


Iniciació a les tècniques histològiques vegetals i animals

Tècniques d'obtenció de preparacions
d'estructures i de teixits animals

Autors: Mercè Dufort i Coll



 Generalitat de Catalunya
Departament d'Ensenyament
Direcció General
d'Ordenació Educativa
Centre de Documentació
i Experimentació de Ciències

Pg. de la Vall d'Hebron, 64-70
08023 BARCELONA
Tel. 417.68.75/417.67.70

TÈCNiques D'OBTEncIÓ DE PREPARACIONS D'ESTRUCTURES I DE TEIXITS ANIMALS

INTRODUCCIÓ

La tècnica histològica té nombroses possibilitats que permeten de dur a terme estudis exhaustius dels òrgans i dels teixits animals més diversos i heterogenis. Aquestes tècniques tenen una gran importància per a la interpretació morfològica dels òrgans i, a la vegada, coneguda la seva estructura, s'hi poden situar els indrets on es duen a terme les diverses funcions. Tot això fa que la histologia hagi estat, sigui i continuarà essent una de les branques de la ciència que no s'anquilosarà mai, ni perdrà mai la importància, ja que qualsevol mena de treball, fins i tot algun de caire sistemàtic, ha de recórrer alguna vegada a l'aplicació de tècniques histològiques, per simples que siguin.

Abans d'observar res al microscopi, hem de prendre una colla de precaucions, a fi que, la imatge observada sigui al més informativa possible, i la precaució més simple consisteix a posar l'objecte d'estudi entre un portaobjectes i un cobreobjectes, a sobre d'una gota d'aigua o no. A vegades, el material a estudiar és massa gruixut, i, com que no és transparent, fa que, en observar-lo al microscopi, no s'hi vegi res, per la qual cosa caldrà obtenir-ne trossets o talls prou fins per poder esbrinar l'estructura del material en qüestió.

Per sintetitzar les diverses possibilitats adoptades per dur a terme un estudi de qualsevol mena d'estructura, considerarem diversos casos que es plantegen quan es fa la dissecció de qualsevol animal, tant si és invertebrat com vertebrat.

En primer lloc, farem una distinció entre **preparacions temporals**, és a dir, aquelles que, una vegada observades, dibuixades o fotografiades, es desfan, i les **preparacions permanents**, que es poden conservar anys, sense que perdin l'interès.

A. PREPARACIONS TEMPORALS

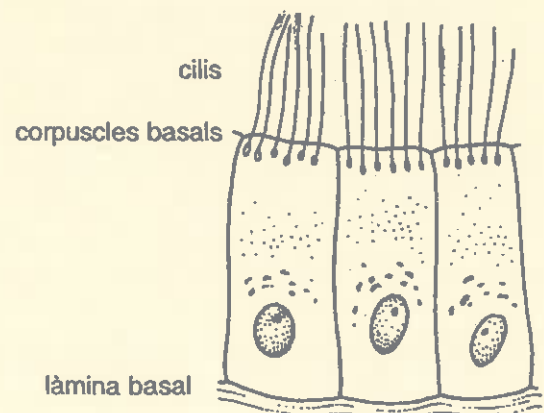
En fer la dissecció de qualsevol animal, podem obtenir-ne una colla de preparacions temporals, és a dir, preparacions muntades, generalment, en una gota d'aigua, que ens permetran estudiar determinades estructures i, tot seguit, desfer-les.

Així, en fer la dissecció del músculo (*Mytilus edulis*), com a exemple d'invertebrat, podem obtenir-ne les preparacions temporals següents:

I. Preparació de làmines branquials

1. Tallarem un trosset de làmina branquial i el muntarem en una gota d'aigua salada o en una gota de líquid retingut en la cavitat paleal.
2. Una vegada posat el cobreobjectes, el pressionarem lleugerament.
3. L'observarem al microscopi, primer en un augment petit, i després, en un de més gran: cal tancar força el diafargma per aconseguir més contrast.

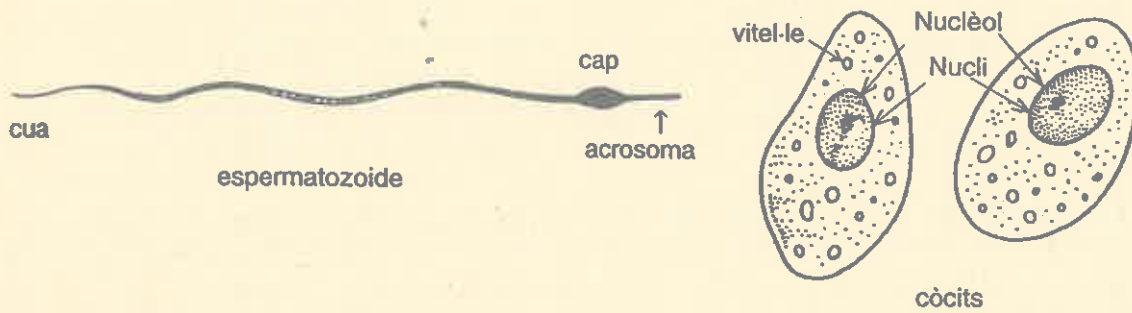
Advertiment: Observeu-hi el moviment dels cilis de l'epiteli branquial. S'hi veuen molt bé, atès el volum, que en aquesta mena de material és considerablement gros, els corpuscles basals i les arrels ciliars, encara que no es diferencien. S'hi poden observar, a vegades, diverses espècies de ciliats.



II. Preparació de gònades

1. Tallarem un trosset de glàndula de *Polichinela* (situada sota el peu del musclo) o bé una mica de les seves expansions entre les dues fulles del mantell i la posarem sobre una gota d'aigua salada o en una gota de líquid de la cavitat paleal.
2. Una vegada posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió.
3. Ho observarem al microscopi, amb el diafragma força tancat, ja que no hem tenyit les estructures, i així obtindrem més contrast.

Advertiment: Observeu-hi les cèl·lules germinals, masculines o femenines, segons el sexe del musclo. Els musclos mascles acostumen a tenir les gònades de color blanquinós, mentre que les femelles solen tenir-les vermelloses, encara que, la comprovació final, cal fer-la al microscopi.



III. Preparació de fibres musculars

1. Tallarem un trosset dels extrems del mantell, o bé una mica del múscul adductor de les valves i el posarem sobre una gota d'aigua.
2. En dissociarem les fibres dins una gota d'aigua de mar o de sèrum fisiològic, amb l'ajut d'agulles, i hi posarem el cobreobjectes, tot fent-hi una lleugera pressió.

Advertiment: Observeu-hi, amb el diafragma força tancat, les fibres musculars llises, fusiformes. Aquest material pot muntar-se en una gota de glicerina, i la preparació, en aquest cas, és permanent.

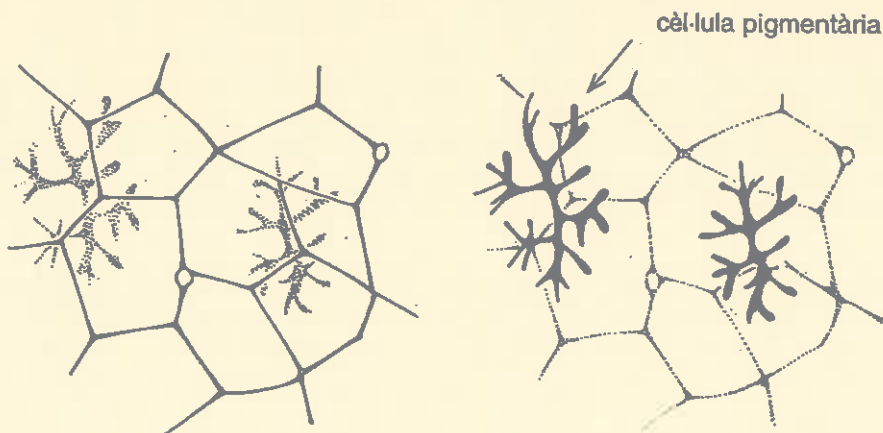
• • •

En fer la dissecció de la granota (*Rana ridibunda*), com a exemple de vertebrat, es poden obtenir les preparacions temporals següents:

I. Preparació de pell

1. Tallarem un trosset de pell i el muntarem dins d'una gota d'aigua i tot seguit hi posarem el cobreobjectes.

Advertiment: Observeu-hi, primer a petits augments, i després a més grans augments, les cèl·lules epitelials, poligonals i aplanades, entre les quals hom pot veure orificis que corresponen als orificis excretors de les glàndules (molt abundants en aquesta classe de pell); per transparència, hi podrem observar també cèl·lules pigmentàries, més profundes, amb l'aspecte estrellat típic, molt irregular. Cal fer-hi la dissecció òptica, és a dir, que primer s'enfoquen les cèl·lules epitelials, i després, amb el cargol micromètric, s'enfoca un pla inferior, en què trobarem les cèl·lules pigmentàries.



II. Preparació del contingut de l'estómac

1. Obrirem longitudinalment l'estómac de la granota i en treurem el contingut, una part del qual posarem sobre una gota d'aigua.
2. Hi posarem el cobreobjectes i el pressionarem lleugerament.

Advertiment: Hom hi podrà observar artells d'insectes i d'aràcnids, i també tricomes i restes vegetals. El nombre d'estructures a observar depèn del temps que faci que la granota no ha menjat i del grau de digestió dels aliments. Com sempre, caldrà accionar el diafragma fins a trobar la llum més adient.

III. Preparació del contingut del recte

1. Negligirem la part final del recte, generalment molt negrosa, i buidarem la part següent, és a dir, el tros que hi ha a un centímetre del final; sobre una gota d'aigua destil·lada, o bé sobre una gota de líquid fisiològic, posada ja sobre el portaobjectes.
2. Un cop posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió i, abans d'observar la preparació al microscopi, la mirarem a ull nu: a vegades s'hi veuen cucs blancs com es mouen.

Advertiment: Observeu-hi les diverses espècies de protozous, els uns paràsits, els altres comensals, que es troben habitualment al recte de la granota i dels gripaus. Els més freqüents són:

Ciliats:

Nycotherus codiformis

Balandidium entozoon

Trichodina pediculus

Flagel·lats:

*Opalina ranarum**

També poden observar-s'hi diverses espècies de nemàtodes, cèstodes i tremàtodes que, per transparència de llur tegument, deixen veure el tracte digestiu. És molt interessant l'estudi de la regió anterior, on fàcilment es veu la ventosa i la musculosa faringe (en el cas dels tremàtodes i cèstodes). Així mateix, pot observar-s'hi la musculatura de la paret del cos i la distribució de l'aparell reproductor. Entre d'altres, són típics els tremàtodes següents:

Cephalogonimus sp.

Opisthoglyphus ranae

IV. Preparació d'espermatozoides

Tallarem amb una fulla de bisturí o d'afaitar un testicle de la granota sobre una gota d'aigua o sobre líquid fisiològic; el buidarem una mica sobre una gota d'aigua posada prèviament damunt el portaobjectes i, tot seguit, hi posarem el cobreobjectes.

Advertiment: Observeu-hi la morfologia dels espermatozoides, que és molt típica i que es pot veure molt bé, sempre que accionem convenientment el diafragma. Aquest procediment pot fer-se servir sempre en fer la dissecció de qualsevol vertebrat.

V. Preparació de fibra muscular estriada

1. Tallarem un tros de múscul de l'anca de la granota, per exemple, i el posarem sobre una gota d'aigua o de líquid fisiològic.
2. Dissociarem el múscul amb l'ajut d'agulles; dins una gota d'aigua o de glicerina.
3. Després d'haver-hi posat el cobreobjectes, hi farem una lleugera pressió.

Advertiment: Les bandes A i I de la fibra muscular estriada es veuen molt bé, diafragmant adequadament. Aquesta preparació pot ésser permanent, per a la qual cosa caldrà, una vegada feta la dissociació, fixar el material amb una mica de formol al 6%, per exemple, durant uns 15 minuts, i tot seguit, caldrà muntar el material amb una gota de glicerina. Cal recordar que aquesta classe de muntatge no s'asseca mai i que cal vorejar o cimentar la preparació mitjançant esmalt d'ungles.

Un bon material per poder veure la fibra muscular estriada és el pernil dolç, el qual, malgrat ser cuit, deixa observar a la perfecció, sense que calgui prèviament fer-ne cap tinció, l'estriació, tot tancant el diafragma. Aquest material, el pernil dolç, acostuma a ser adulterat amb fècula de

6. Kudo, R.R.: Protozoología. C.E.C.S.A., Mèxic, 2.a reimpressió, 1972.

patata, pastanaga, etc. Per fer aquesta comprovació cal comprar pernil dolç del més econòmic que hi hagi i després de dissociar-lo lleugerament es deixa durant un minut en solució de Lugol o en tintura de iode, es renta amb aigua destil·lada, es munta en una gota de glicerina i ja es pot procedir a fer-ne l'observació. Si hi ha midó, aquest destacarà per haver quedat tenyit totalment de color blau-negre. Atès que la tinció és temporal, no caldrà segellar el cobreobjectes.

Advertiment general: Aquestes preparacions les considerem temporals. És possible, però, d'obtenir-les permanents; cal recordar que la tècnica és, en aquest cas, més llarga, ja que cal fixar les estructures perquè no s'alterin amb el temps.

A excepció de la preparació de la pell, totes les altres poden obtenir-se en fer la dissecció d'altres classes de vertebrats, com per exemple del ratolí, de la rata o del conill, animals de dissecció molt sovint utilitzats per a aquesta mena de classes pràctiques.

Amb la pell del ratolí o de qualsevol altra classe de vertebrat no podem fer l'observació directament, ja que és massa gruixuda i no és transparent, per la qual cosa caldrà seguir la tècnica d'obtenció de talls que indicarem a continuació.

El contingut de l'estómac i del recte dels animals és una font d'organismes comensals els uns i paràsits, els altres, bé siguin protozous o metazous, molt interessant i a tenir en compte.

B. PREPARACIONS PERMANENTS

Caldrà considerar dos casos possibles: d'una banda, l'obtenció de preparacions permanents d'estructures animals de les quals, per a llur estudi, no cal obtenir talls; i, de l'altra, les estructures, com són els òrgans, per a l'observació del microscopi, amb les quals caldrà seguir un procés més o menys llarg fins a obtenir-ne les preparacions desitjades.

B.1. PREPARACIÓ D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, NO CAL OBTENIR TALLS

1. Preparació de foraminífers

La sorra d'algunes platges és molt rica en foraminífers fòssils i és una font inesgotable per estudiar les formes més representatives d'aquest grup de protozous.

Hi ha tres possibilitats de muntatge:

- Muntar directament amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.
- Muntar primerament amb una gota de goma aràbiga, deixar-la assecar unes quantes hores i, tot seguit, posar-hi una gota de bàlsam i el cobreobjectes.
- Muntar a l'aire, és a dir, posar el material en sec sobre un portaobjectes i, tot seguit, dipositar un cobreobjectes que tingui una goteta de bàlsam a banda i banda, o bé un cobreobjectes net, que una vegada col·locat es vorejarà o cimentarà amb laca d'ungles.

Advertiment: Els procediments a) i c) són, possiblement, els més idonis. És interessant de triar la sorra de foraminífers amb una lupa binocular i, amb una agulla anar-los posant sobre el portaobjectes.

Per a llur classificació, podem adreçar-nos a l'obra de Colom.⁷

2. Preparació de protozous actuals

Agafarem una mostra de zooplàncton, no gaire concentrada, i la posarem sobre un portaobjectes amb una gota de goma aràbiga, la deixarem assecar i hi posarem tot seguit una gota de bàlsam i el cobreobjectes. També es pot muntar directament amb una gota de glicerina i, en aquest cas, caldrà vorejar el cobreobjectes amb una mica de laca.

Habitualment, les mostres de zooplàncton i de plàncton, en general, són fixades amb formol al 6%, o bé amb alcohol de 90°. Posteriorment, per fer-ne recomptes, es tenyeixen i es conserven amb lugol, encara que aquest pot fer-se servir directament com a fixador.⁸

7. COLOM, G.: Foraminíferos ibéricos. Invest. Pesquera. T. 38 (1), Barcelona, 1974.

8. SCHWOERBEL, J.: Métodos de hidrobiología, Ed. Blume, Madrid, 1975.

3. Preparació de ràdules de cargols o de cefalòpodes

- N'extraurem la ràdula amb pinces o agulles.
- La deixarem uns minuts amb KOH a l'1% en calent, o bé durant unes 12 hores, si es treballa a la temperatura ambient.
- La rentarem amb molta aigua de l'aixeta, durant uns 30 minuts.
- La passarem per aigua destil·lada.
- Muntatge, seguint diverses tècniques:
 - a) Muntatge directe amb una gota de glicerina, vorejant després el cobreobjectes.
 - b) Muntatge amb una gota de goma àrbiga, es deixa assecar i, posteriorment, es munta amb bàlsam del Canadà.
 - c) Muntatge amb bàlsam del Canadà o equivalent.

Aquesta última classe de muntatge requereix una deshidratació prèvia del material, per la qual cosa caldrà seguir els passos següents:

 - 15 min. amb alcohol de 70°.
 - 15 min. amb alcohol de 90°.
 - 15 min. amb alcohol absolut.
 - de 15 a 30 min. amb essència d'eucaliptus.
 - 5 min. amb xilè.

Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà.

Advertiment: És possible, i a vegades recomanable, una tinció de la ràdula, per a la qual cosa, abans de començar la deshidratació, es tenyirà durant un temps variable amb colorants del tipus fucsina àcida a l'1%, hematoxilina o amb blau de metilè al 0,1%. Els temps poden ésser més o menys els següents:

- a) 1 hora amb fucsina àcida a l'1%.

Ho rentarem amb aigua destil·lada que tingui unes gotes d'àcid acètic.
- b) 10 min. amb hematoxilina de Delafield.

Ho rentarem durant 30 min. amb aigua de l'aixeta.
- c) 10 min. amb blau de metilè al 0,1%, o bé 2 min. amb blau de metilè al 0,5%.

Ho rentarem amb aigua destil·lada i farem diverses esbandides.

Segui quina sigui la tinció efectuada, a continuació, després de rentar-lo prosseguirem amb la deshidratació del material. Si no volem tenyir la ràdula, caldrà jugar com sempre amb el diafragma per aconseguir la màxima informació de l'estructura.

4. Preparació d'escates de papallones

Rascarem suaument les ales d'una papallona sobre un portaobjectes i cobrirem la «pols» que hi quedí amb un cobreobjectes, en el qual haurem posat quatre gotes de bàlsam molt menudes, a banda i banda; és un muntatge amb aire.

Es pot fer el muntatge amb bàlsam del Canadà, però l'índex de refracció és molt semblant al de la quitina que constitueix l'escata i, en observar-ne l'estructura al microscopi, no hi ressalten els detalls.

És interessant de fer aquesta preparació amb escates de dues o tres espècies de papallones i veure'n les diferències estructurals.

Advertiment: De la mateixa manera que són test de resolució les preparacions de determinades espècies de diatomees, també es poden fer servir preparacions d'escates de papallones per fer aquest calibratge.

5. Preparació de peces quitinoses d'artròpodes (antenes, artells, genitatives, etc.)

Un cop arrencades les antenes i les potes amb molt de compte, es poden muntar directament amb Hoyer, Berlesse, glicerina-gelatinada, etc., és a dir, amb qualsevol medi de muntatge aquós, encara que, els esmentats són els que donen més bons resultats.

Si volem fer un muntatge amb bàlsam del Canadà, per l'índex de refracció, que ens permetrà d'esbrinar més bé els minúsculs detalls de la quitina d'aquestes estructures, caldrà deixar assecar molt bé el material, fins que quedí ben deshidratat. Això es pot fer de dues maneres: o bé el deixarem assecar a l'aire o dins una estufa, o bé passarem les peces per una sèrie alcohòlica, per essència, xilè i, finalment, les muntarem amb bàlsam. (Vegeu la tècnica del muntatge de talls, pag. 24.)

Si es tracta d'una genitativa, en extreure'n les peces sota la lupa binocular, queden lògica-

ment envoltades per teixits muscular i conjuntiu, que caldrà eliminar, per a la qual cosa cal fer una digestió amb KOH de l'1% al 5%, en calent o en fred, durant un temps que caldrà calcular en cada cas; quan es treballa en calent, el temps, lògicament, és molt més curt.⁹ La potassa, a més d'eliminar la matèria orgànica, transparenta l'estructura i pot ésser interessant, a vegades, de donar-li més contrast, per a la qual cosa podem tenyir-la amb un colorant específic de la quitina, com és el negre de clorazol.¹⁰ El temps de tinció és molt variable, i oscil·la de 15 minuts a unes quantes hores.

6. Preparació d'escates de peixos

- Un cop arrencades les escates de peixos com ara sardina, verat o qualsevol altra espècie les deixarem unes 24 hores amb KOH a l'1% a la temperatura ambient; si s'escalfen dins un vidre de rellotge, el temps és molt més curt.
- Les rentarem amb aigua de l'aixeta de 30 minuts a una hora.
- Les passarem per aigua destil·lada.
- Farem una tinció facultativa, d'una hora amb fucsina àcida a l'1%.
- 15 min. amb aigua destil·lada.
- 10 min. amb alcohol de 70°.
- 10 min. amb alcohol de 90°.
- 10 min. amb alcohol absolut.
- 15 min. amb essència.
- 5 min. amb xilè.
- Les muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà.

7. Preparació de pèls de mamífers

- Tallarem pèls de diferents espècies de mamífers i de diverses parts del cos (regió dorsal, ventral, caudal, cefàlica, etc.).
- Els deixarem 24 hores amb KOH a l'1%.
- Els rentarem amb aigua de l'aixeta de 30 minuts a una hora.
- Els passarem per aigua destil·lada.
- Els deixarem eixugar a l'aire, o bé dins una estufa.
- Els passarem per xilè durant uns 5 minuts.
- Els muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o de DPX.

Advertiment: Aquesta mena de muntatge és el més informatiu. Si el pèl és negre o marró, per veure'n millor l'estructura, cal deixar-lo de 15 minuts a una hora amb aigua oxigenada de 30 volums, perquè es descolori. Els sistemàtics de mamífers indiquen que hi ha més diferències, quant a l'estructura dels pèls, entre els de diverses regions del cos d'una mateixa espècie, que no entre els d'espècies diferents.

En fer l'observació de pèls, o bé de plomes d'ocells, cal esbrinar si sobre l'estructura quitinosa hi ha postes d'ous d'insectes, epiparàsits dels animals en qüestió.

8. Preparació de plomes d'ocells

El millor és muntar-les directament a l'aire.

9. Preparació d'ossos

Agafem un tros d'os de bou o de vedella, el farem bullir i amb una serra petita en farem seccions tan primes com sigui possible. Seran interessants, sobretot, els talls transversals. Els fragments obtinguts així han de quedar reduïts a làmines transparents, per a la qual cosa els passarem les vegades que calgui sobre una pedra d'esmeril, primerament gruixuda i després més fina; cal posar aigua entre l'os i la pedra perquè llisqui més bé.

Una vegada el fragment és ben transparent, cal rentar-lo amb força aigua de l'aixeta, primerament, i destil·lada, després. Ho deixarem assecat i ho muntarem a l'aire, o bé amb goma aràbiga i bàlsam, o, senzillament, amb bàlsam; cal buscar el medi de muntatge que doni més contrast a l'estructura a observar.

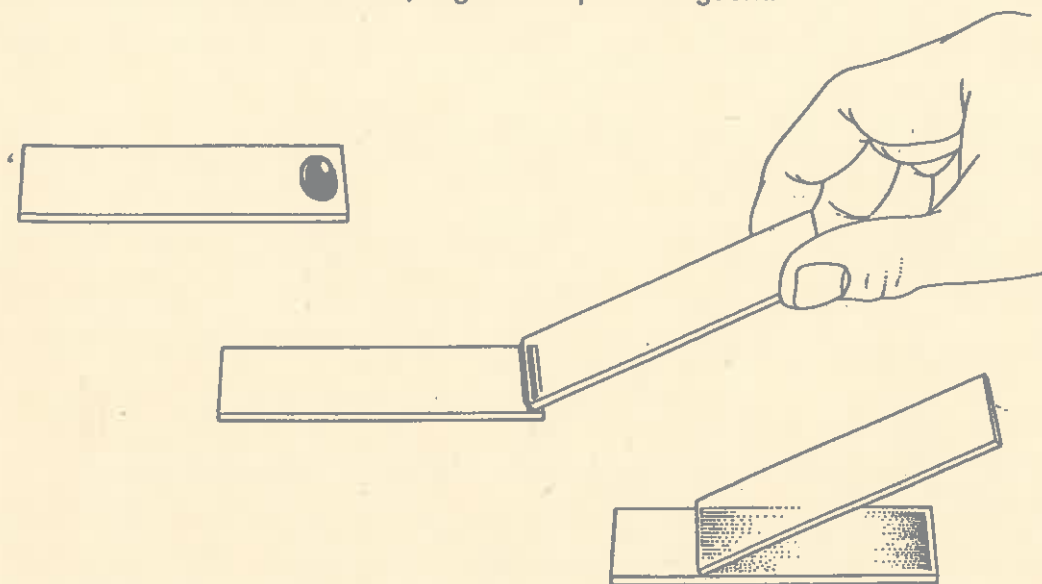
9. DURFORT, M.: «Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats: aplicacions». Seminaris d'Estudis Universitaris, núm. 1, Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona, 1975.

10. El negre de clorazol es prepara amb alcohol de 70° amb solució saturada, és a dir, uns 0,7 g de colorant per 100 cc d'alcohol de 70°, segons Carayon (1969).

Advertiment: Cal assenyalar que algunes cases comercials disposen de micròtoms adients per tallar cossos durs, com és l'os, ja que la ganiveta té una aleació especial. El preu d'aquesta mena d'instruments és, generalment, força elevat. També podem obtenir talls fins processant l'os com si fos un mineral o una roca.

EXTENSIONS DE SANG

La preparació de sang es fa mitjançant extensions, és a dir, es posa una gota de sang a l'extrem d'un portaobjectes molt net i desgreixat i amb l'ajut d'un segon portaobjectes, a ser possible esmerilat, es fa l'extensió o *frottis*, segons l'esquema següent:



Una vegada assecada l'extensió a l'aire, seguirem els passos següents:

- 5 minuts de fixació amb metanol, o bé amb sublimat corrosiu (solució aquosa saturada de biclorur de mercuri).
- Decantarem el fixador i ho assecarem amb paper de filtre.
- Ho tenyirem durant 30 minuts amb GIEMSA diluït.¹¹
- Ho rentarem amb aigua destil·lada durant 10 minuts, fent-ne dos o tres canvis.
- Ho assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu, encara que recomanat, amb bàlsam del Canadà, o bé amb DPX.
- Observarem els diversos tipus cel·lulars, amb l'objectiu d'immersió, és a dir, de 1.000 a 2.000 augments.

Una altra possibilitat és fer una doble tinció amb HEMATOXILINA-EOSINA. La tècnica a seguir en aquest cas és:

- 5 minuts de fixació amb metanol, o bé amb sublimat corrosiu.
- Decantarem el fixador i ho assecarem amb paper de filtre.
- Ho tenyirem durant 15 minuts amb hematoxilina.¹²
- Ho rentarem durant 30 minuts amb aigua de l'aixeta.¹³
- Ho tenyirem durant 5 minuts amb eosina¹⁴ a l'1%.
- Ho rentarem diverses vegades, dues o tres, amb alcohol de 96°.
- Ho assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu amb bàlsam del Canadà o amb DPX.

11. El GIEMSA és una solució formada per tres colorants histològics: azur de metilè, blau de metilè i eosina. És preferible de comprar-lo ja preparat, i abans de fer-lo servir es dilueix: 10 gotes de GIEMSA amb 10 cc d'aigua destil·lada.

12. L'hematoxilina és un colorant típicament nuclear. Qualsevol classe d'hematoxilina serveix per tenyir els nuclis de les cèl·lules blanques de la sang.

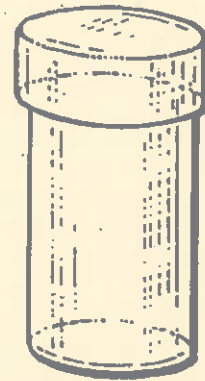
13. Normalment, després de tenyir amb hematoxilina, es renta amb aigua de l'aixeta, perquè les sals de l'aigua provoquen el viratge del colorant, que passa de vermell a tenir un color blavós.

14. L'eosina és un colorant eminentment citoplasmàtic.

Advertiment: La casa HARLECO té un equip de tinció, «DIFF-QUICK», molt interessant, ja que d'una manera molt ràpida i, sobretot, molt positiva tenyeix les extensions de sang, amb uns resultats semblants als obtinguts amb al tècnica de WRIGT-GIEMSA. Aquesta tècnica fou aconsellada per Witlin, el 1970.

Un cop preparats tres flascons de Borrel amb cada un dels tres productes de la casa HARLECO, és a dir, amb el fixador (solució A), amb el primer colorant (solució I o B) i amb el segon colorant (solució II o C), i assecada l'extensió de sang, se sotmet als passos següents:

- Submergirem cinc vegades el portaobjectes amb l'extensió dins del flascó que conté la solució A; cada vegada s'hi deixa durant un segon.
- El submergirem cinc vegades en el flascó que conté la solució B, durant 5 segons, amb immersions d'un segon.
- Deixarem escórrer l'excés de colorant sobre un full de paper de filtre i el posarem dins el recipient que conté la solució II durant 5 segons, deixant-l'hi 1 segon cada vegada.
- Escorrerem l'excés de colorant I.
- El rentarem durant 2 o 3 minuts amb aigua destil·lada.
- L'assecarem amb paper de filtre.
- Muntatge facultatiu, encara que recomanat, amb bàlsam del Canadà o equivalent, DPX, etc.



Flascó Borrel

Advertiment: Si hom vol l'extensió més tenyida, es deixa més temps dins les solucions I i II. Els temps seran considerablement més llargs si la sang a estudiar no és la humana; cal assajar el temps per a cada espècie. Els productes són molt tòxics: precaució!

Resultats:

eritròcits roses



neutròfils:

nucli blau marí
 citoplasma rosa clar
 granulacions vermelloses



eosinòfils:

nucli blau marí
 citoplasma blau cel
 granulacions vermelles



plaquetes violetes



basòfils:

nucli vermell
 granulacions vermell fosc, quasi negres



monòcits:

nucli violeta (lobulat)
 citoplasma blau cel



limfòcits:

nucli violeta
 citoplasma blau cel



Advertiment: Aquest mètode és també molt adient per tenyir les aposicions dels testicles o per a la visualització dels protozous del contingut rectal de nombroses espècies. Darrerament (1994), s'ha introduït a Barcelona la marca americana SURGIPATH que comercialitza un Papanicolau EA 50 de bona qualitat i d'un preu raonable.

B.2. PREPARACIONS D'ESTRUCTURES ANIMALS DE LES QUALS, PER A LLUR ESTUDI, CAL OBTENIR TALLS

Normalment, en histologia, cal obtenir talls de material que es vol estudiar i per això, és necessari fer una *inclusió*, sigui en parafina, en celoïdina o per congelació. Els talls més fins s'obtenen per la inclusió en parafina. La tècnica de la inclusió en celoïdina és molt llarga, mentre que la congelació permet d'obtenir amb molta rapidesa talls, encara que no gaire fins.

Tècnica a seguir per fer una inclusió en parafina

Després de la fixació de l'òrgan o teixit a estudiar amb qualsevol dels líquids fixadors més habituals (formol al 6 o 10%, CARNOY, BOUIN, ZENKER, etc.) de 12 a 24 hores, segons la grandària del material, de la classe de mostra, etc., el material s'ha de deshidratar:¹⁵

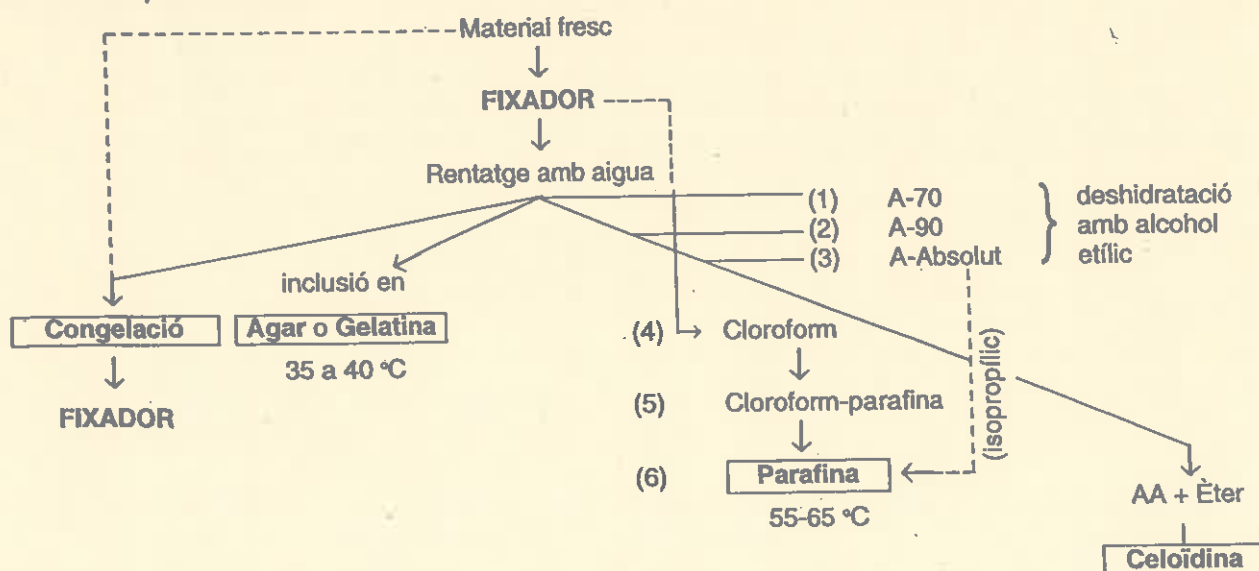
- De 6 a 12 hores amb alcohol de 70°.
- De 6 a 12 hores amb alcohol de 90°.
- De 6 a 12 hores amb alcohol absolut.
- De 4 a 6 hores amb cloroform o xilè.
- De 4 a 6 hores amb cloroform i parafina o amb xilè i parafina.
- De 4 a 6 hores amb parafina, a l'estufa, a uns 55-60 °C.

Advertiment: Podem considerar com a temps normal de fixació de 12 a 24 hores, però cal tenir en compte que, aquest temps depèn del fixador emprat i de la classe de material i de la seva grandària; com més petita sigui la mostra del material a fixar, més curt serà el temps de fixació i de les etapes següents.

El fixador quasi mai no és un bon medi de conservació, és a dir, que si després de la fixació de l'òrgan o del teixit no volem incloure'l tot seguit, el traurem del fixador i el posarem en alcohol de 70°, o bé en formol al 6%, on podem deixar-lo durant mesos.

Si el fixador utilitzat té sals fortes (ZENKER), o bé àcids (BOUIN), cal rentar molt bé el material abans de conservar-lo o abans de començar la deshidratació.

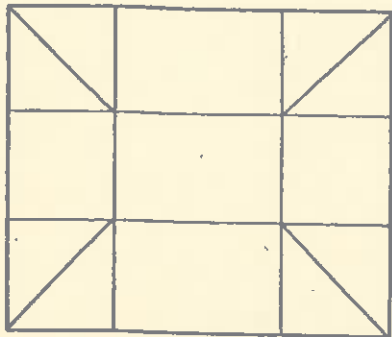
Si l'alcohol utilitzat durant la deshidratació ha estat l'isopropílic, enlloc de l'etílic, podem saltar-nos els passos d i e.



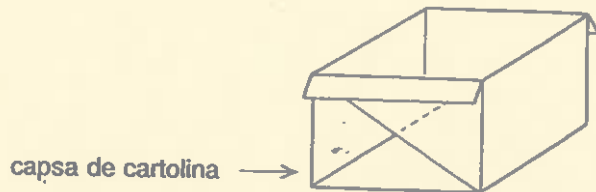
15. Si el material ha estat fixat amb alcohol absolut, o bé amb CARNOY, es pot anar directament al pas d. El temps de permanència en cada pas depèn de la grandària de la peça i de la textura del material.

Passos de les diverses vies a seguir, prèvia obtenció de talls d'òrgans i teixits animals.

Es fan els blocs de parafina amb l'ajut de les pinces de LEUCKART, o bé en caps de cartolina, i al cap de poques hores (encara que és millor de deixar-ho d'un dia per l'altre) es pot començar a tallar amb un micròtom adient, sigui de la classe MINOT, o bé de lliscada.

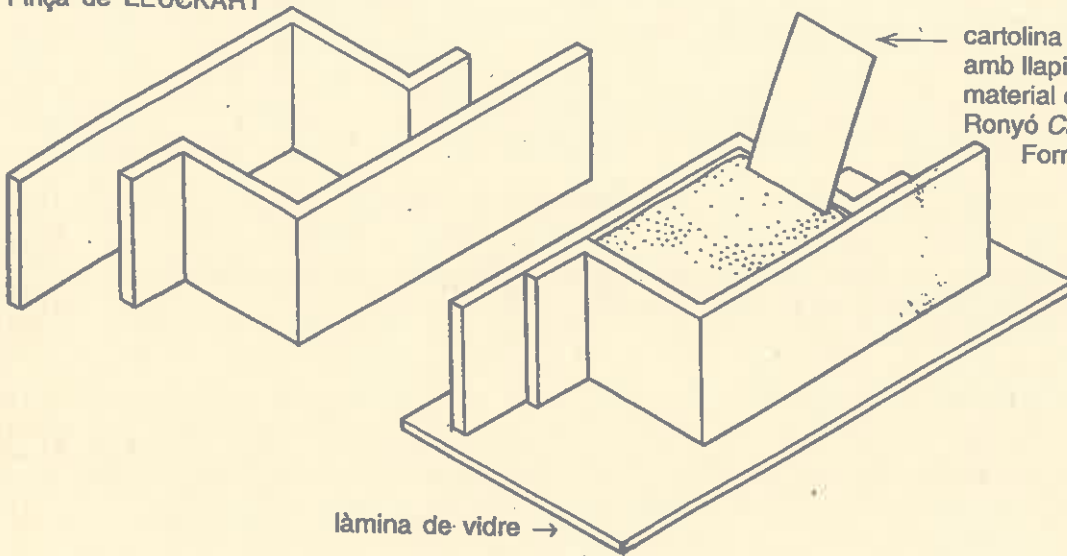


línies a doblegar,
seguint l'ordre indicat



capsa de cartolina →

Pinça de LEUCKART

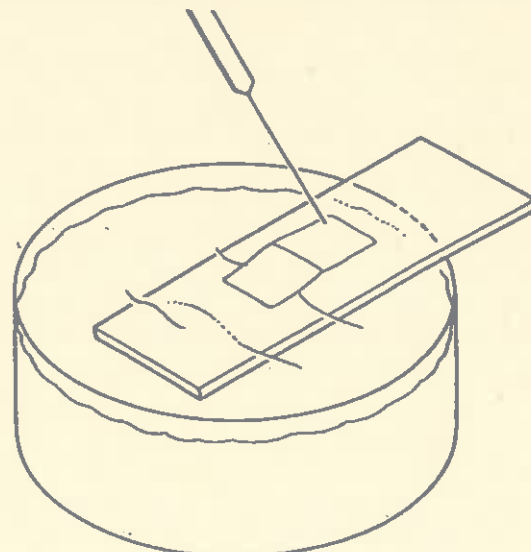
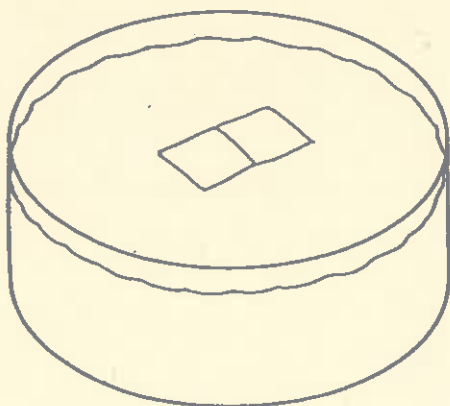


cartolina per a escriure
amb llapis la classe de
material que hem inclòs:
Ronyó *Cavia cobaya*
Formol 10%

làmina de vidre →

Els talls obtinguts tenen habitualment un gruix de 6 a 8 μ de mitjana.

Aquests talls es planxen, posant-los dins d'un cristal·litzador ple d'aigua de l'aixeta, escalfada a uns 35-40 °C; quan estan ben estesos es recullen amb un portaobjectes prèviament albuminat, és a dir, que damunt del portaobjectes ben net i desgreixat es posa una gota molt menuda d'albúmina de MAYER (glicerina i clara d'ou a parts iguals) i amb el dit s'estén d'un cap a l'altre.



També podem treballar amb un bany maria ple d'aigua en el qual s'ha dissolt un 5% de gelatina en pols.

Una vegada damunt el portaobjectes, se centren i s'eixuguen per les vores i es posen a l'estufa a uns 35 °C, durant un parell o tres d'hores; un cop trets de l'estufa, es deixen refredar i ja es pot passar a la tinció.

Advertiment: En alguns casos la inclusió en parafina no és convenient, com per exemple en l'estudi dels greixos, ja que en deshidratar eliminaríem, per dissolució, les gotetes lipídiques que hi poden haver dins les cèl·lules; en aquest cas, cal obtenir talls mitjançant el micròtom de congelació. Els talls obtinguts per la tècnica de la congelació són més gruixuts que els aconseguits amb la inclusió en parafina i, normalment, no s'enganxen al portaobjectes, i s'han de pescar amb una vareta de vidre i passar-los d'un reactiu a l'altre; això requereix molta pràctica per tal de no fer-los malbé. L'adhesió dels talls obtinguts per congelació es pot fer emprant portaobjectes gelatinitzats, els quals s'hauran aconseguit submergint-los un minut en una solució de gelatina al 0,2% en la qual s'ha afegit alum cròmic al 0,1% i unes gotes de timol (per evitar que hi creixin fongs) i deixant-los assecar de dues a quatre hores a 45 °C a l'estufa. Els talls recollits sobre portaobjectes preparats així es deixaran de dues a quatre hores a l'estufa. Abans de tenyir-los, caldrà hidratar-los, per la qual cosa els deixarem deu minuts en alcohol absolut, deu minuts en alcohol de 90°, deu minuts en alcohol de 70° i deu minuts en aigua destil·lada.

TINCIÓ DE TALLS ANIMALS OBTINGUTS PER INCLUSIÓ EN PARAFINA

Una vegada obtinguts els talls i enganxats mitjançant l'albumina de Mayer o la gelatina, cal tenyir-los però atès que els colorants són, generalment, solucions aquoses, cal treure, prèviament, la parafina dels talls, ja que no hi deixaria entrar el colorant, per la qual cosa els desparafinem i hidratem seguint un procés habitual, que és el següent:

- De 15 a 30 min. amb xilè (desparafinat).
- 15 min. amb alcohol absolut.
- 15 min. amb alcohol de 90°. (hidratació)
- 15 min. amb alcohol de 70°.
- 15 min. amb aigua destil·lada.

Treta la parafina i hidratat el tall, hom pot escollir la tècnica de la tinció que cregui més adient per a cada mena de material o per allò que hom pretén de veure; així cal saber si volem tincions panoràmiques de l'òrgan, i escollirem en aquest cas una doble tinció amb *hematoxilina-eosina*, per exemple, o un mètode tricròmic com pot ésser el *Mallory*. Ara bé, si cal cercar quelcom de molt concret, com poden ésser els cromosomes, triarem una tècnica més específica, com l'*hematoxilina fèrrica* de HEINDENHEIN.

Advertiment: Si el material ha estat inclòs en celoïdina, cal tenir en compte que aquesta no es dissol en res, i per tant, no caldrà deshidratar el material, prèvia tinció, ja que els talls són normalment recollits amb aigua destil·lada, i també els talls obtinguts per congelació.

Algunes tincions recomanades per aplicar sobre els talls

Creiem especialment recomanables per la informació que donen i per llur relativa rapidesa, les tincions que esmentarem a continuació. Considerem que els òrgans i teixits han estat inclosos en parafina.

Els temps indicats per als colorants són els més habituals, però caldrà calcular-los per a cada tipus de colorant, per a cada tipus de material, i segons el gruix dels talls, tenint en compte que els talls gruixuts necessiten menys temps de tinció que els talls més fins. Així mateix, el temps de tinció depèn també del període que fa que estigui preparat el colorant: alguns colorants amb el temps perden llurs propietats tintorials, com és el cas de la picrofucsina, mentre que d'altres guanyen, com és el cas de la majoria de les hematoxilines.

Doble tinció amb Hematoxilina-Eosina

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls seguint la seqüència abans esmentada (pàg. 13).
3. 5 min. amb hematoxilina (de DELAFIELD, de FRIEDLANDER, etc.; colorant nuclear).
4. de 15 a 30 min. amb aigua de l'aixeta.

5. 2 min. amb aigua destil·lada.
6. 5 min. amb eosina aquosa a l'1% (colorant citoplasmàtic).
7. 5 min. amb alcohol de 96°.
8. 5 min. amb alcohol absolut.
9. 15 min. amb essència (creatosina, eucaliptus, terpineol).
10. 2 min. amb xilè.
11. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.

Resultats: Nuclis blau marí
 Citoplasma rosat
 Fibres musculars roses
 Fibres conjuntives blaves

Hematoxilina-Picrofucsina (triple tinció de van GIESON)

1. Desparafinarem amb xilè de 15 a 30 minuts.
2. Hidratarem els talls, fins a l'aigua destil·lada.
3. 2 min. amb hematoxilina de GROAT.
4. Els rentarem 15 min. amb aigua de l'aixeta, fent-ne dos o tres canvis.
5. 5 min. amb picrofucsina que, a la vegada que tenyeix, diferencia.
6. 5 min. amb alcohol absolut (dos canvis).
7. 15 min. amb qualsevol mena d'essència.
8. 2 min. amb xilè.
9. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

Resultats: Nuclis negres
 Citoplasma rosat
 Fibres elàstiques vermelles
 Fibres musculars marró clar

Mètode de MALLORY (Tècnica simplificada del mètode de l'AZAN).

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. 15 minuts amb sublimat corrosiu (biclorur de mercuri, en solució aquosa saturada). Actua de mordent.
4. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
5. 15 segons amb fucsina àcida a l'1%.
6. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
7. 60 segons amb àcid fosfomolibdic a l'1% (actua de mordent).
8. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
9. 75 segons amb líquid de MALLORY.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
11. Ho diferenciarem amb blau d'anilina S.A. alcohòlica (uns 10 segons).
12. 10 segons amb alcohol absolut.
13. 15 minuts amb essència.
14. 2 minuts amb xilè.
15. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o DPX.

Resultats: Nuclis i cromosomes vermells
 Granulacions citoplasmàtiques taronges vermelloses
 Fibres col·làgenes blaves
 Fibres musculars vermelloses
 Eritròcits taronges
 Fibres nervioses liles
 Vitel·lus groc
 Quitina vermella

Mètode de l'AZAN, segons HEINDENHEIN

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. De 40 a 60 minuts amb azocarmí, a l'estufa a 56-60 °C.

4. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
5. Ho diferenciarem amb alcohol-anilina, al microscopi, fins que només es vegin els nuclis de color rosat.
6. 1 minut amb alcohol-acètic, per tal de frenar el procés de la diferenciació.
7. D'1 a 3 hores amb àcid fosfomolibdic al 5% (actua de mordent).
8. Ho rentarem amb aigua destil·lada (posar i treure).
9. Ho tenyirem d'1 a 3 hores amb blau d'anilina-orange G-àcid acètic.
10. Ho rentarem amb aigua destil·lada.
11. Ho diferenciarem amb alcohol de 96° uns dos o tres segons.
12. 2 min. amb alcohol absolut.
13. 15 min. amb essència.
14. 2 min. amb xilè.
15. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent (DPX).

Resultats: Nuclis i cromosomes vermells
 Granulacions citoplasmàtiques ... vermelles, grogues i blaves
 Fibres musculars de vermell a taronja
 Fibres col·làgenes blaves
 Mucus i cartílag blau marí

Advertiment: Les tècniques de tinció de MALLORY, o bé l'AZAN donen resultats molt positius amb talls de tràquea, d'intestí o de llengua.

TÈCNiques MOLT ESPECÍFIQUES

Hematoxilina fèrrica, segons HEINDENHEIN

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls, fins a l'aigua destil·lada.
3. De 12 a 24 hores amb sulfat fèrric amònic (alum de ferro) al 5% (actua de mordent).
4. Ho rentarem ràpidament amb aigua destil·lada.
5. Farem una tinció de 12 a 24 hores amb hematoxilina de HEINDENHEIN (sobretinció; es forma una laca amb el mordent).
6. Diferenciarem amb l'alum de ferro al 2,5%, sota el microscopi, fins que quedín tenyits només els nuclis, o es vegin els cromosomes, o bé les bandes de la fibra muscular estriada, o el centriol.
7. Ho rentarem durant 30 min. amb aigua de l'aixeta.
8. Ho rentarem 5 min. amb aigua destil·lada.
9. 5 min. amb alcohol de 70°.
10. 5 min. amb alcohol de 90°.
11. 5 min. amb alcohol absolut.
12. 15 min. amb essència.
13. 2 min. amb xilè.
14. Ho muntarem amb una gota de bàlsam del Canadà o equivalent.

Advertiment: Aquesta tinció és molt interessant, car dóna imatges molt clares del nucli i dels nuclèols de les cèl·lules en repòs, i també imatges dels cromosomes de les cèl·lules que estan en divisió; a la vegada, tenyeix el centriol i les bandes de la fibra muscular estriada, per la qual cosa, si volem estudiar quelcom d'aquestes estructures, les tenyirem amb aquesta tècnica.

Hem observat que la tinció de gònades i de meristemes radicals (materials rics en figures de divisió cel·lular) amb la tècnica de van GIESON, és a dir, amb la triple tinció hematoxilina de GROAT i de picrofucsina, dóna uns resultats molt positius i té l'avantatge que el procés és molt més curt. En el cas d'aplicar l'hematoxilina de GROAT per a la tinció de cromosomes de meristemes radicals, cal augmentar el temps de tinció considerablement, ja que les parets cel·lulòsiques retarden l'entrada del colorant, i, per tant, un temps d'uns 15 minuts és el recomanat, encara que, com sempre, cal cercar el temps més adient per a cada classe de material.

Tècnica del PAS (àcid per-iòdic de SCHIFF)

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.

3. 10 min. amb àcid per-iòdic (que provoca una oxidació dels components hidrocarbonats del talls).
4. Ho rentarem durant 10 min. amb aigua de l'aixeta.
5. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
6. 10 min. amb el reactiu de SCHIFF; cal fer l'operació en un recipient de vidre ben tancat.
7. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
8. Farem una tinció facultativa amb blau de toluïdina al 0,5% durant 2 min., o bé amb verd de metilè a l'1% durant 15 minuts.
9. Ho rentarem amb aigua destil·lada durant 5 minuts.
10. Ho deshidratarem.
11. 15 min. amb essència:
12. 2 min. amb xilè.
13. Ho muntarem amb bàlsam del Canadà o similar.

Resultats: Els materials que tenen mucopolisacàrids o glicoproteïnes queden tenyits de color rosa vermellós i destaquen de la resta que queda sense tenyir, o bé tenyit de color blau verd, segons si hem escollit l'una o l'altra tècnica de tinció facultativa de contrast.

Es recomana d'emprar aquesta tècnica amb talls de tràquea, d'intestí, i de pàncrees, principalment.

Tècnica de FEULGEN I ROSSENBECK

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. Farem una hidròlisi a 60 °C amb una solució 1N d'àcid clorhídric.
4. Ho rentarem amb aigua corrent i després amb aigua destil·lada.
5. Ho tenyirem durant 1 hora amb el reactiu de Schiff.
6. Farem tres rentatges ràpids amb aigua sulfurosa, d'un minut cadascun.
7. Ho rentarem llargament (uns 15 min.) amb aigua corrent.
8. Ho deshidratarem.
9. 15 min. amb essència.
10. 2 min. amb xilè.
11. Ho muntarem amb bàlsam o amb DPX.

Resultats: El DNA es tenyeix de vermell intens.

Advertiment: El temps de la hidròlisi depèn del fixador emprat; així, si el fixador ha estat el líquid de BOUIN és de 2 minuts, si el fixador ha estat l'alcohol serà de 5 minuts, i si ha estat el formol serà de 15 minuts.

Tècnica de PAPPENHEIM-UNNA

1. Desparafinarem amb xilè.
2. Hidratarem els talls.
3. Ho tenyirem durant 5 min. amb el líquid de Pappenheim-Unna.
4. Ho rentarem directament amb alcohol absolut, de 10 a 30 segons, fins que el nucli quedi verd.
5. 5 min. amb essència.
6. 2 min. amb xilè.
7. Ho muntarem amb bàlsam o amb DPX.

Resultats: La cromatina queda verda, el nuclèol i l'ergastoplasma queden vermells. És ideal per diferenciar el DNA del RNA.

Impregnació en bloc, pel mètode de CAJAL, conegut amb el nom de «l'estufa».

Normalment, les tècniques de tinció i d'impregnació s'apliquen sobre el material una vegada aconseguits els talls, com més prims millor. Ara bé, a vegades pot fer-se el que s'anomena una tinció en bloc, que pot tenir finalitats molt diverses; en la majoria dels casos és interessant de fer-la després de la fixació de mostres molt menudes, com poden ésser petits invertebrats, ja que, en agafar color, es poden manipular més bé quan es fa tot el procés de la deshidratació i, finalment, quan es fa la inclusió.

La tècnica de CAJAL a l'estufa presenta tres variants que indicarem a continuació:

Primera variant

1. Deixarem fragments de tres a sis mil·límetres de material nerviós (encèfal o medul·la espinal) de 3 a 5 dies a l'estufa a 35 °C en nitrat de plata a l'1,5%, al qual afegirem un 20% d'alcohol.
2. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
3. 24 hores en un reductor de la plata, que pot ésser el format per:
2 g d'àcid pirogàl·lic o d'hidroquinona
de 5 a 10 cc de formol
100 cc d'aigua destil·lada
4. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
5. Deshidratarem per la sèrie alcohòlica.
6. Ho inclourem en parafina.
7. Obtindrem talls de 8 a 12 micròmetres.
8. Adherirem els talls planxats al portaobjectes albuminat.
9. Desparafinarem els talls amb xilè.
10. Ho muntarem directament amb una gota de bàlsam del Canadà o de DPX.

Segona variant

1. Fixarem el material nerviós durant unes 24 hores amb alcohol absolut.
2. Ho fragmentarem i ho posarem a l'estufa a 35 °C en una solució de nitrat de plata a l'1,5%, de 5 a 7 dies.
3. Farem un rentatge ràpid amb aigua destil·lada.
4. 24 hores en el reductor anteriorment esmentat.
5. Ho rentarem amb aigua destil·lada.
6. Els passos següents són iguals que els de la primera variant.

Tercera variant

1. Fixarem el material nerviós amb una barreja formada per:
50 cc d'alcohol absolut
de 5 a 10 gotes d'amoniac concentrat durant unes 24 hores
2. Els passos següents, és a dir, del 2 al 10, són idèntics als esmentats en la primera variant.

PREPARACIÓ DELS REACTIUS ESMENTATS

Líquids fisiològics més emprats

• Solució de Locke (ajustat per a mamífers)

Clorur sòdic	0,900 g
Clorur potàssic	0,042 g
Clorur càlcic	0,048 g
Bicarbonat sòdic	0,020 g
Glucosa	0,200 g
Aigua destil·lada	100.000 cc

• Solució de Ringer (ajustat per a amfibis)

Clorur sòdic	0,650 g
Clorur potàssic	0,014 g
Clorur càlcic	0,012 g
Bicarbonat sòdic	0,020 g
Fosfat monosòdic	0,001 g
Aigua destil·lada	100.000 cc

• Sèrum salí fisiològic

a) Per a invertebrats

Clorur sòdic	0,600 g
Aigua destil·lada	100.000 cc

- b) Per a amfibis
 Clorur sòdic 0,750 g
 Aigua destil·lada 100.000 cc
- c) Per a mamífers
 Clorur sòdic 0,900 g
 Aigua destil·lada 100.000 cc

Advertiment: L'aigua de mar és sempre un bon líquid fisiològic per als animals marins.

Fixadors

- **Alcohol etílic** (recomanat per fixar nuclis)

Es fa servir del 70 al 100%.

El temps de fixació depèn de la mida de la mostra, però no ha d'ésser gaire llarg, ja que endureix molt els teixits.

- **Alcohol metílic**

Es fa servir pur, és a dir, del 100%.

- **Bouin** (recomanat per fixar la majoria dels òrgans animals).

Solució aquosa saturada d'àcid pícric 75 cc

Formol concentrat 20 cc

Àcid acètic 5 cc

Després de fixar el material durant unes 24 hores, cal rentar-lo bé amb aigua corrent, abans de començar la deshidratació, prèvia la inclusió.

- **Carnoy** (recomanat per a estudis de nuclis i cromosomes)

Alcohol absolut 60cc

Cloroform 30 cc

Àcid acètic 10 cc

Després de fixar el material amb CARNOY es pot passar directament al cloroform i tot seguit al cloroform-parafina i parafina, per fer la inclusió.

Es millor fixador que l'alcohol etílic tot sol.

- **Formol** (= Formaldèhid)

Possiblement, el FORMOL és el fixador que s'apropa més a l'«universal», ja que va bé per a quasi totes les estructures.

Es prepara al 6 o 10% amb aigua destil·lada, a partir del concentrat que es ven al comerç que és del 40%.

Si es deixa més de 24 hores amb formol, el material s'endureix massa, per la qual cosa cal iniciar ràpidament el procés de la deshidratació, o bé el material amb un formol més diluït, al 4%, o bé amb alcohol de 70°. Si bé cal tenir present que a la llarga (3-5 mesos) és descalcificador.

- **Sublimat corrosiu** (recomanat per fixar extensions de sang)

Solució aquosa saturada de biclorur de mercuri.

- **Tetròxid d'osmi** (per a estudis de mitocondries, plasts, greixos)

S'utilitza a l'1 o 2% amb aigua destil·lada, sol o bé combinat amb altres reactius, i formant diverses classes de líquids fixadors, com pot ésser el líquid de CHAMPY, format per:

Solució aquosa d'àcid cròmic a l'1% 7 cc

Solució aquosa de bicromat potàssic al 3% 7 cc

Solució aquosa de tetròxid d'osmi al 2% 4 cc

Advertiment: El tetròxid d'osmi és molt volàtil, i els seus vapors irriren molt les mucoses. Aquest caràcter volàtil és el que fa que els seus vapors es puguin emprar com a fixadors.

Aquest fixador, convenientment taponat, és l'habitualment utilitzat per al material a estudiar al microscopi electrònic.

- **Zenker** (recomanat per quan cal aplicar tincions tipus MALLORY o AZAN, atès el seu caràcter de mordent)

Bicromat potàssic.....	2,5 g
Biclorur de mercuri.....	5,0 g
Sulfat sòdic.....	1,0 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

Hi ha diversos fixadors que, a la vegada, són potents descalcificadors per preparar-se combinats amb segrestadors de sals, tipus EDTA. Entre altres, recordem DESCALCIFIER I que fa les dues funcions simultànies, i DESCALCIFIER II que serveix per descalcificar mostres que ja han estat prèviament fixades. Qui els comercialitza és la casa SURGIPATH que, a Barcelona, és representada per la CASA ÀLVAREZ

Colorants

- **Azocarmí** (utilitzat en la tècnica de l'ANZAN)

Azocarmí G.....	0,1 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

El farem bullir durant uns minuts.

El deixarem refredar.

El filtrarem.

Hi afegirem 1 cc d'àcid acètic per cada 100 cc de solució colorant.

Advertiment: En fred, la solució té un aspecte de suspensió que es perd quan s'escalfa, abans de tenyir. És de conservació il·limitada.

- **Blau d'anilina-Orange G** (utilitzat en la tècnica de l'AZAN)

Blau d'anilina S.A.....	0,5 g
Orange G.....	2 g
Aigua destil·lada.....	100 cc
Àcid acètic.....	8 cc

El farem bullir durant uns minuts.

El deixarem refredar.

El filtrarem.

El diluïrem a la meitat amb aigua destil·lada.

És de conservació il·limitada.

- **Blau de metilè** (colorant nuclear per excel·lència)

Blau de metilè.....	0,5 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

Advertiment: Preparat al 0,1 per litre és colorant vital.

- **Blau de toluïdina**

Blau de toluïdina.....	0,5 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

Advertiment: És un colorant metacromàtic, és a dir, tenyeix d'un color diferent del seu determinades estructures. Per demostrar-ho, cal fer-lo servir amb un material que tingui molt de teixit conjuntiu, com poden ésser les submucoses de l'intestí, i hom pot veure com les cèl·lules encobertes presenten nombroses granulacions vermelloses. El blau de metilè també és metacromàtic.

- **Eosina o Eritrosina** (colorant típicament citoplasmàtic)

Eosina.....	1 g
Aigua destil·lada.....	100 cc

Una vegada obtinguda la dissolució, s'hi tira un parell de gotes d'àcid acètic. En el comerç, hi ha l'eosina aquosa i l'alcohòlica, i d'altres variants com poden ésser la groguenca, la blavosa, etc.

- **Hematoxilina** (colorant típicament nuclear)

Hi ha moltes modalitats i formes de preparar aquest colorant; entre les més emprades i esmentades en aquest seminari tenim:

- **Hematoxilina de Delafield**

Solució A:

Hematoxilina	4 g
Alcohol absolut	25 cc

Solució B:

Sulfat alumínic amònic (alum amoniacal)	40 g
Aigua destil·lada	400 cc

Barrejarem la solució A amb la B. Al cap de quatre o cinc dies la filtrarem i hi afegirem:

Glicerina	100 cc
Alcohol metílic	100 cc

Passats quatre o cinc dies la filtrarem i ja es podrà fer servir.

Conservació il·limitada.

Abans de fer-la servir, la diluirem a la meitat amb aigua destil·lada i la filtrarem cada vegada.

- **Hematoxilina de Friedlander**

Solució A:

Hematoxilina	2 g
Alcohol absolut	100 cc

Solució B:

Sulfat alumínic potàssic (alum potàssic)	2 g
Aigua destil·lada	100 cc
Glicerina	100 cc

Barrejarem la solució A amb la B.

La deixarem uns 14 dies en una botella, sense tapar perquè l'hematoxilina s'oxidi, és a dir, «maduri». Si es té pressa per fer-la servir, podem oxidar-la afegint-hi una petita quantitat de iodat potàssic, per exemple, en una proporció d'uns 0,2 g per cada gram d'hematoxilina. Com més madura sigui l'hematoxilina, millor. Abans de fer-la servir, cal diluir-la a la meitat amb aigua destil·lada.

- **Hematoxilina de Heindenhein** (hematoxilina fèrrica)

Solució mare:

Hematoxilina	1 g
Alcohol absolut	10 cc
Aigua destil·lada	90 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant un mes. Abans de fer-la servir, cal diluir-la a la meitat.

- **Hematoxilina de Groat**

Solució A:

Àcid sulfúric concentrat	0,8 cc
Sulfat fèrric amònic (alum fèrric)	1,0 g
Aigua destil·lada	50 cc

Solució B:

Hematoxilina	0,5 g
Alcohol de 96°	50 cc

Barrejarem la solució A amb la B. Passades una o dues hores, ho filtrarem i ja es podrà fer servir.

Conservació limitada a uns tres mesos, per la qual cosa és millor preparar-ne poc i sovint.

- **Hematoxilina de Regaud**

Solució madura d'hematoxilina	10 cc
Glicerina	10 cc
Aigua destil·lada	80 cc

La solució madura d'hematoxilina es prepara:

Hematoxilina	1 g
Alcohol de 96°	10 cc

Aquesta solució mare ha de madurar durant uns tres mesos, o bé cal provocar l'oxidació afegint-hi iodat potàssic, 0,2 g per cada 2 g d'hematoxilina, encara que la maduració espontània és més adient.

• **Líquid de Mallory**

Blau d'anilina S.A.	0,5 g
Orange G	2,0 g
Àcid oxàlic	2,0 g
Aigua destil·lada	100 cc

Conservació il·limitada. Cal filtrar-lo de tant en tant.

• **Lugol**

Iode	1 g
Iode potàssic	2 g
Aigua destil·lada	100 cc

• **Picrofucsina, segons Van Gieson**

Fucsina àcida a l'1% amb aigua destil·lada	10 cc
Àcid pícric en solució aquosa saturada	100 cc

Es conserva de 8 a 10 mesos. És millor preparar-ne poc i sovint.

• **Reactiu de Schiff (preparat segons el mètode de Lillie)**

Fucsina bàsica	1,0 g
Metabisulfit sòdic	1,9 g
Àcid clorhídric 0,15N	100 cc

Es deixa dissoldre i s'agita de tant en tant. El líquid, primer vermell, va perdent color i al cap de 24 hores s'hi afegeixen 0,5 g de carbó activat, perquè la descoloració sigui total. S'agita, es deixa reposar i es filtra.

Cal conservar-lo a la nevera, en una botella ben tancada, si és possible amb el tap esmerilat. La seva conservació es pot anar comprovant olorant-lo abans de fer-lo servir: ha de fer una olor forta de sofre, i si no té aquesta olor peculiar cal afegir-hi una gota d'àcid clorhídric concentrat i alguns decigramms de metabisulfit.

La preparació del reactiu de Schiff és força delicada i, òbviament, la qualitat dels components és fonamental. Diverses cases comercials el venen preparat i amb tota garantia.

• **Sudan (específic per teyir greixos)**

Solució saturada amb alcohol de 70°.
 La qualitat depèn de la marca del colorant.
 Cal preparar-lo unes 24 hores abans de fer-lo servir.
 Sempre cal filtrar-lo abans de teyir.
 És millor preparar-ne poc i sovint.

• **Verd de metilè (recomanat per fer la tinció de contrast en la tècnica del PAS)**

Solució aquosa a l'1% de verd de metilè	25 cc
Alcohol de 96°	20 cc
Glicerina	25 cc
Fenol	0,5 g
Aigua destil·lada	100 cc

Conservació il·limitada.

• **Verd de metilè-pironina (mètode de Pappenheim-Unna)**

Solució aquosa a l'1% de verd de metilè	25 cc
Pironina	0,25 g
Fenol	0,50 g
Alcohol de 96°	2,50 cc
Glicerina	20 cc
Aigua destil·lada	85 cc

Es conserva uns tres mesos.

Algunes cases comercials fabriquen i venen ja el verd de metilè-pironina en pols: per preparar-lo, cal diluir-lo amb aigua destil·lada, a una dissolució de l'1%.

Es recomana per poder diferenciar la cromatina (verda) del nuclèol (vermell).

ESSÈNCIES

Cedre
Creosota
Eucaliptus
Menta
Terpineol, etc.

MEDIS DE MUNTATGE MÉS EMPRATS PER FER PREPARACIONS PERMANENTS

Hidrosolubles

Aquatex
Berlesse
Glicerina
Goma aràbiga
Hoyer
etc.¹⁷

No hidrosolubles

Bàlsam del Canadà
Reïna Dammar¹⁶
DPX
Euparal
Micromount

Muntatge amb

Goma aràbiga-bàlsam

Recordem que, en casos especials, és interessant muntar el material a estudiar a l'aire (en el cas de les escates de papallona, de les plomes, etc.). El medi de muntatge ha de tenir un índex de refracció (n) que sigui el més adient a la classe de material a observar, per obtenir-ne el contrast més gran possible en fer-ne l'observació microscòpica.

Berlesse

Hidrat de cloral 16 g
Goma aràbiga¹⁸ 15 g
Glucosa 10 g
Aigua destil·lada 20 cc
Àcid acètic 5 g

Líquid de Hoyer

Goma aràbiga 50 g
Hidrat de cloral 2 g
Aigua destil·lada 50 cc

Nòtula: Cal recordar que tots els medis de muntatge hidrosolubles són fàcilment contaminants per espores de fongs i per evitar que hi creixin, cal afegir-hi unes gotes de formol o uns cristallets de timol; alhora, cal tancar el flascó cada vegada que es treuen unes gotes del medi de muntatge.

Advertiment sobre el material de vidre: Els portaobjectes emprats en cadascun dels casos han d'ésser ben nets i desgreixats, per la qual cosa es rentaran amb alcohol de 90°.

En ocasions, els portaobjectes nous surten de la caixa molt bruts; en aquests casos, cal rentar-los amb detergent i, posteriorment, ben esbandits amb aigua i passats per alcohol de 90°.

Els portaobjectes emprats per fer preparacions temporals poden recuperar-se. Se'ls deixa en remull de 12 a 24 hores, en una mescla cròmica. Després d'esbandir-los amb molta aigua corrent, es passen per alcohol de 90°, i s'eixuguen.

La mescla cròmica és adient per netejar tot tipus de material de vidre que sigui força brut. La seva preparació és:

Dicromat potàssic 100 g
Aigua 1.000 cc
Àcid sulfúric 100 c

16. La reïna Dammar es compra en terrossos que cal dissoldre amb xilè, fins que tingui una consistència xaroposa. La dissolució pot fer-se a 40 °C i amb el flascó tapat per evitar l'evaporació del xilè.

17. Per a la preparació de diversos medis de muntatge hidrosolubles, consultau M. DURFORT: «Tècniques de transparentat d'invertebrats i d'esquelets de vertebrats: aplicacions». Seminari d'Estudis Universitaris, núm. 1. Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona, 1975.

18. És recomanable comprar la goma aràbiga en pols, molt millor que en «làgrimes» o terrossos.

BIBLIOGRAFIA

- BRIEN, P. (1958). Travaux pratiques de Zoologie. Masson. París.
- DURFORT, M. (1994). Consideracions entorn de l'ensenyament de la Biologia Cel·lular a les portes del segle XXI. Ciències Naturals. Publ. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- JAMES, L. (1904). Zoologie pratique basée sur la dissection des animaux les plus répandus. Masson. París. (Exhaurit.)
- ROWET, H.G.Q. (1975-1976). Guías de disección. I. Invertebrados; II. La rana; III. La rata, con notas del ratón; IV. El pez lija; V. El conejo. Colec. Guías Urania. Urania. Barcelona.
- TIXIER, A. GALLARD, J.M. (1969). Anatomie animale et dissection. Vigot Frères, París.
- VILLENEUVE, F., DESIRE (1976). Zoología. Muntaner y Simón. Barcelona.

Tècniques

- CARAYON, J. (1969). «Employ du noir chlorazol en anatomie microscopique des Insectes». *Annales de la Société entomologique de France*, T. 5, 179-193, París.
- COOK, H.C. (1976). Mucinas de los tejidos humanos. El Manual Moderno, México.
- DURFORT, M. (1975). «Tècniques senzilles d'obtenció de preparacions vegetals». *Seminaris d'Estudis Universitaris*, 3. Inst. Cat. Hist. Nat., Barcelona.
- FERRER, D. (1929). Manual de técnica histológica. Libr. Castells, Barcelona. (Exhaurit.)
- GURR, E. (1962). Staining animal tissue. L. Hill, London.
- LOCQUIN, M., LANGERON, M. (1985). Manual de Microscopia, Labor, Barcelona.
- MARTOJA, R. (1970). Técnicas de histología animal. Toray-Masson, Barcelona.
- NEZELOFF, C., GALLE, P., HINGLAIS, N. (1975). Técnicas microscópicas. Jims, Barcelona.
- PANTIN, C.F.A. (1968). Técnicas microscópicas para zoólogos. Academia, León.
- RAMÓN y CAJAL, S. Manual de histología normal y de técnica micrográfica. Libr. Nicolás Moya, Madrid (Diverses edicions) (Exhaurit.)
- ROMEIS, B. (1928). Técnica histológica. Labor, Barcelona. (Exhaurit.)
- SEGUY, E. (1951 i 1949). Le microscope, emploi et applications. Tomes I et II. Paul Lechevallier, París.

Interpretació

- BURKITT, H.G., YOUNG, B., HEATH, J.W. (1993). Histología funcional Wheater. Alhambra Longman, Madrid.
- CURRAN, R.C. (1967). Atlas d'Histologie. Masson, París.
- DI FIORE, M.S.H., MANCINI, R.E., DE ROBERTIS, E.D.R. (1971). Nuevo Atlas de Histología, Microscopía óptica, Histoquímica y Microscopía Electrónica. El Ateneo, Buenos Aires.
- FREEMAN, J.A., BRACEGIRDLE, B. (1971). An Atlas of Invertebrate Structure. Heineman Education Books, London.
- FREEMAN, J.A., BRACEGIRDLE, B. (1975). Atlas de Histología Animal. Paraninfo, Madrid.
- KÜHNEL, W. (1986). Atlas de Citología y Anatomía microscópica. Omega, Barcelona.

Vídeos

- DURFORT, M. (1989). La Fixació. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1989). La Microtomia. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1989). La Tinció. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1990). Introducció a l'estudi dels teixits animals. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- DURFORT, M. (1993). Mirar, Veure i Interpretar. I.C.E. Universitat de Barcelona.
- Nota:* La llibreria de la Universitat de Barcelona, al carrer Balmes, 21, distribueix aquests vídeos.
Teléfono: 318 42 66, ext. 2237.

Principals marques de reactius per a microscòpia

Chroma

Doesder

Fluka

Gürr¹⁹

Merck

Panreac (és la més econòmica, ja que és fabricada aquí)

Surgipath

Nòtula: En els darrers anys s'estan buscant alternatives als dissolvents clàssics, com ara el xilè i el toluè, cercant reactius que no siguin tan cancerígens i, alhora, biodegradables. En aquest sentit, recomanem substituir el xilè emprat, previ tractament de les mostres amb la parafina i previ muntatge amb els medis de muntatge no hidrosolubles, per Clearene (Surgipath) o equivalent.

19. Actualment, és molt difícil trobar, a Barcelona, productes d'aquesta marca.

