

NOTES SOBRE TÈCNICA HISTOLÒGICA

(3.^a NOTA)

per

LL. GUILERA

OBSERVACIONS SOBRE LA TÈCNICA DE LES GRASSES I LIPOIDES

La histologia moderna tendeix cada vegada més a investigar en el terreny de transit de lo morfològic a lo químic, i trobant massa grolleres, per a explicar-nos el perquè dels mecanismes funcionals, les concepcions d'anatomia cel·lular en ús fins ara, intenta procedir a l'estudi d'allò que d'una manera més directa retrata un estat metabòlic, veritable resultància, en un moment donat, de les forces químiques de l'espècie cel·lular. I d'entre totes aquestes qüestions de fina citologia, de química cel·lulariforme, per dir-ho així, una de les que revesteix una major importància, tant per allò que enclou en si, com per ésser tan fàcil relativament la seva demostració, és l'estudi de les grasses i lipoides.

En l'endocrinologia ofereix l'estudi dels lipoides un interès capitalíssim (suprarrenal, cos groc); resulten d'una alta significació biològica els aspectes i distribució de la grassa en el fetge; el coneixement de certes secrecions (llet, sebàcia) exigeix l'estudi del mecanisme de producció de les grasses, etc., etc., tot això són exemples del paper que juguen les grasses i lipoides en la histofisiologia.

Dins del camp de l'anatomia patològica no és menor la importància del tractat de les intoxicacions esteatògenes i de les degeneracions greixoses, i donat el paper cada vegada més important que assumeix la terapèutica pel *radium* i raigs X, resulta aquest estudi d'una valor grandíssima per a jutjar dels efectes produïts per aquests elements físics sobre els teixits irradiats (ovari en els fibromiomes, tractament del càncer pel ràdium).

Els nostres estudis sobre grasses han versat de dos anys ençà sobre el cos groc i suprarenal, sobre les degeneracions greixoses de les cèl·lules dels epiteliomes uterins, així com també sobre el mecanisme destructiu de les dites cèl·lules provocat pel ràdium. Diguem aquí de passada que de les nostres investigacions, encara poc nombroses, sobre el tractament dels carcinomes uterins pel ràdium, sembla que es desprengui que no és precisament la necrosi greixosa dels protoplasmes neoplàsics la utilitzada pel dit agent físic com a mitjà de destrucció.

Fins fa poc han estat escasses les preparacions de grassa i lipoides que, tot seguint les indicacions dels llibres de tècnica, havem pogut guardar i catalogar definitivament: les unes es quedaven esqueixades o disgregades d'altres replegades en un angle del *cupre*, els altres es destenyien i en totes resultava gairebé impossible evitar que hi quedessin bombolles d'aire.

Descontents d'aquests resultats deficients, havem anat perfeccionant la tècnica de les preparacions de grassa a mesura que els fracassos i imperfeccions ens obligaven a cercar-hi remei; avui, àdhuc exposant-nos a ésser titllats d'immodèstia, ens atrevim a dir que ja posem una tècnica completa, que dins de les possibilitats remeia, o més ben dit, evita, totes les causes del fracàs.

Ha presidit sempre la confecció d'aquesta tècnica, una idea directriu: la rapidesa. Hi ha indiscutiblement

altres procediments millors o pitjors amb els quals és possible obtenir bones preparacions de grassa, però tots són més llargs, més difícils i més cars que el nostre que anem a exposar en resum i mitjançant el qual hom pot obtenir en 24 hores acceptables preparacions histològiques en general i específicament de lipoides i grasses.

—

Coloració de la grassa i lipoides. — Es un fet conegut que les grasses humanes no toleren, sense dissoldre's, concentracions d'alcohol superiors a 85°. Aquest sol fet elimina totes les inclusions en les quals cal arribar a la deshidratació per l'alcohol absolut, havent hom de recórrer necessàriament a la congelació, mètode esplèndid, que, ben manejat, promet obtenir talls de 8 a 12 micres. Sigui'ns permès en aquest moment retre des d'aquí, en un petit incís, el nostre testimoni modest d'admiració i agraïment al Prof A. Gallego, de Santiago, que sabé ensenyar-nos una tècnica de congelació perfecta, les primícies de la qual va reservar a la SOCIETAT DE BIOLOGIA DE BARCELONA

Per poder utilitzar els mitjans ordinaris de congelació i sobretot de conservació al bàlsam, s'ha ocorregut tornar insolubles en els reactius ordinaris (alcohol, xilol, alcohol-èter) els materials greixosos, tot transformant-los en cossos que conservessin malgrat de tot una afinitat colorant específica (Sudan III, àcid òsmic). Ciaccio ha resolt aquest problema: la nostra experiència sobre el seu mètode és molt poca, però exigint la fixació un període de temps llarg, queda de moment descartat de tota tècnica en què, com en la nostra, hom cerqui la rapidesa. Apart d'això, les afinitats colorants de les grasses i lipoides perden sempre algun xic amb la manera de procedir d'aquest autor.

Ens cal, doncs, evitar l'acció dissolvent d'aquells reactius i per això recorrerem a la congelació. Fixarem en formol al 10 per 100 durant 24 hores en estufa a 37° o bé deixarem actuar el fixador sobre el preparat 2 ó 3 dies en fret. Tallem en congelació i col·loquem els talls obtinguts en sèrum, passant després al Sudan III en solució hidro-alcohòlica a saturació, on romanen 10 minuts. Per evitar tota arruga i fer desaparèixer els plecs, posem els talls a l'aigua, on s'estenen, degut a la diferència de tensió superficial entre l'aigua i els vehícals del sudan del qual estan embeguts. Passem després a l'hematoxilina Böhmer, és clar que variant el temps de permanència en aquest colorant, segons les afinitats del teixit; els rentem amb aigua; els virem, si volem una major rapidesa, amb el carbonat de litina, i si no hi ha sobrecoloració, sense diferenciar, recollim els talls per fixar-los en el porta i muntar-los després.

I aquí sorgeixen les dues qüestions que ens han donat més que fer en la pràctica: 1.^a Com cal fixar el tall en el porta per muntar el preparat? 2.^a Quina substància triarem per al muntatge?

El tall obtingut per congelació és excessivament disgregable per l'absència de matèria d'inclusió i per la mateixa causa, molt difícil d'enganxar damunt del porta.

L'albumina de Mayer és indiscutiblement un mitjà esplèndid, però la seva coagulació, en virtut de la qual és obtinguda la fixació del tall, exigeix escalfar fins a 75° i és, demés, abans d'ésser coagulada, molt soluble en l'aigua.

Aquestes dues condicions ens impedeixen fer ús de aquesta substància. Per una part en col·locar el tall sortint de l'aigua sobre la capa d'albumina estesa damunt del porta, aquesta es dissol i és inútil tot el que fem per fixar el tall, i per altra part, l'escalfament a 75° és suficient perquè els acúmul·s de grassa de la preparació es

difonguin per tota ella, tant més com cal exercir una certa pressió sobre el tall per obtenir la seva fixació en el porta. Per això fracassarem sempre en intentar aquest mètode.

Unicament en els casos en què la grassa sigui intracel·lular, en petites gotes i per tant difícilment difusible, serà possible emprar la mescla de Mayer, duent el tall a un alcohol de concentració baixa que no dissolgui la grassa ni l'albúmina, tot procurant sempre no sobrepassar els límits de l'escalfament. No obstant, el traspàs a l'alcohol i el temps de coagulació, tot contribueix a fer llarga i exposada una tècnica que és possible d'abreujar, simplificant-la.

Per això nosaltres fixem el tall per un procediment senzillíssim consistent en una dessecació suau. Ben estès el tall sobre el porta, assequem a distància de la flama el preparat, la humitat del qual haurem reduït al mínim per aspiració mitjançant un paper de filtre. La dessecació no arriba a alterar els elements histològics, puix és una simple evaporació grollera de l'aigua interposada entre el tall i el porta ço que pretenem.

Encara, quan és qüestió de grassa intracel·lular en petites gotes i no en grans acúmul, és possible emprar un mètode de fixació senzillíssim que ens dona molt bons resultats. Consisteix simplement a secar tot exercint pressió sobre el tall mitjançant un paper de filtre damunt el qual haurem passat l'ungla repetidament perquè es torni llustrós, evitant així que deixi pèls damunt del tall. Aquest procediment tan senzill no pot ésser aplicat en els casos d'acúmul de grassa extracel·lular, que en ésser comprimits pel paper de filtre, es dispersen pel preparat o són aspirats pel secant damunt del qual queden adherits en forma de petites gotes.

Tots dos procediments són aplicables segons els casos

amb resultats idèntics, tot permetent mullar i fins rentar suaument el tall sense que aquest es desprengui. Sols precedint la fixació del tall amb un d'aquests mitjans, únics que l'experiència ens demostra que podem adoptar en talls per congelació amb grassa sense que s'alteri en la cosa més petita la perfecció de les imatges histològiques, és possible arribar a fer un bon muntatge. Si un no fixa el preparat, durant les manipulacions del muntatge i sobretot en tractant-se de líquids de conservació densos, com la glicerina o gelatina-glicerina, és impossible evitar el despreniment del tall que és arrossegat pel corrent que es produeix en aplicar el *cubre*, tot quedant arrugat o romput o dispers.

Ara importa cercar un bon mitjà de conservació. La major part dels autors aconsellen per a les preparacions de grassa la glicerina, sense que, Bhöm i Opel entre ells, afegeixin certs detalls absolutament necessaris per treballar amb èxit. Efectivament: si intentem muntar directament el tall fixat i sec o mullat encara, col·locant al seu damunt una gota de glicerina, apareixerà el preparat sembrat segurament d'una multitud de petites bombolles d'aire que queden emprisonades dins la capa de glicerina, sense que sigui possible desallotjar-les, ni tampoc escalfant, donada la viscositat excessiva d'aquella substància.

Schmorl, en el seu «Untersuchungsmethoden», aconsella deixar el tall, abans de muntar-lo en glicerina pura, en una mescla de glicerina i aigua a parts iguals durant 15 minuts, procedint després a l'aspiració del líquid on es banya el tall mitjançant un paper secant. Hom posa després sobre el preparat embegut de la mescla aquosa una gota de glicerina pura, i procedeix aleshores al muntatge.

El procediment de Schmorl preparant la penetració de la glicerina i expulsió consegüent de l'aire, és evident-

ment lògic i dóna en efecte bons resultats, però complica i prolonga la tècnica amb un nou temps de duració massa llarga que cal evitar. Nosaltres havem aconseguit obtenir preparacions sense cap bambolla mitjançant el muntatge en una mescla de glicerina i aigua, en la qual l'aigua entra en una proporció molt petita.

Observem, en efecte, que l'addició d'una quantitat lleugeríssima d'aigua a la glicerina, li dóna agilitat o fluidesa suficient per a embeure ràpidament el tall expel·lint tot l'aire allotjat entre les malles del teixit, i així, partint d'una mescla de dues parts de glicerina per una d'aigua destil·lada, anàrem realitzant experiències fins a arribar a l'empleu de mescles de 8 parts de glicerina per dues d'aigua i fins d'una aigua per 10 de glicerina pura.

Ens podran objectar que l'aigua és un mitjà òptic i de conservació deficient, però es comprèn que empleada a tal dilució en una mescla amb un líquid, d'altra banda, tan refringent com la glicerina, els resultats no poden patir de defecte sensible. No podem garantir la durada de les preparacions muntades així, puix no ha transcorregut prou temps encara, però havem de dir que les que havem fet fins ara es conserven d'una manera immillorable i creiem honradament que la llur conservació no diferirà de les montades en glicerina pura, d'una durada poc menys que indefinida.

Coloració nuclear i de fons en les preparacions amb grassa i lipoides. — Essent la glicerina un dissolvent de les anilines, resulta inaplicable com a mitjà de conservació de les preparacions tenyides amb aquestes substàncies, ço que, com es comprèn, suposa un inconvenient gravíssim des del punt de vista de les coloracions combinades. Poca

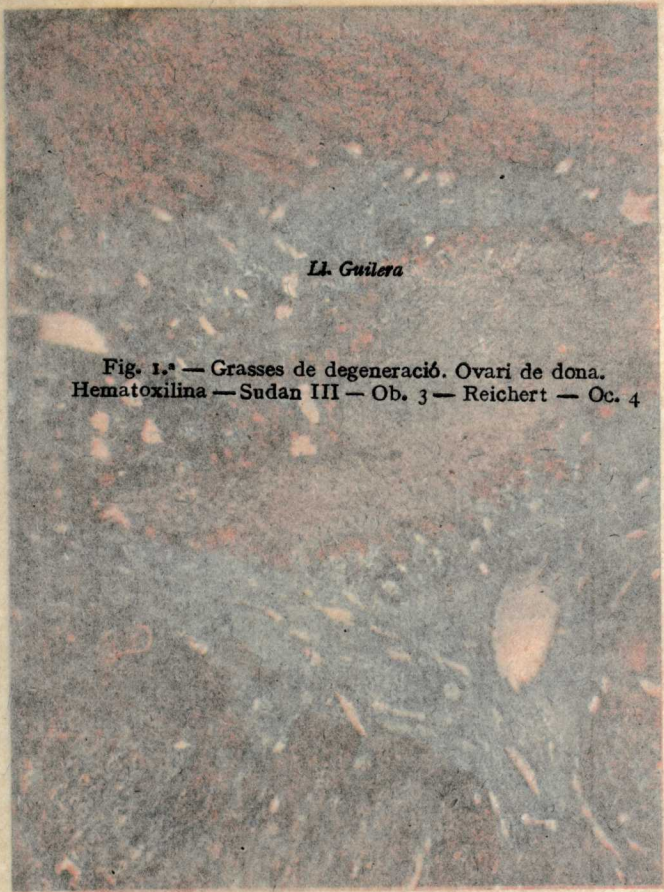
cosa ens importaria aquesta propietat de la glicerina si respectés tan sols els colorants de fons, tals com l'eosina, la fucsina i el picre-carmí d'indi, puix la coloració nuclear per les anilines pot ésser reemplaçada per l'hematxilina o el carmí, contra els quals no pot res la glicerina. Dissortadament cap d'aquells colorants de fons no resisteix a l'acció dissolvent de la dita substància; sols el Bismarckbraun (Vesubina) ens pot proporcionar una tinció nuclear a l'ensem que una coloració de fons deficient que resisteixi quelcom a aquella acció, però resulten sempre amb l'ús d'aquest colorant, preparacions de tons poc brillants i inadequats per a la microfotografia. Nosaltres assajàrem plens d'esperança el procediment Gallego i per dissort veiérem destenyir-se ràpidament les preparacions muntades en glicerina.

Ens quedem doncs, si utilitzem el muntatge amb aquesta substància, orfes de matèria colorant apta per obtenir una bona coloració de fons. Se'ns va ocórrer aleshores intentar el muntatge a la goma en solució aquosa, ja que en aquest medi era d'esperar que almenys l'eosina hauria de resistir, i en efecte, la coloració per l'eosina es manifesta intacta, però la decoloració dels nuclis, tenyits per l'hematxilina, esdevé molt aviat. Comprovàrem la reacció de la solució de goma per a veure si la decoloració era atribuïble al fet que fos àcida i ens poguérem convèncer que la seva reacció era absolutament neutra, per la qual cosa atribuïrem la decoloració a la hidratació excessiva del tall per l'aigua del medi de conservació.

Va fracassar, doncs, també aquest mitjà d'obtenir una coloració doble, almenys utilitzant l'hematxilina com a mitjà de tinció nuclear. Tal volta el carmí, que totera millor la hidratació, ens resoldrà el problema i potser encaminarem ara els nostres treballs en aquest sentit, encara que dubtem de bon principi de la bondat dels

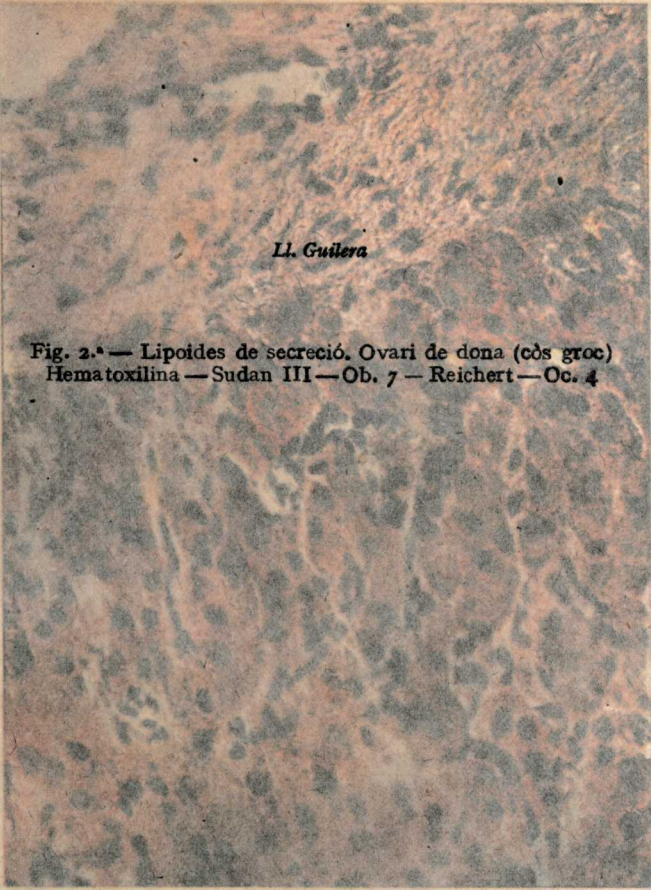
Ll. Guilera

Fig. 1.^a — Grasses de degeneració. Ovari de dona.
Hematoxilina — Sudan III — Ob. 3 — Reichert — Oc. 4



L. Guiler

Fig. 2.^a — Lipoides de secreció. Ovari de dona (còs groc)
Hematoxilina — Sudan III — Ob. 7 — Reichert — Oc. 4



resultats, ja que el carmí ofereix una tonalitat poc distinta de la del sudan i de l'eosina, i per altra banda, la conservació en goma sols permet la visió a petits augments com havem tingut ocasió de comprovar.

De totes maneres, en els casos en què calgui obtenir per a microfotografia una preparació amb coloració de grassa i fons a la vegada, simple que ompli el seu objecte vista a petit augment i no s'endarrereixi la obtenció de la microfotografia, aconsellem l'empleo de la coloració sudan-hematoxilina-eosina i el muntatge, ja que no conservació, en solució espessa de goma ben neta.

En tots els altres casos és preferible fer simplement una coloració amb hematoxilina i muntar en glicerina, ja que, no excedint-se en el temps de coloració, hom podrà obtenir una coloració blava intensa dels nuclis i una tinció pàl·lida blau gris de fons que resulta suficient per distingir els protoplasmes i matèries fonamentals i excel·lent com a to per fer ressaltar el sudan de color roig brillant o ataronjat, oferint el conjunt condicions esplèndides per a la microfotografia. Si és possible aconsellem no sobrepassar la intensitat necessària de coloració per l'hematoxilina, puix resulta més pur el to de fons. Si hi hagués sobrecoloració pot, no obstant, remeiar-se diferenciant lleugerament amb aigua acètica o clorhídrica obtenint després un bon virat. La durada de les preparacions muntades així, és, com ja havem dit, poc menys que indefinida.

Heus-aquí resumits en poques ratlles els nostres treballs sobre tècnica de les grasses, una de les més pesades de la histologia. Atenint-nos al procediment descrit han estat obtingudes les microfotografies que acompanyen aquesta comunicació.

Laboratoris de Ginecologia i Obstetrícia de la Facultat de Medicina de Barcelona.