

decrece mientras que la acción repulsiva de los centrómeros aumenta para llegar al máximo en la anafase. Esta es la razón de que al separarse cada dos centrómeros determinen el enderezamiento de la fibra del huso a la cual están unidos.

Hemos expuesto estos hechos para deducir de ellos el papel preponderante que se le asigna a los centrosomas y a los centrómeros en el origen de las células cancerosas, mitosis anormales, etc.

Las mitosis anormales, provocadas por muchos valiéndose de la colchicina, precioso instrumento de análisis citogenético, se deben, según LEVAN, a que esta sustancia inhibe la división de los centrómeros y la acción del huso acromático; por eso, al no separarse, los cromosomas en la meiosis y las cromátidas en la mitosis, durante la metafase, se producen células hijas con un número de cromosomas igual a $4n$ (tetraploides), $8n$ (octoploides), o con algunos repetidos (poliploides). A. LEVAN ha visto en *Allium* células que presentaban 500 pares de cromosomas (siendo su número inicial 12) bajo la influencia perturbadora de la colchicina sobre el mecanismo regulador de las mitosis.

P. y N. GAUVDAN (sus trabajos han sido efectuados en el Laboratorio de Genética de la Escuela Nacional veterinaria de Alfort, y J. DURAND creen que la acción mitoinhibidora de la colchicina, así como la del hidrato de cloral, frío, rayos X, acenafieno, etc., se ejerce sobre el huso acromático exclusivamente. En preparaciones de raíces de trigo tratadas por acenafieno, fijadas mediante el Navaschine y teñidas mediante el carmín acético no se ve el huso acromático, y en las fijadas con el líquido de Regaud comprobaron la existencia de una masa fusorial, dentro de la cual yacen los cromosomas, que rechaza a las vacuolas y mitocondrias hasta su periferia. Esta misma repulsión de las mitocondrias se observa en los husos normales fijados en Helly o en Regaud. Esta sustancia central sería la del huso sin disponerse en fibras; lo prueba el hecho de que los fijadores mitocondriales demuestran la existencia de una sustancia análoga a la del huso y el desorden con que se verifica la marcha de los cromosomas paralizados hacia los polos. Esta acción no se ejerce,

según estos autores, sobre el citoplasma, sino provocando la desnaturalización del huso.

Si tenemos en cuenta que las sustancias cancerígenas provocan efectos análogos, véase lo que se ha progresado en el conocimiento del origen de la célula cancerosa desde la época en que BARD, DEBOVE y MARSHAL afirmaban que una anarquía celular determinaba una multiplicación anormal de ciertas células, que se levantaban contra el organismo llevando una vida desordenada.

Córdoba 14 de febrero de 1944.

Procedimiento rápido de deshidratación

Trabajo del Laboratorio de Histología de la Facultad de Veterinaria de Córdoba. Catedrático, Dr. Germán Saldaña Sicilia.

POR

LUIS LATORRE GLAUSER

Alumno ayudante de Laboratorio.

La guerra ha interesado a la industria en todas sus ramas, determinando la carestía de materias primas. Se carece de productos esenciales y hay que acudir a los sustitutos, que a veces se valorizan como mejores, o bien a economizar en el grado máximo los productos que antes se usaban sin medida.

El procedimiento de deshidratación que presentamos a estudio, economiza gran cantidad de alcohol, en especial de absoluto, cuyo precio es bastante elevado en el mercado. Entre otras ventajas descuella una rapidísima deshidratación, que reduce al mínimo el tiempo empleado en hacer un diagnóstico, evitando además el deterioro de las pequeñas biopsias al trasladarlas de unos recipientes a otros. Estas ventajas son las que comentamos y exponemos en las conclusiones de este artículo.

El procedimiento está basado en el de A. DE LAUNAY, el cual ha construido un aparato (Fig. 1), que consiste en un recipiente de cristal, con una

estrangulación central, sobre la que lleva una tela metálica inoxidable. La necesidad de ser inoxidable se debe a que los óxidos que se desprenderían al llegar el agua de constitución de los tejidos a los metales oxidables atacarían la pieza a deshidratar.



Fig 1

Nosotros hemos sustituido con ventaja este aparato por un frasco Borrel o por un tubo de ensayo corriente, porque con éstos, especialmente con el último, se economiza más alcohol. En el interior de ellos colocamos una serie de tubitos hechos de varilla de vidrio hueca, todos ellos de una longitud aproximada a la mitad de la altura del recipiente; en el frasco de Borrel los tubitos llevan una escotadura en su parte inferior, para facilitar la perfecta difusión del agua que cae a la parte inferior del recipiente. Los aparatos deben estar obturados por un tapón de vidrio o de corcho, para evitar la hidratación del alcohol del recipiente por el vapor de agua atmosférico.

Se pondrá en el recipiente una cantidad de alcohol absoluto suficiente para recubrir los tubitos, teniendo gran cuidado, una vez puesto a funcionar el aparato, de no darle golpes ni cambiarlo de lugar, porque esto originaría una posible mezcla del alcohol y del agua, con la consiguiente inutilización.

En el procedimiento corriente de deshidratación las piezas se encuentran en las peores condiciones para perder su agua de constitución, pues como están en el fondo, el agua desprendida se queda a la altura de las piezas al no poder descender a otras capas inferiores, siendo preciso agitar de vez en cuando el frasco para que el agua del fondo se mezcle con el alcohol, operación que generalmente no se realiza.

El fundamento del método estriba en la dife-

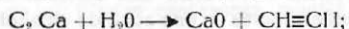
rente densidad del alcohol y del agua. La densidad del agua (1,00) es superior a la del alcohol, generalmente etílico (0,80), que flota sobre el agua si los dos líquidos se superponen con cuidado. De esto se deduce la precaución de no mover el recipiente deshidratador, pues de lo contrario ambos líquidos se mezclarían, por la gran facilidad con que pueden hacerlo. Experimentalmente puede verse cómo una columna de agua descende a través de una zona de alcohol absoluto sin mezclarse con él. Para ello se disuelve en el alcohol una sustancia que sea insoluble en el agua, por ejemplo el Sudán III; con una pipeta pequeña se toma agua y se deja salir con cuidado un pequeño chorro en la parte superior del alcohol, que tendrá un color rojizo. El agua caerá y se depositará en la parte inferior conservándose incolora.

De modo análogo, colocando un tejido, impregnado de agua por naturaleza, el agua de constitución, por su mayor densidad tenderá a ir al fondo del recipiente, siendo sustituida por el alcohol, siempre absoluto, de la parte superior. La columna de agua que cae puede ser observada previa fijación con el líquido Bouin, debido a que dicha columna adquiere coloración amarillenta por el ácido pícrico. La deshidratación se suspende en el momento en que cesa de caer dicha columna. Sin embargo, este indicador pronto se inutiliza por la facilidad con que el alcohol se colorea de amarillo al disolverse el ácido pícrico en él.

Siguiendo este método hemos deshidratado perfecta y rápidamente 20 piezas de tiroides de vaca, con un peso total de 5,6 gramos, en 40 c. c. de alcohol absoluto, correspondiendo por pieza 2 c. c. de alcohol; cantidad muy reducida si se considera lo que suele gastarse ordinariamente en alcoholes de 70°, 90° y en los dos pases, por lo menos, de absoluto. Pero trabajando en estas condiciones, el agua de la parte inferior se dispone horizontalmente a través de las escotaduras de los tubos, aumentando su cantidad a medida que se deshidratan las piezas, y llega un momento en que éstas no pueden deshidratarse bien.

El gasto de alcohol puede reducirse aún más poniendo en el tubo una sustancia que absorba

o reaccione con la columna de agua desprendida. En el grupo de las sustancias absorbentes se encuentran el sulfato de cobre, el carbonato sódico anhidro, etc. En el grupo de las sustancias reaccionantes se incluye el carburo cálcico (2), una molécula del cual es capaz de reaccionar con dos de agua, pasando el calcio por un estado intermedio de óxido de cal:



quedando como productos de la reacción hidróxido cálcico, que cae al fondo del recipiente, y etino o acetileno que se desprende en forma gaseosa. Una cantidad de 64 gramos de carburo cálcico (una molécula gramo) es capaz de reaccionar con 36 gramos de agua (2 moléculas gramo); trabajando con carburos comerciales, 10 gramos de éste reaccionan con 4 c. c. de agua.

Para este procedimiento de deshidratación usamos primeramente un tubo de ensayo en dos bateas, la superior para las piezas, y la inferior para el carburo. El número de piezas deshidratadas con este aparato es mucho mayor, con la consiguiente reducción de alcohol, pudiendo utilizarse éste casi íntegramente ya que el aparato puede recargarse de carburo cálcico hasta que el sedimento de hidróxido alcance el soportemetalico.

Prácticamente este aparato tiene el inconveniente de que al desprenderse el acetileno se remueve el alcohol, provocando la mezcla con el agua desprendida de la pieza. Para evitarlo damos salida al etino por un tubo independiente del que contiene la pieza a deshidratar. La figura 2, representa el nuevo aparato. La pieza se encuentra en un soporte metálico inoxidable (A), situado en un tubo lateral, acodado y soldado con el recipiente (B), en cuya parte inferior se encuentra un cesto (C), de tela metálica tupida, que sostiene los fragmentos de carburo cálcico. Más abajo se encuentra un ensanchamiento cilíndrico (D), en el que se va depositando el hidróxido cálcico y que además sirve de base de sustentación. Cada uno de los dos tapones de corcho (E) que cierran el aparato lleva una escotadura para dar paso al alambre encargado

de sostener el cesto correspondiente. El orificio del tubo recto (B) tiene otra misión; dar salida al acetileno.

El fundamento de su funcionamiento es parecido al de los anteriores; el agua desprendida resbala por la acodadura y reacciona con el carburo en el tubo B. El acetileno se desprende en forma de pequeñas burbujas, y el hidróxido cálcico, por su mayor densidad, desciende al recipiente inferior, calculado para 40 cm³ de este producto.

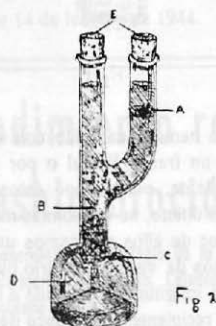


Fig. 2

Para usar el aparato basta llenarlo de alcohol hasta un cm. aproximadamente por encima del cesto de las piezas (unos 60 c. c. en total); al mismo tiempo se dejan caer unos trocitos de carburo en el tubo B. Hecho esto el aparato está en condiciones de funcionar, al depositar la pieza o piezas con cuidado, y desde que se use la primera vez se procurará no moverlo, ya que entonces no sólo se mezclaría el alcohol con el agua, sino que parte del sedimento de hidróxido cálcico quedaría en suspensión penetrando las partículas de éste en la pieza a deshidratar y apareciendo más tarde en los cortes.

Después de deshidratar varias piezas el carburo se va consumiendo, por lo que es preciso añadir más, lo que puede hacerse fácilmente. Sin embargo después de un gran número de deshidrataciones el recipiente inferior se llena de hidróxido cálcico, siendo preciso extraer el alcohol (que se vuelve a usar una vez filtrado), sacar el sedimento, limpiar bien el aparato, se-

carlo y volver a cargarlo de alcohol. Es de recomendar que el alcohol absoluto que se vaya a utilizar se ponga antes en un frasco en presencia de carburo, ya que siempre contiene trazas de agua, que se eliminarían en el aparato con la consiguiente formación de precipitado, lo que disminuye el rendimiento.

El gasto teórico de alcohol con este aparato es reducidísimo, tan sólo el que se llevaría la pieza en sustitución de su agua de constitución; pero en la práctica no ocurre así, ya que el sedimento de hidróxido lleva consigo una cierta cantidad de alcohol.

Los resultados han sido bastante satisfactorios. Por término medio se han deshidratado con 60 c. c. de alcohol, de 55 a 60 piezas, llegando en ocasiones a 70 y en todas ellas la deshidratación fué perfecta. Las piezas utilizadas proceden de hígado del feto de vaca. Pesaron un total de 10 gr. y arrojaron un contenido en agua del 85 %, con un volumen total de 10 cm³, de lo que se deduce que se redujo el gasto de alcohol por pieza a menos de un c. c.

La rapidez con que se verifica la deshidratación es otra de las principales ventajas del método, pero, para sacar el máximo rendimiento a esta cualidad, las piezas no deben ser de un espesor superior a 2 o 3 mm.: su superficie no importa. Para las piezas del espesor mencionado basta con dos horas de deshidratación, pero el tiempo puede variar con el espesor de la pieza y la facilidad de penetración por el alcohol. El tiempo mínimo para piezas de 1, 5 mm. de espesor puede reducirse a 40 minutos.

Las propiedades tintoriales de los tejidos, al deshidratarse por este procedimiento, no sufren la menor alteración, como hemos podido observar después de usar los más corrientes procedimientos de coloración (hemalum-eosina; Cajal; Mallory; Giemsa; Van Gieson; etc.); las preparaciones teñidas por el método de hemaalum-eosina observadas un año después de ejecutadas no han sufrido la menor alteración en su coloración.

El aparato de deshidratación, sobre todo en sus primeros modelos, tiene aplicación en la decalcificación, puesto que las sales cálcicas que impregnan los tejidos, son más pesadas

que los líquidos que se emplean en la decalcificación.

Entre los inconvenientes figura la molestia de recargar de carburo y sobre todo la de limpiar el sedimento de hidróxido cálcico; pero es preferible el cambio continuo de recipientes, en el procedimiento corriente de deshidratación, que incluso puede ser un peligro cuando se trata de pequeñas biopsias insustituibles. Otro inconveniente es la posible diseminación de hidróxido en el alcohol, que puede penetrar en la pieza, pero puede evitarse guardando el deshidratador de las sacudidas, y en caso de que se produzca se dejará reposar el aparato 24 o 48 horas, tiempo suficiente para que las partículas sedimenten y quede limpio el alcohol.

Conclusiones

1.º En el procedimiento corriente de deshidratación las piezas se encuentran en las peores condiciones, porque, al estar en el fondo del recipiente, el agua que se desprende de ellas impide la perfecta deshidratación.

2.º De las piezas suspendidas de la parte superior del alcohol se desprende una columna muy rica en agua, y este producto, resultante del desprendimiento se mezcla difícilmente con el alcohol salvo que un movimiento brusco facilite dicha mezcla.

3.º El gasto de alcohol absoluto usando este procedimiento de deshidratación puede reducirse a 2 c. c. por pieza de 1 cm.³, y en muchas ocasiones a la mitad, al reaccionar el agua desprendida con el carburo cálcico.

4.º Se disminuye considerablemente el tiempo empleado en hacer una deshidratación ya que corrientemente no dura más de dos horas, pudiendo reducirse a 40 minutos.

5.º Las propiedades tintoriales de los tejidos, así como la conservación de las coloraciones que hemos ensayado, no se alteran usando este procedimiento de deshidratación.

Bibliografía

- DELAUNAY, A. La deshidratación méthodique dans la technique histologique. *Bull. d'Hist. app.* 17, 246 (1.940).
- FERRER, D. Manual de Técnica Histológica. pág. 117 y 127. Barcelona 1.931.