

Métodos para el estudio histológico de *Physa acuta* DRAP. (Pulmonado Basomatóforo)

POR

Josefina ESPAÑOL

Para resolver con garantías de acierto los múltiples problemas que nos plantea la interpretación morfológica y la sistemática natural de los pulmonados basomatóforos se hace necesario el empleo de nuevos métodos basados en la anatomía comparada de los mismos, ayudándose de la investigación histológica que aporta interesantes datos de interpretación.

Como punto de partida se ha escogido la especie *Physa acuta* DRAP. por su relativa abundancia, polimorfismo y pequeño tamaño que facilita las técnicas histológicas.

Physa acuta se localiza en los ríos, arroyos y charcas de aguas poco agitadas, sujetas a las hojas secas, algas y piedras o también deslizándose sobre ellas gracias al mucus que segregan que facilita su desplazamiento; e incluso confundidas con el lodo en las zonas poco profundas. De cuando en cuando suben a la superficie para renovar su provisión de aire, nadando con bastante rapidez y vueltas al revés. En cuanto a su régimen alimenticio son herbívoras y muy voraces, en casos más raros carnívoras, llegando a practicar el canibalismo.

El material objeto de estudio se ha recogido en el Prat de Llobregat (Barcelona) durante todo el año, más abundante en verano; en las charcas de Casa Antúnez (Barcelona); en el río Congost (prov. Barcelona) en gran abundancia, principalmente en los meses de julio a septiembre; de esta localidad ha salido la mayor parte del material estudiado. Asimismo se han encontrado numerosos ejemplares en los canales que desembocan en el lago de Bañolas (Gerona), a finales de noviembre.

Se han podido mantener vivas en el laboratorio, a fin de realizar observaciones en cuanto a su etología y ciclo biológico, utilizando cubas de plástico o de vidrio con agua y una suspensión de algas, con la sola precaución de renovar aquélla, sin otra necesidad de aireación; la temperatura ambiental estacionada alrededor de los 22 grados C. En estas condiciones se han mantenido vivas y con reacciones normales durante meses.

Las primeras dificultades que se plantean en la interpretación de la anatomía microscópica de *Physa acuta* son las de conseguir una buena fijación, inclusión y coloración. En la presente nota se exponen los resultados obtenidos en los ensayos de distintas técnicas empleadas en esta especie.

La pauta a seguir en la preparación del material en vistas a su ulterior estudio es la de lograr que el animal muera en completa extensión, para ello se han probado varios métodos: asfixia por gas, por la acción de la corriente eléctrica, con vapores de cloroformo, mediante soluciones salinas, sin conseguir con ninguno de ellos superar el método clásico de ahogarlo en agua, que por otra parte es el que produce menos alteraciones en los tejidos; su inconveniente es que es lento; se ha acelerado con el empleo de agua hervida o carbónica.

Muerto el animal se ha de fijar teniendo en cuenta que los tejidos de los gasterópodos no reaccionan de igual manera que el de los vertebrados y que el fijador escogido ha de ser el más conveniente para la coloración seleccionada. Como líquidos fijadores se han utilizado los siguientes:

Bouin. — Mantenedos los ejemplares en el líquido durante tres o cuatro días; se ha revelado como un excelente fijador para la conservación de detalles citoplasmáticos y nucleares.

Duboscq-Brasil. — Resultados similares a los obtenidos con *Bouin* aunque más rápidos.

Carnoy. — Fijador muy penetrante; duración del proceso, de dos a cuatro horas según el grosor de la pieza.

Alcohol de 95 %. — Para el estudio de las sales de calcio.

Formol neutro. — En concentraciones del 30 % al 50 % para las impregnaciones metálicas.

Helly. — Buenos resultados; duración del proceso, de seis a ocho horas.

Zenker. — Fijación durante 24 horas; el inconveniente de este fijador es que, como el anterior, exige un largo lavado en agua para eliminar el dicromato potásico, seguido de un tratamiento de alcohol yodado para la supresión del sublimado corrosivo; a pesar de estos inconvenientes ha sido muy usado por permitir buenas coloraciones.

Susa de Heindenhain. — Fijación 24 horas. Buenos resultados.

Halmi. — Se prepara mezclando 9 volúmenes de *Susa de Heindenhain* con 1 volumen de solución acuosa saturada de ácido pícrico. Duración del proceso, 24 horas. Recomendable para el estudio del material de neurosecreción.

La decalcificación del material se ha realizado siempre después de la fijación; si el fijador contiene algún agente decalcificante (ác. acético, ác. pícrico, ác. tricloro-acético, etc.) se ha prolongado algún tiempo más la fijación o se ha aumentado ligeramente la concentración del agente decalcificante; en caso contrario, luego de un buen lavado de la pieza para evitar precipitados, se ha utilizado el ác. tricloro-acético en concentración muy débil, del 2 % al 3 %, prefiriendo aumentar el tiempo de permanencia en el líquido que aumentar la concentración del ácido que produciría una retracción de los tejidos. Acabada la decalcificación es necesario neutralizar los tejidos con un buen lavado o por acción química.

Los ejemplares han sido incluidos en parafina de 54 grados; la duración del proceso ha variado entre tres o cuatro días. La penetración de la parafina en la masa visceral es lenta; si se acorta el tiempo de inclusión se corre el peligro de que la penetración no sea total y queden huecos en el interior. Para facilitar la entrada de la parafina se pueden practicar finísimas incisiones que faciliten la penetración. Otro punto a tener en cuenta en el momento de la inclusión es el de la orientación de la pieza; ésta ha de estar dispuesta exactamente en la dirección escogida para el corte; con ayuda de agujas calientes se puede conseguir sin mucha dificultad.

El grosor de los cortes ha oscilado entre 6,8 y 10 micras según se interesara observar detalles citológicos o de conjunto.

Para la tinción se han utilizado los siguientes métodos:

Hematoxilina-eosina. — Método clásico; buena conservación.

Azul de toluidina-eritrosina. — Proporciona muy buenos contrastes y es estable.

Safranina-verde luz. — Empleado para la coloración de las glándulas mucosas del pie.

Tricrómico de Masson. — Interesante para la coloración de los elementos del tejido conjuntivo.

Mallory. — Buenos resultados; recomendable por su rapidez.

Azán. — Modificación de Heindenhain al método de *Mallory* con el que se consigue mayor estabilidad y selectividad.

Hemalum P. I. C. (picro-carmín de índigo).— Primero, coloración nuclear con el *Hemalum de Masson*, seguida de una tinción del citoplasma por la mezcla de Ramón y Cajal (solución saturada de ácido pícrico con 0,40 gr. de carmín de índigo.)

En la deshidratación de algunas preparaciones se ha sustituido el xilol por el tolueno o benzol, más volátiles y por lo tanto más fáciles de eliminar y produciendo, por otra parte, un menor endurecimiento de los tejidos. Para una mayor rapidez en los pasos de la deshidratación es recomendable el uso del alcohol isopropílico.

Se han ensayado varios métodos de montaje tanto en las preparaciones de tejidos como en las de rádulas y mandíbulas. El empleo de un reactivo conservador líquido lleva consigo el tener que cementar la preparación; si el reactivo es sólido se aplica mediante calor o con un disolvente volátil.

Entre los medios de montaje miscibles en agua se han empleado: líquido de Hoyer, jarabe gomoso de Apathy, Berlesses, goma arábica y glicerina. De todos ellos los que han dado mejores resultados han sido el líquido de Hoyer, el jarabe gomoso de Apathy y el Berlesses; con ellos el montaje es rápido y los resultados satisfactorios; el empleo de goma arábica lleva consigo la aparición con el tiempo de grietas en la preparación, y el de glicerina (debe ser anhídrica y neutra) a la larga decolora y retrae algo al tejido conjuntivo.

Entre los medios de montaje no miscibles en agua se han usado dos principalmente: bálsamo del Canadá y Euparal; los resultados obtenidos con el último son comparables a los del bálsamo del Canadá, por lo que no es recomendable dado su mayor coste económico.

Laboratorio de Zoología (1).
Facultad de Ciencias.
Universidad de Barcelona.

(1) Este trabajo se ha beneficiado de la ayuda concedida a la Cátedra de Zoología (invertebrados) de la Facultad de Ciencias de Barcelona, con cargo al crédito destinado al fomento de la investigación en la Universidad.