

## TÈCNiques HABITUALS DE COLORACIÓ PER A SECCIONS SEMIFINES DE MATERIAL INCLÒS EN GLICOL METACRILAT (G.M.A.)

S. Bonet i Marull, G. Huguet i Blanco

Departament de Biologia. Col·legi Universitari de Girona (Universitat Autònoma de Barcelona). 17071-Girona.

---

### RESUM

Es tracta d'una guia de les tècniques habitualment utilitzades en el nostre laboratori (hematoxilina-eritrosina, blau de toluïdina, P.A. Schiff, reacció nuclear de Feulgen, blau de metilè-fuxina bàsica, tricròmic de Masson, impregnació argèntica de Gomori, etcètera) per tenyir seccions semifines de peces grosses incloses en glicol metacrilat.

Les seccions, adherides al portaobjectes, són processades directament sense haver-les de desplastificar ni rehidratar. La hidrofília del polímer permet una bona penetració de les solucions aquoses.

### RESUMEN

Se trata de una guía de las técnicas habitualmente utilizadas en nuestro laboratorio (hematoxilina-eritrosina, azul de toluidina, P.A. Schiff, reacción nuclear de Feulgen, azul de metileno-fuxina básica, tricrómico de Masson, impregnación argéntica de Gomori, etc.) para teñir secciones semifinas de piezas incluidas en glicol metacrilato.

Las secciones, adheridas al portaobjetos, son procesadas directamente. Gracias a la hidrofília del polímero no será necesario desplastificar ni rehidratar los cortes; la buena penetración de las soluciones acuosas nos exime de estos dos procesos.

Finalizada la técnica bastará con dejar secar el corte y montarlo con el medio (hidrófilo o hidrófobo) habitualmente utilizado.

### ABSTRACT

This paper explains several techniques habitually used in our laboratory: Hematoxylin-erythrosin, Toluidine-blue, P.A. Schiff, Methylene blue-basic fuchsin, Gomori's method for reticulum, Masson's trichrome method, Fulgen's nuclear reaction... to stain semithin sections of materials embedded in glycol metacrylate (G.M.A.).

---

**Paraules clau:** glicol-metacrilat; tècnica histològica.

## INTRODUCCIÓ

El present article és continuació del publicat en aquesta revista farà dos anys (Bonet i Molinas, 1983) referent a la tècnica d'imbibició i inclusió de peces grosses en G.M.A. a fi d'obtenir talls semifins de gran àrea (1×2 cm).

La incorporació del glicol metacrilat en la pràctica habitual d'inclusió en un laboratori presenta, respecte a la utilització més general de la parafina, alguns avantatges derivats de la naturalesa hidròfila d'aquest plàstic. Respecte als mètodes de coloració més específics, la possibilitat d'embeure les peces directament de l'aigua i de polimeritzar el plàstic a 4 °C permet detectar els lípids i aplicar diverses tècniques cito-histoquímiques.

Per a la pràctica rutinària de les coloracions més habituals (hematoxilina-eritrosina, blau de toluídina, P.A.S., Feulgen, blau de metilè-fuxina bàsica, impregnacions argèntiques, tricròmics, etc.) el principal avantatge rau, una vegada més, en la hidrofília del G.M.A. Adherides les seccions al portaobjectes es procedeix directament amb la tècnica de coloració que es prefereixi; no caldrà desplastificar ni rehidratar els talls. Un cop acabada la coloració, i després d'un acurat rentat amb aigua destil·lada, s'assequen els talls damunt una placa calefactora i, seguidament, es munten en el medi emprat habitualment en el laboratori. La dèbil tonalitat en què pot quedar tenyit el plàstic en algunes coloracions, malgrat l'abundant rentat amb aigua destil·lada, no interferirà en l'observació. (Si en el procés d'inclusió no s'han respectat les proporcions 42:1 de les solucions infiltradora i promotora, o si en el moment de la polimerització no s'ha controlat la temperatura per sota dels 50 °C, l'afinitat del plàstic per algunes solucions colorants augmenta considerablement.)

Caldrà anar alerta quan la tècnica exigeixi la utilització de solucions alcohòliques. Abans d'aplicar un reactiu o colorant en solució alcohòlica deixarem assecar completament el tall damunt la placa calefactora. L'aplicació d'una solució alcohòlica superior als 70 °C damunt d'un tall humit altera irreversiblement l'estabilitat del polímer i fa que el tall s'estovi, s'arrugui i, en conseqüència, pugui arribar a desprendre's del portaobjectes.

Les tècniques que seguidament descriurem han estat aplicades en seccions semifines d'1 a 3 micròmetres i en material de *Cavia cobaya* i *Dina lineata* fixat en formol tamponat. Qualsevol variació en el gruix dels talls o en la naturalesa del material o del fixador pot fer oscil·lar els temps d'acció d'algun dels components de la tècnica.

TÈCNiques HABITUALS DE COLORACIÓ

**Hematoxilina de Harris-eritrosina**

*Reactius:*

1. Hematoxilina de Harris.
 

Hematoxilina .....	5 g
Alcohol absolut .....	50 cc
Sulfat alumínic-amònic .....	100 g
Aigua destil·lada .....	1000 cc
Òxid de mercuri .....	2,5 cc
Àcid acètic glacial .....	40 cc

Després de dissoldre l'hematoxilina en alcohol i el sulfat alumínic amònic en aigua, barregem ambdues solucions i ho fem bullir durant un minut. Tot seguit afegim l'òxid de mercuri, submergim el conjunt en un bany d'aigua ben freda i, quan la solució sigui fresca, afegim l'àcid acètic.
2. Aigua de Scott.
 

Sulfat de magnesi .....	10 g
Bicarbonat sòdic .....	2 g
Aigua destil·lada .....	1000 cc
3. Eritrosina 1 %
 

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

*Tècnica: (10 minuts)*

1. Tenyiu amb hematoxilina d'1 a 2 minuts.
2. Renteu ràpidament amb aigua destil·lada. Posar i treure.
3. Blavejeu els talls amb aigua de Scott (2 minuts).
4. Renteu amb aigua destil·lada. Posar i treure.
5. Tenyiu amb eritrosina de 2 a 5 minuts.
6. Renteu acuradament amb aigua destil·lada.
7. Assequeu en placa calefactorsa i munteu.

*Resultats:*

Nucli .....	Blau
Citoplasma .....	Rosat

*Observacions:*

Hom pot utilitzar el mètode regressiu: tenyiu durant 15 minuts amb l'hematoxilina i, posteriorment, diferencieu amb alcohol àcid (0,25 cc d'àcid clorhídric 1N en 100 cc d'aigua destil·lada).

No és recomanable la substitució de l'eritrosina per l'eosina.

**Feulgen - verd llum***Reactius:*

1. Àcid clorhídric 1N.
2. Reactiu de Schiff (Merck).
3. Aigua sulfurosa:
 

Aigua destil·lada .....	160 cc
Metabisulfit sòdic 2 % .....	50 cc
Àcid clorhídric 1N .....	10 cc

 (Aquesta solució ha d'ésser preparada just abans de fer-la servir.)
4. Verd llum 0,5 %
 

Verd llum .....	0,5 g
Aigua destil·lada .....	100 cc

*Tècnica: (60 minuts)*

1. Hidròlisi amb àcid clorhídric durant 30 minuts a 35 °C.
2. Renteu ràpidament amb aigua destil·lada. Posar i treure.
3. Tracteu amb reactiu de Schiff durant 15 minuts. (Eviteu la circulació d'aire.)
4. Diferenciació amb aigua sulfurosa: tres canvis de 30 segons.
5. Renteu ràpidament amb aigua destil·lada. Posar i treure.
6. Tinció facultativa amb verd llum durant 1 minut.
7. Renteu acuradament amb aigua destil·lada.
8. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

ADN .....	Vermell
Tinció de fons .....	Verd

*Observacions:*

El tractament amb el reactiu de Schiff és aconsellable que es faci en un flascó tancat per tal d'evitar la circulació de l'aire.

L'aigua sulfurosa s'ha de preparar just abans de fer-la servir.

**Blau d'alcià - P.A.S. - Hematoxilina de Croat - Orange G***Reactius:*

1. Blau d'alcià 1 % en solució aquosa.
2. Àcid periòdic 1 % en solució aquosa.

3. Reactiu de Schiff (Merck, 9033).

4. Hematoxilina de Groat.

Solució A: Àcid sulfúric concentrat .....	0,8 cc
Alum fèrric .....	1 g
Aigua destil·lada .....	50 cc
Solució B: Hematoxilina .....	0,5 g
Alcohol etílic 95° .....	50 cc

Barregeu ambdues solucions, deixeu-ho reposar durant una hora i filtreu.

5. Orange G 1 %

Orange G .....	1 g
Alcohol etílic absolut .....	100 cc

*Tècnica: (120 minuts)*

1. Tenyiu amb blau d'alcià durant 45 minuts.
2. Renteu ràpidament amb aigua destil·lada.
3. Oxideu amb àcid periòdic durant 20 minuts.
4. Renteu amb aigua corrent durant 10 minuts.
5. Tracteu amb reactiu de Schiff durant 15 minuts.
6. Renteu amb aigua destil·lada. Posar i treure.
7. Tenyiu amb hematoxilina durant 5 minuts.
8. Feu-la virar amb un rentat d'aigua corrent durant 5 minuts.
9. Renteu amb aigua destil·lada. Posar i treure.
10. Deixeu assecar completament els talls damunt la placa calefactora.
11. Tenyiu amb Orange G de 5 a 7 minuts.
12. Renteu amb alcohol etílic absolut.
13. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Mucopolisacàrids neutres, làmina basal i cutícula .....	Rosa
Mucopolisacàrids àcids .....	Blau
Nuclis .....	Negre
Musculatura, eritròcits i citoplasma .....	Groc-Taronja

*Observacions:*

Si el moc àcid no ha agafat una tonalitat blavosa, hom pot tractar els talls abans amb una solució d'àcid acètic al 3 %, o tractar-los amb una solució de blau d'alcià a l'1 % en àcid acètic al 3 %, o, posteriorment, intensificar el color blau tractant els talls amb una solució d'amoníac a l'1 % en alcohol absolut que convertirà el colorant amb blau monastral sòlid. (El tractament amb amoníac es farà després d'assecar els talls.)

L'hematoxilina de Groat sols es conserva uns tres mesos.

La coloració de fons amb la solució alcohòlica d'Orange G s'ha d'aplicar en talls completament secs; una solució alcohòlica aplicada a talls humits altera irreversiblement l'estabilitat del polímer.

### Blau de metilè - fuxina bàsica

#### Reactius:

##### 1. Solució colorant:

Blau metilè 0,13 % .....	12 cc
Fuxina bàsica 0,13 % .....	12 cc
Tampó fosfat pH 7,2-7,9 .....	21 cc
Etanol absolut .....	15 cc

##### 2. Tampó fosfat pH 7,2-7,9

Fosfat disòdic 11,876 % .....	9 cc
Fosfat monosòdic monohidratat 9,078 % .....	1 cc

#### Tècnica: (20 minuts)

1. Col·loqueu els talls en la solució colorant durant 5 minuts.
2. Renteu acuradament amb aigua destil·lada: dos canvis de 5 minuts cadascun seran suficients per eliminar la tonalitat vermellosa del plàstic.
3. Assequeu en placa calefactora i munteu.

#### Resultats:

Cromatina i ergastoplasma .....	Blau
Coloració de fons .....	Vermell

#### Observacions:

La solució colorant es manté durant cinc dies; per això recomanen preparar-la d'una a dues hores abans d'utilitzar-la. No és recomanable la substitució de la fuxina bàsica per la fuxina àcida; les solucions colorants bàsiques presenten una velocitat de difusió i una afinitat que contrasta amb la dificultat que hom pot trobar quan s'intenta tenyir amb alguna solució colorant àcido-neutre (cosina, fuxina àcida, etc.).

A voltes, i malgrat un acurat rentat amb aigua destil·lada, el plàstic reté una intensa tonalitat vermellosa molt difícil d'eliminar. Aquesta elevada afinitat es deu a dues causes no excloents: 1. No respectar les proporcions adequades de solució infiltradora i solució promotora (42:1, respectivament) en el moment de la inclusió o/i 2. No controlar la temperatura per sota dels 50 °C en el moment de la polimerització.

**Blau toluídina pH 4,4**

*Reactius:*

1. Blau de toluídina 0,05 %-pH 4,4
 

Blau de toluídina .....	0,05 g
Tampó acetat pH 4,4 .....	100 cc
2. Tampó acetat pH 4,4
 

Acetat sòdic 0,1N:	
acetat sòdic .....	13,6 g
aigua destil·lada .....	1000 cc
Àcid acètic 0,1N	
àcid acètic glacial .....	6 cc
aigua destil·lada .....	1000 cc

Barrejar 74 cc d'acetat sòdic 0,1N i 126 cc d'àcid acètic 0,1N

*Tècnica: (10 minuts)*

1. Tenyiu amb blau de toluídina durant 5 minuts.
2. Renteu amb tampó acetat durant 2 minuts.
3. Renteu ràpidament amb aigua destil·lada. Posar i treure.
4. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Nuclis, nucleols i ergastoplasma ..... Blau intens

*Observacions:*

Aquesta coloració no és metacromàtica.

**Coloració metacromàtica amb blau de toluídina**

*Reactius:*

- Blau de toluídina:
- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Tetraborat sòdic (Borax) ..... | 1 g    |
| Blau de toluídina .....        | 1 g    |
| Aigua destil·lada .....        | 100 cc |
- Filtrar.

*Tècnica: (15 minuts)*

1. Tenyiu amb blau de toluídina de 10 a 20 segons sota la flama evitant l'emissió de vapors.

2. Renteu ràpidament i acuradament amb aigua destil·lada. Diversos passos seran necessaris per retirar l'excés de colorant retingut pel plàstic. (10 a 15 minuts, o més.)
3. Assequeu a la placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Nuclis .....	Blau intens
Mucopolisacàrids àcids .....	Lila-vermellós
Coloració de fons .....	Blavosa

*Observacions:*

La conservació del colorant és limitada. (En flascó ben tancat per un màxim de tres mesos.)

**Impregnació argèntica de Gomori**

*Reactius:*

1. Permanganat potàssic a l'1 % en solució aquosa.
2. Metabisulfit potàssic al 2 % en solució aquosa.
3. Sulfat fèrric-amònic al 2 % en solució aquosa. (Prepareu-la just abans de fer-la servir.)
4. Plata amoniacal: A 10 cc d'una solució aquosa de nitrat de plata al 10 % s'afegeixen 2 cc d'una solució aquosa d'hidròxid sòdic al 10 %. El precipitat s'ha de redissoldre afegint amoníac gota a gota. Seguidament s'afegeixen unes gotes de la solució aquosa de nitrat de plata al 10 % fins que l'olor a amoníac desaparegui totalment. Aquesta solució es pot guardar a les fosques i s'ha de diluir a la meitat amb aigua destil·lada abans de fer-la servir.
5. Formol al 6 %.
6. Solució aquosa de tiosulfat sòdic (= hiposulfit sòdic) al 2 %.

*Tècnica: (30 minuts)*

1. Oxideu durant 2 minuts amb permanganat.
2. Renteu amb aigua corrent. Posar i treure.
3. Blanquejeu amb metabisulfit.
4. Renteu acuradament amb aigua corrent.
5. Tracteu amb alum fèrric durant 1 minut.
6. Renteu amb aigua corrent durant 5 minuts.
7. Renteu acuradament amb aigua destil·lada.
8. Impregneu amb plata amoniacal durant 1 minut.



9. Renteu amb aigua destil·lada.
10. Reduïu amb formol durant 3 minuts.
11. Renteu acuradament amb aigua corrent.
12. Fixeu amb hiposulfit de 30 a 60 segons.
13. Renteu amb aigua corrent. Posar i treure.
14. Renteu acuradament amb aigua destil·lada.
15. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Fibres reticulars .....	Negre
Fibres col·làgenes .....	Taronja
Nuclis .....	Gris

*Observacions:*

El pas núm. 9 ha d'ésser un rentat molt ràpid d'un màxim de 10 segons.

**Variante a la coloració tricròmica de Masson**

*Reactius:*

1. Hematoxilina de Harris (Vegeu hematoxilina de Harris-eritrosina).
2. Fuxina-Ponceau.
 

Fuxina àcida .....	0,1 g
Ponceau .....	0,2 g
Aigua destil·lada .....	300 cc
Àcid acètic glacial .....	0,6 cc
3. Verd llum.
 

Verd llum .....	0,5 g
Aigua destil·lada .....	100 cc

*Tècnica: (40 minuts)*

1. Tenyiu amb hematoxilina durant 2 minuts.
2. Renteu acuradament amb aigua corrent durant 5 minuts.
3. Tenyiu amb Fuxina-Ponceau de 10 a 15 minuts.
4. Renteu amb aigua destil·lada. Posar i treure.
5. Tenyiu amb verd llum durant 6 minuts.
6. Renteu amb aigua destil·lada.
7. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Nuclis i ergastoplasma .....	Blau
------------------------------	------

Musculatura .....	Vermell-verdós
Fibres col·làgenes .....	Verd

*Observacions:*

Hom pot substituir l'hematoxilina de Harris per l'hematoxilina de Groat. També es pot tenyir amb Orange G a l'u per cent en solució aquosa (sense afegir àcid fosfomòlfbdic o fosfotúngstic) durant uns minuts abans de la coloració amb verd llum.

**Coloració nuclear amb roig nuclear (Kernechtrot)***Reactius:*

Roig nuclear: roig nuclear .....	0,1 g
sulfat alumínic .....	5 g
aigua destil·lada .....	100 cc

escalfeu fins a bullir, deixeu refredar i filtreu.

*Tècnica: (10 minuts)*

1. Tenyi amb roig nuclear durant 3 a 5 minuts.
2. Renteu amb aigua destil·lada.
3. Assequeu en placa calefactora i munteu.

*Resultats:*

Nuclis .....	Vermell
--------------	---------

*Observacions:*

Hom pot fer una coloració de contrast amb verd llum, o combinant amb blau d'alcià i orange G.

**Bibliografia**

- BONET, S. i MOLINAS, M. (1983). Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Ann. Sec. Cièn. Col. Univ. Girona (UAB)*, 9:21-29.
- FEDER, N. i O'BRIEN, T.P. (1968). Plant microtechnique: some principles and new methods. *Amer J. Bot.* 55(1): 123-142.
- KING, R.A. (1983). *Plastic (GMA) Microtomy: A practical approach*. Olio-2.
- SIMS, B. (1974). Short technical note: a simple method of preparing 1-2 microm. sections of large tissue blocks using glycol methacrylate. *J. Microscopy*, 101: 223-231.