

NOTES

APLICACIÓN DEL MÉTODO DE INCLUSIÓN EN GLICOL METACRILATO AL ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LOS INVERTEBRADOS

S. BONET & M. MOLINAS

La utilización del glicol metacrilato (GMA) en histología se inicia en el laboratorio anatomopatológico con los trabajos de ASHLEY & FEDER (1966) y, especialmente, con las investigaciones de RUDELL (1967 a, 1967 b). Desde entonces el método empieza a ser conocido y varios autores, entre ellos FEDER & O'BRIEN (1968) en el campo de la histología vegetal, y SIMS (1974) y KING (1983) en el campo de la patología, introducen diversas mejoras que facilitan la inclusión de piezas duras, homogenizan la polimerización y hacen posible la adaptación de diversos métodos de coloración. Su interés es hoy ampliamente reconocido; varias casas comerciales venden sus componentes en forma de lotes o "Kits" listos para su aplicación y en muchos laboratorios se presenta como un método substitutorio de la parafina tanto en trabajos de docencia como de investigación.

Las dificultades que se plantearon en el estudio de los cortes en parafina de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774), hirudíneo erpobdélido, condujeron a este método de inclusión; método que adaptado a las particularidades del material zoológico (pequeño tamaño y gran variación en la consistencia de las estructuras en muchos invertebrados), permite obtener cortes de uno a tres micrómetros de grosor de piezas relativamente grandes (1×2 cm) y que, al facilitar el diagnóstico histológico, facilita el posterior estudio ultraestructural.

En esta nota se resumen las principales características de la adaptación del método de inclusión en GMA para su aplicación al material zoológico. La información complementaria puede obtenerse a partir de los trabajos de BONET & MOLINAS (1983), y BONET & HU-

GUET (1985).

La inclusión consiste en la polimerización de un monómero, el 2-hidroxietil metacrilato, en el interior de las piezas para la formación de un bloque de la dureza adecuada. Para ello se requieren otros cuatro componentes, el polimerizador, el acelerador, el regulador y el plastificante.

El monómero es un derivado del ácido metacrílico, el 2-hidroxietil metacrilato, conocido como glicol metacrilato, GMA o HEMA. El polimerizador es el peróxido de benzoílo, una molécula muy inestable que al generar radicales libres activa el proceso de polimerización. El plastificante es el polietileno glicol 400, también conocido como Carbowax, Poli G o Solbase; sus moléculas se adicionan al polímero deteniendo su crecimiento; cuanto más largas son las cadenas más duro será el bloque; la concentración del plastificante interviene directamente sobre la dureza final del bloque. Como acelerador de la reacción se emplea la N-N dimetilnilina; se trata de una amina que disminuye la energía de activación del proceso y, en consecuencia, favorece la formación de radicales, aún a bajas temperaturas (4°C). El regulador es el 2-butoxietanol, más conocido como butilcellosolve; se trata de un producto disolvente que facilita la infiltración del monómero en la muestra.

El procedimiento que a continuación se propone ha sido especialmente adaptado para la inclusión de pequeños invertebrados.

Tras la fijación en formol al 10% tamponado se lavan las piezas en el mismo tampón y se procede a una *deshidratación* gradual en serie alcohólica creciente hasta alcohol étilico

absoluto. La hidrofilia del monómero no hace obligatoria la deshidratación de las muestras, pudiendo ser evitada en casos de ejemplares muy delicados o si se desean practicar pruebas histoquímicas muy concretas. En los estudios rutinarios es aconsejable efectuar la deshidratación al menos hasta alcohol de 70°.

El siguiente paso será la infiltración del monómero en las piezas. Para ello se transfieren las muestras del alcohol a la solución infiltradora en la que dos cambios de 12 h a 4°C son suficientes.

Solución infiltradora: monómero (2-hidroxietil metacrilato), 80,0 mL; regulador ((butil cellosolve), 8,0 mL; polimerizador (peróxido de benzoilo), 0,5 g.

Terminada la infiltración las piezas se transfieren a una mezcla en proporción 42:1 de solución infiltradora y solución promotora recientemente preparada y colocada en el molde de silicona donde va a tener lugar la polimerización.

Solución promotora: plastificante (polietileno glicol 400), 8,0 mL; acelerador (N-N dimetilánilina), 1,0 mL.

El oxígeno del aire es capaz de captar radicales y entorpecer la correcta polimerización del monómero. Para evitar este efecto debe cubrirse la superficie libre del bloque con una fina película de parafina líquida.

La reacción de polimerización es fuertemente exotérmica y, en consecuencia, para que los bloques no sobrepasen los 20°C se llevan los moldes a la nevera (4°C). Al cabo de unas 4 horas podrá darse por terminada la polimerización.

Para la microtomía de bloques es necesario disponer de microtomos pesados como el Autocut de Reichert o el modelo 1512 de la casa Leitz, y de cuchillas duras de carburo de tungsteno. Las secciones se transfieren a un baño de agua a unos 20°C donde, al relajarse las tensiones, se estiran completamente. De allí son recogidas en un portaobjetos y llevadas a la estufa. Al evaporarse el agua quedan fuertemente adheridas sin necesidad de aplicar adhesivo alguno.

Sobre estos cortes pueden aplicarse un

gran número de coloraciones generales o histoquímicas, estandarizadas para las secciones de parafina pero que deben modificarse ligeramente con el fin de adaptarlas a los cortes de material incluido en GMA (BONET & HUGUET, 1985). La hidrofilia del polímero permite la utilización directa de los reactivos y colorantes sin previamente desplastificar ni rehidratar los cortes.

La incorporación del glicol metacrilato (GMA) como medio de inclusión ofrece ciertas ventajas respecto a la utilización de la parafina.

La hidrofilia del monómero y del polímero permite: 1. la imbibición de las piezas directamente después del lavado del fijador; 2. la coloración de los cortes sin necesidad de desplastificar ni rehidratar; y 3. el montaje de las secciones en medio hidrófobo después de secarlas completamente.

La baja temperatura a la que llegan los bloques en el momento de la polimerización (máxime unos 20°C si se mantienen en la nevera a 4°C) permitirá efectuar pruebas histoquímicas muy diversas.

La posibilidad de obtener cortes semifinos de gran superficie (1×2 cm) es de gran interés. El estudio de secciones de 0,5 a 3 micrómetros de piezas de tamaño similar a las utilizadas en la inclusión en parafina, facilita el diagnóstico cito-histológico y proporciona una mejor preparación para el posterior estudio ultraestructural.

ABSTRACT

The use of glycol methacrylate for histological manipulation of invertebrates.— Glycol methacrylate (GMA) can be used as an embedding medium in substitution of paraffin in routine laboratory techniques. The possibility to infiltrate and polymerize at room temperature results in better preservation of the tissue morphology. It is a simple method of preparing 0.5 to 3 micrometer sections of large tissue blocks. Many histological and histochemical staining procedures can be easily applied. The reagents are: Hydroxyl ethyl methacrylate, 2-butoxyethanol, N-N dimethyl aniline, benzoil peroxide and polyethilen glycol 400.

Key words: Histology, Glycol methacrylate, Invertebrates.

BIBLIOGRAFÍA

ASHLEY, C.A. & FEDER, N., 1966. Glycol methacrylate in histopathology. *Archs. Path.*, 81: 391-397.

BONET, S. & MOLINAS, M., 1983. Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a histologia. *Ann. Sec. Cien. Col. Univ. Girona (UAB)*, 9: 21-29.

BONET, S. & HUGUET, G., 1985. Tècniques habituals de coloració per a seccions semifines de material inclòs en glicol metacrilat (GMA). *Scientia gerundensis*, 10: 23-32.

FEDER, N. & O'BRIEN, T.P., 1968. Plant microtechniques: some principles and new methods. *Amer. J. Bot.*, 55: 123-142.

KING, R.A., 1983. *Plastic (GMA) microtomy: a practical approach*. Ed. Olio-2. Marietta.

RUDDELL, C.L. 1967a. Hydroxyethyl methacrylate combined with polyethylene glycol 400 and water: an embedding medium for routine 1-2 microsections. *Stain Technol.*, 42: 119-124.

– 1967 b. Embedding medium for 1-2 microsectioning, 2-hydroxyethyl methacrylate combined with 2-butoxyetanol. *Stain Technol.*, 42: 253-259.

SIMS, B., 1974. Short technical note: a simple method of preparing 1-2 microsections of large tissue blocks using glycol methacrylate. *Journal Microscopy.*, 101: 223-231.

Bonet, S. & Molinas, M., 1986. Aplicación del método de inclusión en glicol metacrilato al estudio histológico de los invertebrados. *Misc. Zool.*, 10: 371-373.

(Rebut: 1-X-85)

Sergi Bonet & Marisa Molinas. Dept. de Biologia Cel·lular i Fisiologia, Col·legi Universitari de Girona (UAB), Hospital 6, Girona, Espanya.

PRESENCIA DEL NEMERTINO DE AGUA DULCE *PROSTOMA EILHARDI* (MONTGOMERY, 1894) (HOPLONEMERTEA) EN LA PENÍNSULA IBÉRICA

J. GAMO

Desde que MARGALEF (1946) citó un nemertino de agua dulce en estanques y fuentes de Barcelona, no ha vuelto a aparecer en la bibliografía ninguna otra cita. En dicho trabajo, Margalef atribuyó, con ciertas reservas, a *Prostoma clepsinoides* Dugés, los ejemplares que posteriormente identificó como *P. graecense* (Bohmig, 1892) (MARGALEF, 1955), ya que se basó únicamente en caracteres de la anatomía externa. Hoy en día, por el contrario, la sistemática de los nemertinos se basa fundamentalmente en caracteres de su anatomía interna, tales como: número de cordones nerviosos en la trompa, presencia o ausencia del órgano frontal, mayor o menor desarrollo de la glándula cefálica, esfago ciliado o no,

etc. (GIBSON, 1972, 1982; GIBSON & MOORE, 1976).

En muestreos quincenales efectuados con diversos fines durante los meses de octubre a diciembre de 1984 y 1985, en las márgenes de los ríos Henares y Torote, cerca de Alcalá de Henares (Madrid), se recogieron varios ejemplares de nemertinos. Después de ser seccionados y teñidos convenientemente, se observaron los caracteres anatómicos indispensables para su correcta determinación.

La longitud máxima de los ejemplares adultos recogidos (medidos mientras se deslizaban sobre el fondo de una placa de Petri sobre papel milimetrado) oscila entre 10 y 17 mm. Su coloración es rosácea o roja anaran-