza del método Weigert), es decir, con los somas pálidos y las hebras neuróglícas enérgicamente negras, no hay sino disminuir al tercio o al cuarto el tanto de óxido de plata amoniacoal o prescindir por completo del reforzador. Sin embargo, no olvidemos que los resultados varían mucho según los vertebrados en que la fórmula se aplica, la fase evolutiva del animal y los diversos estados patológicos. Un tanteo preliminar nos enseñará en cada caso la pequeña modificación más conveniente.

Con este proceder hemos conseguido nosotros coloraciones irreprochables y muy vigorosas de la glia de la substancia gris y blanca del hombre y demás mamíferos, aves, reptiles y batracios. Y esto con una constancia que hasta ahora no hemos logrado con ningún otro método, ni siquiera con el del oro y sublimado. El período útil de la reacción dura de cuatro días a mes y medio.

Una de las formas de neuroglia que se impregna enérgicamente es la residente en la capa molecular y la llamada *glia marginal*.

El principiante puede, no obstante, fracasar parcial o totalmente a causa de las siguientes condiciones, cuyo influjo ha sido cuidadosamente analizado por nosotros durante los últimos meses.

a) Por usar un baño de plata amoniacoal excesivamente alcalino o empobrecido por precipitación, que se exagera todavía bajo la acción de la luz.

b) Por exageración en el lavado después de la acción del baño de plata, lo que descarta demasiada materia activa. Este efecto se reconoce fácilmente al examinar la preparación y advertir la palidez de los cuerpos celulares y la impregnación casi exclusiva de los núcleos de los grumos de Nissl y de algunas fibras de Weigert.

c) Por calentar tanto los cortes durante la acción de la plata amoniacoal que éstos adquieran tono tabaco negro.

d) Por usar cloruros de oro impuros del comercio, cuya acidez corroe la impregnación.

e) En fin, a causa de usar piezas algo alteradas por autolisis o malaxadas u oprimidas en el momento de extraerlas de sus es-

tuches óseos correspondientes. A esto se deben, sobre todo, los fracasos en el hombre, donde si las piezas son frescas (pocas horas después de la muerte y mejor aún el cadáver todavía caliente) consíguense coloraciones espléndidas de todas las especies de glia (1).

IMPREGNACIÓN DE LA MICROGLIA.—Aprovéchase la misma fórmula, sin más que introducir en ella estas tres mudanzas:

1. Las secciones hiperbromuradas permanecerán en el baño frío de la plata amoniacal de doce a veinte minutos, hasta que la trama nerviosa presente un tono ligeramente pajizo, circunstancia ya notada por Del Río-Hortega al emplear su excelente método del carbonato de plata amoniacal.

2. Breve calentamiento de los cortes a la lámpara hasta que éstos adquieran tonalidad amarilla ligeramente pardusca, como de paja alterada por la intemperie.

3. Lavado subsiguiente de los mismos en tres aguas (cinco a veinte segundos).

4. Virado como en el método principal, sólo que en vez de permanecer las secciones veinte o más minutos en el baño de oro, sólo permanecerán cinco a diez minutos y en frío. Este virado, más que reforzar el teñido, tiene por objeto limpiar el fondo y la superficie de las secciones, formando cloruro de plata soluble en el hiposulfito de sosa. El color violado muy claro de las mismas es indicio, ya reparado por Del Río-Hortega, de que la reacción ha salido bien o por lo menos que es aceptable. No debemos olvidar que la coloración de la microglia constituye una reacción primaria, rápidamente disipada cuando se prolonga la acción del calor de la lámpara para dar paso a la impregnación de la glia común. Entre ambas fases los cortes reducidos pueden exhibir las dos modalidades neuróglícas.

Con el método antedicho el período de reacción útil de la

---

(1) El baño de plata amoniacal puede ser cualquiera de los propuestos. Nosotros solemos componerlo precipitando una solución de 20 c. c. de nitrato de plata al 10 por 100 por 12 gotas de lejía de sosa cáustica al 40 por 100. Después de seis lavados con agua destilada, añadimos 120 c. c. de este mismo líquido y disolvemos el precipitado (agitándolo mediante varilla de cristal) con algunos centímetros cúbicos de amoníaco. Se cuidará de que no haya superabundancia de álcali; si la hubiere, se abandonará el frasco destapado con el reactivo durante dos o tres días, para que se vaporice el amoníaco en exceso. Un matiz ligeramente moreno del líquido no impide la coloración de la glia.

microglia dura cerca de un mes. A los quince días se obtienen aún preparados excelentes, sobre todo en el hombre.

Muy apropiados para el caso son los procesos morbosos, singularmente la parálisis general, donde conforme han notado Achúcarro, Gayarre y sobre todo Del Río-Hortega, preséntanse en gran número las células en bastoncito, con gradaciones de hipertrofia y otras alteraciones interesantes, de que trataremos en otro lugar. En los animales normales, la microglia se tiñe menos constantemente.

Es claro que el buen éxito en éste como en todos los métodos, depende del cuidado y diligencia puestos por el observador y de la observancia estricta de las manipulaciones. Desgraciadamente, no existen técnicas automáticas; por lo tanto, la atención perseverante y la experiencia personal, aun en proceder tan sencillo y seguro, son factores decisivos.