

EXTENSIÓ O NOVES APLICACIONS DEL MÈTODE METAPOLICRÒMIC DE GALLEGO. TÈCNICA I OBSERVACIÓ

pel

P. JAUME PUJIULA, S. J.

1. Ja és sabut que el senyor A. Gallego, tot metamorfitzant pel formol acètic formacions tenyides per la fucsina bàsica de Ziehl, un poc modificada, i combinant degudament la seva tinció amb la d'una mescla de fucsina pícrica de van Giesson i de l'indi-carmí de Cajal, ha anat elucubrunt un mètode histològic de tinció metapolicròmica electiva, que aventatja sens dubte el tricròmic d'aquests autors. No és intenció nostra teixir aquí la història dels assaigs minuciosos, prolixos i conscienciosos que l'han dut a un resultat tan notable. Aquell que s'hi interessi els trobarà exposats en els Treballs d'aquesta SOCIETAT DE BIOLOGIA de Barcelona, any tercer (1915). Per a l'objecte que ara ens proposem, caldrà només posar aquí al davant el resum d'aquest mètode, tal com el posa l'autor al final de les seves disquisicions.

2. Mètode metapolicròmic segons Gallego:

1.^{er} Fixació en formol (1) al 10 per 100: 6-8 hores al menys. Estufa a 40°-45°.

(1) Adverteix el senyor Gallego que és possible una fixació més ràpida amb l'alcohol de 80° i formol al 10%, però que fa malbé els hematies.

- 2.^{on} Lavatge amb aigua: 10-30 minuts.
- 3.^{er} Talls per congelació.
- 4.^{art} Tinció amb la fucsina de Ziehl (1) diluïda: un minut.
- 5.^e Lavatge amb aigua.
- 6.^e Formol acètic (2): 5 minuts (3).
- 7.^e Lavatge amb aigua.
- 8.^e Tinció en la mescla de parts iguals de la solució de picro-indi-carmí de Cajal i la solució de picrofucsina de van Giesson: 5 minuts.
- 9.^e Lavatge ràpid amb aigua. Diferenciació per 2-5 minuts en aigua acètica (aigua destil·lada, 5 c. c.; àcid cristal·litzable, 1 gota).
- 10.^e Sèrie d'alcohols.
- 11.^e Xilol fenicat.
- 12.^e Muntatge en bàlsams.

El resultat és que els nuclis es tenyiran de violeta negre; el protoplasma, de verd clar o rosa groguenc; els feixos col·làgens, de blau pur intensíssim; el teixit muscular, de verd clar; els hematies, de verd; el teixit epitelial, de verd o vermell verdós; la substància fonamental del cartílag, la mucina i les granulacions de les cèl·lules cebades d'Ehrlich, de morat molt intens; la matèria amiloide, de verd blavós; les fibres d'elacina, de morat; els microbis de morat o morat vermellós.

(1) En aquesta fucsina, hi fa entrar l'àcid fènic al 20 % (això és, fucsina bàsica 1 gr., àcid fènic 2 gr., alcohol absolut 10 gr.; aigua destil·lada 100 c. c.); i per a la tinció de què ens ocupem, dilueix 1 c. c. d'aquesta fucsina en 20 c. c. d'aigua destil·lada.

(2) A 5 c. c. d'aigua destil·lada hem afegit una gota de formol i una altra d'àcid acètic. Aquest líquid té per objecte fer virar de vermell a violeta i fixar la color en els nuclis, propietat que ha descobert el mateix senyor Gallego, tal com esposa llargament en el volum citat en el text.

(3) Només en casos extraordinaris, quan la fixació és excessiva, convé la diferenciació prèvia amb solució alcohòlica de guaiacol al 10 %, durant $\frac{1}{2}$ — 1 minut.

3. Com veiem per aquest resum, hom fa els talls amb el micròtom de congelació; però els pot fer també en celoidina i en parafina, com diu el senyor Gallego en la seva primera comunicació (1). I això és la primera cosa que volem fer notar i confirmar; car nosaltres només havem assajat el mètode amb talls histològics en parafina, però amb uns resultats tan esplèndids que no creiem que hom en pugui obtenir de millors, ni amb talls en celoidina, ni amb els obtinguts pel micròtom de congelació. Els talls en parafina tenen demés l'aventatge immens que poden ésser d'una primor extrema. Si havem de jutjar per les fotografies policròmiques que acompanyen el treball del senyor Gallego, certament les nostres preparacions no els van a la saga. Com a exemple, podem descriure un tall transversal de llengua de rata (*Mus rattus*, v. *alba*), amb la tinció de Gallego. Allà apareix groga la capa còrnia de l'epiteli; morades vermelloses, les capes cel·lulars del mateix epiteli per raó dels nuclis principalment, i és la color tant més viva com més ben conservats aquells es troben; el conjuntiu (respectivament les seves fibres), blau; els múscles, groc-pàl·lids o groc-verdosos; els nuclis cel·lulars, de morat vermellós, i morat fosc les cèl·lules cepades; els hematies, grocs.

4. Un altre punt, damunt el qual convé cridar l'atenció, és el fixador. El fixador, segons Gallego, és el formol al 10 per 100, o també l'alcohol a 80° (2 hores), seguit del formol al 10 per 100 (1 hora). Nosaltres assajàrem el mètode de tinció en talls histològics de la pell de salamàndria (*Salamandra maculosa*), fixada en el líquid C de Boule (2) que consta d'alcohol de 95°, formol i àcid

(1) Volum citat, p. 125, nota.

(2) Vegeu la nostra «Citologia. Parte práctica, técnica y observación» n.º 30, 13.º

acètic glacial en la proporció de 100, 25 i 5 c. c. respectivament. El resultat fou satisfactori, com ja era de preveure, donat que la mescla Boule C consta, en el fons, dels mateixos líquids que, almenys successivament, són aplicats en el mètode del senyor Gallego.

Però no és tot això; car aplicarem així mateix el mètode a frotaments de la medul·la roja de vedella, fixats en un líquid, ben diferent dels anteriors, com és el sublimat corrosiu. L'èxit no pogué ésser millor del que fou. I, encara que no volem generalitzar per insuficiència d'assaigs, creiem, no obstant, que altres fixadors deurán servir igualment i ens inclinem a admetre que en la tinció pel mètode de Gallego té poca o cap influència el fixador: el resultat excel·lent de la tinció fóra degut gairebé exclusivament a la modificació química que experimenta la fucsina, fixada en els talls, per l'acció del formol, com opina el mateix Gallego. En el cas, tant de la salamàndria com dels frotaments, donem per descomptat que no hi pogué influir la calor, car la fixació fou sempre efectuada en fred. Però la prova decisiva de la influència petita o nul·la del fixador, ens la dóna el fet que en traçar una ratlla sobre paper, primer amb la dita fucsina i després amb formol acètic, observem un viratge a morat magenta.

5. Pel que havem dit hom pot veure que el mètode metapolicròmic de Gallego es fa extensiu a altres fixadors i la seva aplicació adquireix una major generalitat. Com que, per altra banda, és molt apte per a diferenciar electivament un bon nombre de formacions, no serà estrany que vagi guanyant predomini de dia en dia, sobretot en estudis histològics. Sobre d'aquest poder electivament diferenciador del mètode, volem donar a conèixer alguna dada que probablement ningú no ha observat abans que nosaltres, almenys, en tractar-se de material fixat en

sublimat corrosiu. Per de prompte, va atreure poderosament la nostra atenció, en els frotaments esmentats de medul·la roja de vedella, un sens nombre de cèl·lules amb granulacions blaves molt formoses (fig. 1 a, b). No cal gaire esforç per descobrir-hi les granulacions *oxífiles* (resp. *eosinòfiles*): la forma molt variada dels seus nuclis i la diferent tinció de la cromatina (basòfila) i la d'aquestes granulacions, són dades que exclouen tota altra hipòtesi. Tenim, doncs, que pel mètode metapolicròmic de Gallego, fixació en sublimat suposada, les granulacions oxífiles es tenyeixen de blau. Aquesta dada pot ésser d'interès o projectar alguna llum sobre la naturalesa o caràcter químic del teixit conjuntiu, ja que aquest, com és sabut, es colora també de blau pel mètode Gallego? Creiem que *si*; i si podem considerar les granulacions *oxífiles* com de caràcter *bàssic*, tota vegada que mostren una avidesa particular per colorants *àcids*, amb igual o anàloga raó podríem concloure la mateixa cosa respecte del conjuntiu, ja que ell també es tenyeix aquí amb les granulacions esmentades. Dues coses iguals a una tercera segons algun respecte, ho han d'ésser forçosament entre elles també segons aquest mateix respecte. La petita causa d'error que podria ocórrer en el nostre raciocini, és que comparem preparacions, tractades per un fixador distint; però creiem que els fixadors no canvien aquí la naturalesa química de les formacions; demés que repetint l'assaig amb el mateix fixador, va resultar veritat la nostra creença. Preguntarà algú tal volta com sabem que les granulacions blaves són realment les oxífiles, i no, v. g., les basòfiles d'Ehrlich? Queda ja previnguda aquesta dificultat en les línies precedents. Per a major abundància, tinguem present que les cèl·lules cepades d'Ehrlich o amb granulacions basòfiles (metacròmiques), úniques amb les quals aquelles es podrien confondre, són relativament escasses en la

medul·la roja de vedella, de què tenim experiència per haver-les investigat amb el mètode *alcohol-tionina* de Maximow (1), mètode que en part havem ampliat. Pel mètode de Gallego no recordem haver vist sinó una sola d'aquestes cèl·lules (fig. 1 f); era bastant grossa però amb granulacions escasses; mentre que les cèl·lules o leucocits amb granulacions oxífils són innumbrables, podent-se distingir entre elles, almenys, dos tipus: Unes de grosses (fig. 1 a), i unes altres de petites (fig. 1 b). Demés, les mateixes granulacions són molt abundoses i estan ben conservades. Això últim és una dada important que no convé que ens passi desapercebuda. Les granulacions *basòfiles*, com remarca Maximow que les ha estudiades particularment en diversos animals, són sumament sensibles a l'aigua que les dissol: i per aquesta raó moltes desapareixeran necessàriament en el mètode de Gallego; ja que aquest exigeix el pas del material per diversos líquids aquosos.

Acabarem aquesta petita comunicació respecte del regne animal, tocant alguna que altra dada que observàrem, en aplicar el mètode de què parlem, a la medul·la roja; la qual cosa pot ésser que no manqui d'interès. En el frotament de la dita medul·la roja, fixat en sublimat, els nuclis (respectivament la cromatina) es tenyeixen exactament com en el mètode ordinari de Gallego, això és, morat-fosc o morat-vinós: els limfocits semblen boles compactes (fig. 1 c), donat que el petit limbe de protoplasma que ofereix el tall òptic, a penes es distingeix per la seva gairebé absoluta incolorabilitat; en altres elements la massa protoplàsmica es presenta com de costat (fig. 1 d):

(1) A. MAXIMOW: *Untersuchungen über Blut und Bindegewebe. IV. Über Blutmastzellen. Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 83. Bd. (1913).

potser sigui qüestió, en aquest cas, de mielocits joves que es convertiran més tard en granulocits, sense que en estadi tan prematur sigui fàcil predir, a quina categoria pertanyeran; o, millor tal volta, de normoblastos en vies d'enucleació (expulsió del nucli); ja que el seu aspecte evoca la imatge d'allò que pinta Mas y Magro en una comunicació recent sobre aquest particular (1). Però el que ens sorprengué en gran manera fou que se'ns tenyissin com la cromatina, certs elements o cèl·lules mesenquimatoses (conjuntives) embrionals (fig. 1 e). Quina raó hi pugui haver perquè el protoplasma mateix d'aquestes cèl·lules es colorí d'una manera anàlega al nucli, no ho podem desxifrar per ara. Tenim el projecte d'estudiar més de propòsit el mesenquisme de la medul·la roja; on encara queden probablement moltes coses per descobrir o aclarar.

6. APLICACIÓ DEL MATEIX MÈTODE AL REGNE VEGETAL. Entusiasmats amb els bons resultats que ens va donar el mètode metapolicròmic de Gallego en el regne animal, volguérem assajar-lo també en el regne vegetal, desitjant esbrinar, entre altres coses, si ens prestaria algun servei per a distingir les diverses substàncies que entren en la composició química de les membranes cel·lulars, ja que la membrana cel·lular entra en Histologia vegetal com un dels factors principals, per a la classificació de teixits.

L'assaig recaigué principalment en *Agave americana* i en una espècie d'*Alöe*. El material (fragments de la fulla) es va fixar o en formol al 10 per 100 (*Agave*) o en alcohol de 95° (*Agave* i *Alöe*): els talls foren practicats a mà amb

(1) MAS Y MAGRO (F.): *Nuevas investigaciones acerca del mecanismo íntimo de la enucleación de los normoblastos de los mamíferos*. Rev. Valenc., agosto 1917.

el ganivet; la tinció es va efectuar, seguint les prescripcions del mètode de què tractem. El resultat fou no sols satisfactori, sinó que ens va donar esperança que, estudiats millor els passos, i adaptant convenientment el mètode a la nova aplicació, podrà servir d'excel·lent medi microquímic per a revelar-nos estructures, tal vegada fins ara ignorades. Però, com que això requereix temps i molts estudis comparatius que no havem pogut fer, ens cenyirem aquí a donar compte brevíssimament dels primers assaigs.

Quant als colors o matisos que té de donar el mètode, per a justificar el seu nom *policròmic*, podem assegurar que en els talls transversals de la fulla de *Agave americana*, se'n distingeixen indiscutiblement, almenys, quatre. Efectivament; anant de fora a dins, es troba de moment la capa de cèl·lules epidèrmiques, d'unes parets externes, molt dobles ordinàriament, que ofereixen en la seva meitat exterior, constituïda per la cutícula i capes cuticulars, una coloració de groc pàl·lid (fig. 2, c); coloració que deu ésser deguda a l'àcid pícric (1): la regió interna de la mateixa paret presenta un vermell fort (fig. 2, c e), que es continua en les parets radials, revestint en la seva primera meitat els peduncles (respectivament làmines) cuticulars entrants (fig. 2, p. e), i essent l'única coloració en la resta de la dita paret radial (fig. 2, p. r). La mateixa coloració s'observa en la paret interna (fig. 2, p. i). Pot ésser que en les parets radials s'iniciï ja un matís vermell violeta, continuant-se o pronunciant-se més en les parets internes. El nucli d'aquestes cèl·lules epidèrmiques és en conjunt vermellós moradenc per raó de la cromatina (fig. 2, n). Però ço que més ens va atreure l'atenció i ço

(1) En l'aquarel·la que reproduïx la fig. 2 va sortir exagerada la color de la cutícula per haver-nos servit per a obtenir-la de l'àcid pícric.

que ens féu concebre esperances de descobrir per aquest mètode estructures especials, fou la coloració blava grisca que havien pres certes formacions, més o menys arrodonides, tancades dins de la cèl·lula i apilotades al voltant del nucli (fig. 2, e). Cada una d'aquestes formacions (les quals no estan pròpiament isolades, sinó unides i potser en gran part fusionades les unes amb les altres), presenta un o diversos espais clars, que causen impressió de vacuoles. Creiem senzillament que estem en presència d'*eleoplastos*, o sigui de diferenciacions protoplàsmiques a les quals s'atribueix la formació d'alguna substància oleaginosa: les vacuoles aparents foren en realitat petites esferes d'oli. Nosaltres a penes podem dubtar de la rectitud d'aquesta interpretació, donat que per altres procediments ens són coneguts els *eleoplastos* d'aquestes cèl·lules (1). Tindriem, doncs, en aquest cas, al costat del sudan III i de l'alcana, un altre reactiu colorant per a fer ressaltar aquestes formacions i tal vegada més electivament que els altres, encara que aquest tenyiria el mateix *eleoplast*, i aquells, el seu producte o substància oleaginosa: sobre la qual cosa sols assaigs ulteriors podran dir la darrera paraula.

Respecte de la tinció dels altres teixits, només direm que en el parenquimós les membranes cel·lulars es tenyeixen de vermell violeta; de vermell molt fort, encara que amb reflex moradenc, el fibrós que acompanya els vasos: el leptoma (regió dels vasos cribosos), una altra vegada de vermell violeta i el contingut cel·lular dels seus elements, un xic de blau; els vasos aquífers de vermell violeta bastant viu, semblant al vermell de la paret externa de les cèl·lules epidèrmiques.

(1) Vegeu la nostra *Citologia*. Parte práctica, p. 205, 1918.

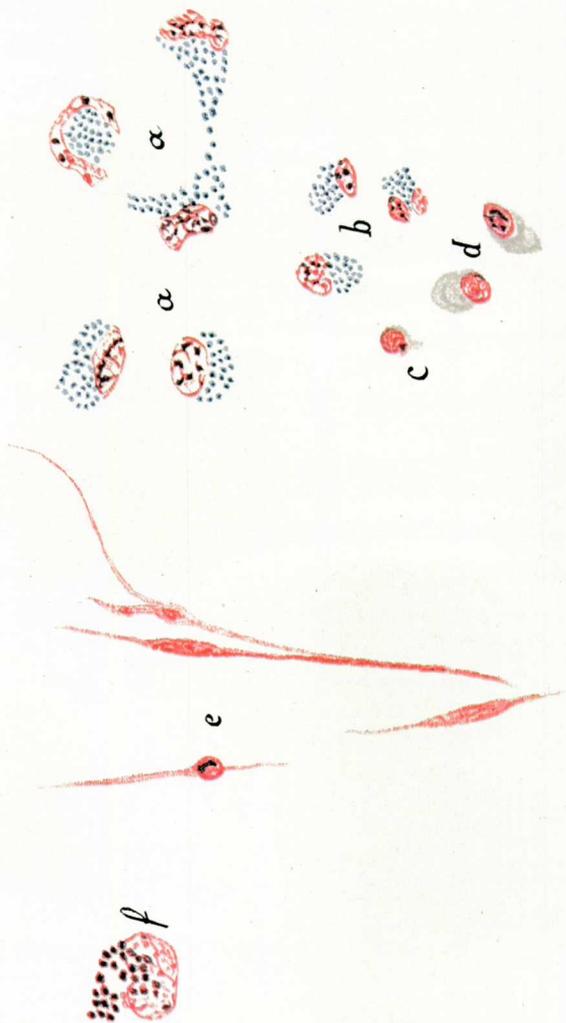


Fig. 1.ª — Cèl·lules de la medul·la roja de vedella, tenyida pel mètode metapoli-
cròmic de Gallego, modificat. — *a*, Leucocits eosinòfils: tipus gran. — *b*, Leucocits
eosinòfils: tipus petit. — *c*, Limfocits. — *d*, Limfocits amb massa protoplàsmica
lateral o normoblastos en estadi d'enucleació? — *e*, Cèl·lules connectives?
f, Leucocit cevat

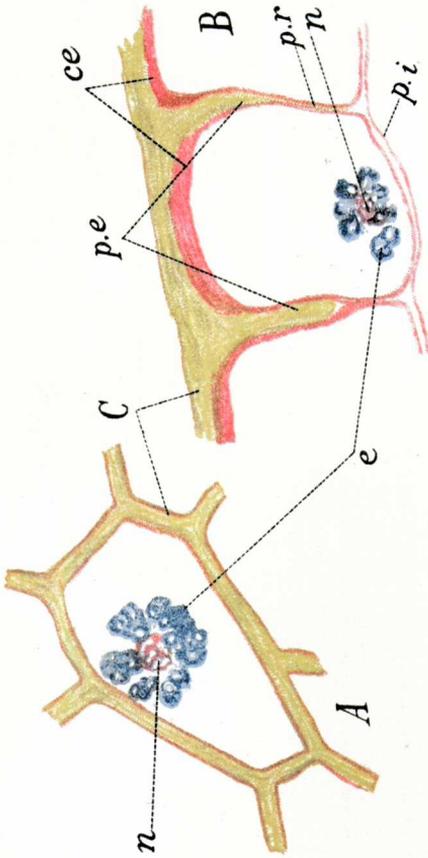


Fig. 2.^a — A, Cèl·lula epidèrmica de *Agave americana*, vista pel damunt o de pla. B, Cèl·lula epidèrmica de la mateixa planta, vista de perfil. — C, Cutícula amb capes cuticulars de la paret externa. (Tinguen present que la color groga va resultar exagerada com ja havem advertit abans.) — *c e*, Capes cel·lulòsiques de la mateixa paret. — *p e*, peduncles (làmines) cuticulars entrants. — *p r*, paret radial. — *p i*, paret interna. — *n*, nucli. — *e*, eleoplast.

Tota aquesta diversitat de matisos és més manifesta en el material fixat en alcohol que en el fixat en formol. Potser per això, el material del *Alöe*, fixat sols en formol, va resultar inferior al del *Agave*.

Laboratori Biològic de Sarrià. Col·legi Màxim de Sant Ignasi.