

UTILITAT DEL GLICOL METACRILAT (GMA) EN L'OBTENCIÓ DE TALLS SEMIFINS PER A HISTOLOGIA

S. Bonet i Marull i M. Molinas de Ferrer

Resum

S'expliquen els avantatges de la incorporació dels talls semifins al laboratori d'histologia animal o vegetal i l'aplicació del glicol metacrilat (GMA) com a medi d'inclusió.

És un mètode simple i ràpid que no requereix utilatge complex el que el posa a l'abast de pràcticament tots els laboratoris. Permet infiltrar peces grosses, és adequat a la majoria de tècniques citoquímiques, histoquímiques o immunològiques i s'hi poden aplicar fàcilment les tècniques de coloració habituals.

Summary

The article explains the advantages of semithin sections in plant or animal histology and the use of glycol metacrylate (GMA) as inclusion medium. It summarizes the authors experience in the field.

* (Departament de Biologia. Col·legi Universitari de Girona)

UTILITAT DEL GLICOL METACRILAT

El millor coneixement de l'estructura i la ultraestructura dels teixits normals i patològics i la introducció de noves tècniques histo i citoquímiques o immunològiques, fan palesa la necessitat de disposar de talls més fins que els habituals que situant-se en l'àmbit dels talls semifins de la ultramicrotomia (0.25 a 4 micres), no presentin alguns dels inconvenients d'aquests. Si bé és cert que els ultramicrotoms s'han simplificat encara són eines cares de manipulació complexa, pensades per obtenir blocs petits insuficients per a segons quins tipus d'observació i poc pràctics per a diagnòstics de rutina.

Es tracta de trobar materials que infiltrin fàcilment fins i tot peces grosses o difícils (teixits lignificats, os, etc...) i que es puguin tallar en seccions semifines amb els microtoms de rotació o, millor encara amb aparells de nou disseny pensats especialment per a aquesta finalitat i molt més simples que els ultramicrotoms. Si disposem d'una tècnica que compleixi els requisits exposats podrem augmentar el rendiment de la microscòpia òptica aprofitant al màxim les noves aportacions en matèria d'apertura, correcció i lluminositat dels objectius i omplir el relatiu buit que trobem entre l'ús convencional del microscopi òptic i la microscòpia electrònica.

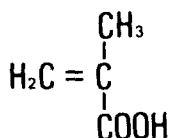
Dels diversos materials en ús: parafines, poliglicols, metacrilats, resines epoxi, araldit, etc..., són els metacrilats els que s'acosten més als objectius assenyalats i un d'ells, el **glicol metacrilat** (GMA), és el que sembla presentar un conjunt d'avantatges que poden portar-lo a substituir la parafina o les mesclades com el Paraplast inclús en el diagnòstic de rutina o en treballs didàctics. Per això hem cregut oportú aportar els resultats de les proves realitzades a fi d'incorporar el GMA al processat de teixits animals i vegetals, i que proporcionen, al nostre parer, resultats excel·lents. Creiem que el treball té interès per la divulgació d'aquesta tècnica que permet introduir-se al món dels semifins sense dependre d'aparellatge o tecnologia costosos presents al mercat.

INCLUSIÓ EN GLICOL METACRILAT (GMA): ELS REACTIUS.

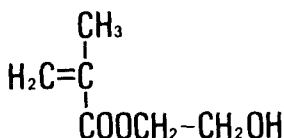
La utilització histològica del GMA requereix la imbibició dels teixits pel **monomer** i la conseqüent polimerització per formar blocs de les característiques adequades per obtenir talls de 0'5 a 5 micres. Aquest procés necessita un iniciador de la reacció anomenat **polimeritzador** i un **accelerador** apropiats així com l'adició de productes d'efecte **regulador** i **plastificant**.

El monòmer és el 2-hidroxietil metacrilat ((1,2 etanodiol mono (2-metil propenoic àcid) ester), conegut per **glicol metacrilat**, GMA i HEMA. P.M. 130 $C_6H_{10}O_3$.

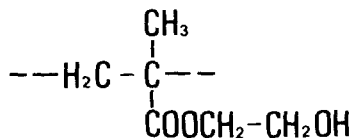
Es un líquid clar lleugerament viscos que polimeritza en un sòlid transparent. S'obté per oxidació de la metacroleïna o per deshidratació de l'àcid hidroxii-sobutíric. Es un derivat de l'àcid metacrílic (2-metil propenoic àcid), altres derivats del qual com per exemple el metil metacrilat intervenen en la fabricació de plàstics com el Plexiglas, Perspex, Lucita, etc.



A. Metacrílic



Glicol-Metacrilat

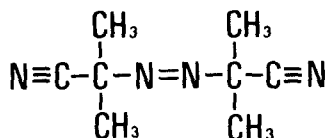


Enllaços d'adició

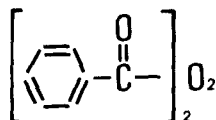
Es troba estabilitzat amb hidroquinona en proporcions del 0.02 al 0.03% o pur i aleshores s'ha d'estabilitzar o consumir-lo fresc.

Es poden emprar dos **polimeritzadors** o més propiament dos iniciadors de la polimerització. Són l'azobis i el peroxid de benzoil. La seva funció es activar a través de la formació de radicals lliures, el monomer, per induir-lo a polimeritzar.

L'**azobis** és el 2,2-azobisisobutironitril (2,2-azobis (2-metil propionitril), també AIBN, x,x-azodiisobutironitril, 2,2'-diciano-2,2'-azopropano i Porofor-57. P.M. 164'21. $C_8H_{12}N_4$. Soluble en alcohol. Es ven en forma d'una pols de color blanc.



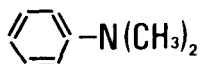
El **peròxid de benzoil** (dibenzoil peròxid), també anomenat benoxil, benzoil superòxid, Oxi-5, Persadox i Lucidol. P.M. 242'22. $C_{14}H_{10}O_4$ Catalitzador molt generalitzat en la síntesis de plàstics industrials. Es ven humitejat del 20 al 25% en forma d'un granulat blanquinós que cal manipular amb cura doncs és un potent queratolític i pot explotar en escalfar-se o rebre una pressió forta.



L'**accelerador** és la **N-N-dimetil anilina** (N,N-dimetil benzèamina), també anomenada dimetilfenilamina. P.M. 121,18. $C_8H_{11}N$.

Líquid oliós molt metzinós, insoluble en aigua però soluble en alcohols, cloroform i eters. Actua disminuint l'energia d'activació necessària per l'acció del

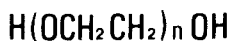
polimeritzador, potenciant-ne la funció.



El regulador. que utilitzarem en la polimerització en fred, és el **butil cellosolve** (2-butoxietanol), també anomenat butil glicol, etilen glicol mono butil eter o eter monobutílic de l'etilen glicol. P.M. 118,17. $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$
 $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$. Líquid transparent, fluid, soluble en aigua al 5% i molt soluble en disolvents orgànics. Es un disolvent del GMA, facilita la penetració i ajuda a homogenitzar la reacció i a establitzar el pes molecular del polimer.

El plastificant és el **polietilen glicol 400** (x-hidro- -hidroxipoli (oxi-1,2-etanodiol)), també anomenat Macrogol, PEG-400, Carbowax, Nicolina, Pluracol E, Poli G, Poliglicol E, i solbase.

Els polietilen glicols són líquids viscosos o sòlids de color blanc que formen un col·loide hidròfil transparent en estat de sol. Solubles en disolvents orgànics però no en hidrocarburs aromàtics poden disoldre algun tipus de plàstics, es tracta de polímers de fórmula general:



(essent n 4 o més gran que 4).

Cada PEG va acompanyat d'una xifra indicadora del seu pes molecular aproximat. En el PEG-400 «n» va de 8'2 a 9'1 i el P.M. oscil·la entre 380 i 420. Proporciona blanesa al material i participa també de l'acció reguladora.

PREPARACIÓ DE LES MOSTRES: FIXACIÓ I DESHIDRATACIÓ

Les peces es tallen preferentment en fragments petits, d'uns 5 mm de costat, però no hi ha cap inconvenient en processar peces més grosses tal com es fa amb la parafina.

Tots els fixadors comunment emprats com formol, glutaraldehid, permanganat, etc... o mescles com Bouin, Carnoy, F.A.A., per exemple, poden servir per a la inclusió en GMA (a nosaltres el formol, en concentracions del 3 al 5% segons el tamany de la peça, en tampó fosfat de Sorensen pH 7,2 ens proporciona molt bons resultats). Un cop acabada la fixació es procedeix a rentar amb aigua o amb alcohol de baixa gradació i a continuació es pot seguir amb una deshidratació gradual en alcohol etílic o, aprofitant la hidrossolubilitat del monòmer, transferir-les directament a la solució infiltradora. La nostra experiència ens aconsella que exceptuant els casos en que estigui contraindicat, com poden ésser estudis enzimàtics, coloració de lípids, tècniques immunològiques, entre al-

tres, es procedeix a una deshidratació gradual prescindint de l'aclariment donat que el pas per aclaridors com xilol, toluol, o essències, no millora els resultats.

IMBIBICIÓ I INCLUSIÓ

Diversos procediments permeten obtenir bones inclusions en GMA si bé es poden considerar dues línies bàsiques: a/ la que seguint els treballs de Feder i O'Brien (1968) obté la polimerització del plàstic a l'estufa a 60°C i b/ la que introduïda per Ruddell (1967) i modificada per Sims (1974) obté la polimerització a temperatura ambient o en frigorífic. La primera proporciona resultats excel·lents per a teixits vegetals, la segona és molt més ràpida i permet aplicar el mètode per a estudis histològics o immunohistològics.

a/ inclusió per polimerització a l'estufa a 60°C

solucions

solució infiltradora

| | |
|---|-------|
| 2-hidroxietil metacrilat (GMA) (monomer) | 94'5% |
| 2-2'azobisisobutironitril, (polimeritzador) | 0'5% |
| Polietilenglicol 400 (plastificant) | 5'0% |

procediment

1/ Col·loqueu la solució infiltradora en un motlle de silicona i transferiu-hi les peces procedents de l'alcohol absolut o de l'aigua.

2/ Deixeu els motlles a l'estufa a 40°C durant 48 hores i a continuació 24 hores més a 60°C. En aquest darrer pas es produeix la polimerització del bloc. Si en aquest espai de temps la polimerització no s'ha complert continueu a 60°C fins a la polimerització total (blocs de 2 cc requereixen habitualment unes 48 hores a 60°C).

3/ Procediu a retirar el motlle, deixeu-lo refredar i talleu-lo a la mida desitjada amb una serra de joier. (dentat 0'25 a 0'21 mm). (Si la superfície queda enganxosa desbasteu-la amb la serra o amb una navalla, no és important).

b/ inclusió per polimerització en fred

solucions

solució infiltradora

| | |
|---|---------|
| 2-hidroxietil metacrilat (GMA), monomer | 80'0 ml |
| 2-butoxietanol, regulador | 8'0 ml |
| benzoil peròxid, polimeritzador | 0'5 gr |

— (L'addició de butoxietanol que actua de regulador disolvent és aconsellable, especialment si es tracta de blocs grossos, però no és imprescindible).

Solució promotora

polietilen glicol 400, plastificant 8 ml
N,N-dimetilanilina, accelerador 1 ml

(Tant la solució promotora com a infiltradora es poden conservar durant uns mesos a la nevera).

procediment

1/ Transferrir les peces de l'alcohol o de l'aigua a la solució infiltradora. Dos canvis de 12 hores a temperatura de 10 a 20 °C són suficients.

2/ Barrejeu quaranta-dues parts de la solució infiltradora amb una part de la promotora i distribuïu la barreja als motlles. Tal com s'explica al text les proporcions admeten un marge de variació. La proporció 42:1 (aprox. 50:1,2) és la recomenada però pot oscil·lar entre 50:1 (blocs més durs i polimerització més lenta) i 50:1'5 (blancs més tous i polimerització més ràpida).

En aquest moment podem triar entre polimeritzar a temperatura ambient, procediment ràpid molt adequat al treball de rutina, o fer-ho a baixa temperatura de tal manera que encara que la reacció sigui fortament exotèrmica les mostres no sobrepassin els 20 °C. Tant en un cas com en l'altre convé evitar el contacte amb l'O₂ que inhibeix la correcta polimerització, caldrà utilitzar petites càpsules de polietilè de fons pla i rebutjables.

3-a/ polimerització a temperatura ambient. Al cap d'uns 40 min. s'inicia la reacció. La temperatura de les mostres arriba fins uns 52 °C. Passades dues hores la polimerització sol estar acomplerta i es pot retirar el motlle. Si la superfície queda enganxosa aixugeu-la amb un paper de filtre i desbasteu-la amb una navalla, es tracta d'un defecte de polimerització a la superfície o d'una lleugera exudació del plastificant que no té importància.

3-b) polimerització a baixa temperatura. Col·locarem els motlles al refrigerador (8 a 10 °C) o parcialment submergits en aigua freda. La polimerització comença al cap d'unes dues hores i pot donar-se per acabada dues hores més tard. La temperatura no supera els 20 °C i en total l'operació vol de 4 a 5 hores.

(A voluntat de l'operador es poden fer diverses variacions per ajustar-la duresa òptima, controlar la temperatura de reacció, procedir amb la màxima rapidesa i al mateix temps garantir una bona infiltració, així com procurar que la densitat de la barreja sigui lleugerament inferior a la de les mostres per a facilitar-ne l'orientació.

La duresa dels blocs depend de les quantitats de polimeritzador i plastificant, estant en relació directa amb el primer i inversa amb el segon.

La densitat de la barreja està en relació amb la proporció de regulador i d'accelerador.

La velocitat i temperatura de reacció. un cop fixades les proporcions de polimeritzador i plastificant depenen directament de la quantitat d'accelerador i de la temperatura ambiental en la que es realitza la polimerització. Sempre que es vulgui incidir sobre aquests dos factors, temperatures ambiental o quantitat d'accelerador, s'ha de tenir present que tractant-se d'una reacció fortament exotèrmica es corre el risc de que el bloc sobrepassi el límit de temperatura tolerat

per les mostres. Per exemple si augmentem en 0'5 ml la quantitat d'accelerador (N,N-dimetilanilina) en el procediment descrit la polimerització dels blocs a temperatura ambient de 20°C es completa en 30 min. en lloc de les dues hores previstes, però la temperatura dels blocs supera els 70°C.

En resum, sospesats tots els factors aconsellem cenyir-se a les proporcions recomenades i provar petites variacions en cas de tractar-se de materials particularment difícils).

MICROTOMIA, COLORACIÓ I MUNTATGE

Els microtoms de rotació convencionals poden ésser utilitzats en l'obtenció de semifins del GMA. Nosaltres hem aconseguit amb blocs grossos talls de 1 a 5 micres amb un Leitz de rotació model 1512 i ganiveta dura per tallar òs) i amb blocs petits talls de 3 a 5 micres amb un Minot Reichert i ganiveta normal.

Els microtoms de rotació pesats, que darrerament s'han introduït al mercat permeten, amb ganivetes dures i molt ben esmolades, obtenir talls de 0'25 a 5 micres. Hem tallat els nostres blocs amb l'Autocut (Reichert) i, vigilant l'estat de la ganiveta, hem obtingut sense problemes talls de tots els gruixos desitjats. Els mateixos resultats poden obtenir-se amb altres microtoms del mateix tipus com l'Historange (LKB). Molt interessant ens sembla l'oferta de Sorvall-JB-4 (DuPont Instruments) d'un microtom de rotació lleuger preparat especialment per tallar metacrilats.

Els blocs s'han de subjectar fortament amb les pinces del microtom i si cal adherir-los als portablocs amb un ciment epoxi (tipus Nural 23).

Els talls obtinguts s'agafen amb les pinces i es transfereixen a un bany d'aigua, calenta o no, on s'extenen completament. Es recullen amb el porta i es deixen secar a temperatura ambient o a l'estufa.

La majoria de les coloracions habituals s'apliquen sobre els talls en GMA amb petites variacions de temps o de concentració dels colorants que la mateixa pràctica suggereix.

La hidrofília del material (GMA) permet la utilització directa dels colorants en solució aquosa sense necessitat de desplastificar ni rehidratar. En canvi no es poden utilitzar les solucions alcoholiques de gradació superioral 70°, doncs l'alcohol estava i arruga el plàstic i els talls es desenganxen.

Les coloracions d'hematxilina o blau de metilè amb contrast de fuxina bàsica o eosina, les metacromàtiques amb blau de toluidina, o les específiques com la de P.A. Schiff o la de Feulgen, s'apliquen sense cap dificultat. També s'obtenen molt bones preparacions per impregnació argèntica i diversos autors han experimentat amb èxit variades coloracions histoquímiques i citoquímiques.

Un bon rentat amb aigua permet eliminar la major part de colorant retingut pel plàstic i encara que quedi una lleugera coloració de fons no interfereix en l'observació.

Quan la preparació és ben seca es procedeix al muntatge amb qualsevol dels medis, hidròfils o no, en ús als laboratoris.

AVALUACIÓ GENERAL I CONCLUSIONS

Hem remarcat anteriorment les possibilitats del GMA com a medi d'inclusió capaç de substituir la parafina i els seus afins. És un mètode simple, ràpid i no requereix utilitatge complex, estant a l'abast de pràcticament tots les laboratoris. Infiltra amb facilitat, permet manipular peces grosses i tractant-se d'un medi hidròfil es poden conservar els lípids i altres substrats imprescindibles per certes reaccions histo i citoquímiques. La polimerització a baixa temperatura permet incorporar-lo a les tècniques enzimàtiques i immunològiques. Les coloracions donen molt bon contrast i es poden apreciar detalls citològics molt difícils de veure amb les preparacions de parafina habituals. En la nostra opinió el mètode mereix una gran atenció.

ASHLEY, C.A. AND FEDER, N (1966). Glycol methacrylate in histopathology. *Archs. Path.* 81, 391-397.

CATHEY, W.J. (1963). A plastic embedding medium for thin sectioning in lighth microscopy. *Stains Technol.* 38, 213-216.

FEDER, N. (1960). Some modification in conventional techniques of tissue preparation. *J. Histochem. Cytochem.* 8, 309-310.

FEDER, N. and O'Brien (1968). Plant microtechnique: Some principles and new methods. *Amer. J. Bot.* 55, 123-142.

FLAX, M. H. AND CAULFIELD (1962). Use of methacrylate embedding in lighth microscopy. *Arch. Pathol.* 74, 387-395.

GREEN, H. (1970). A simple method for histological examination of bone narrow particles using hydroxyethyl methacrylate embedding. *J. Clin. Path.* 23, 640.

GUPTA, P.D. (1983). Ultrastructural study on semithin sections. *Science Tools*, vol, 30, n° 1, 1983.

ROSENBERG, M., BARTL. P. AND LESKO (1960). Water-soluble methacrylate as an embedding medium for the preparation of ultrathin sections. *J. Ultrastruct. Res.* 4, 298-303

RUDELL, C.L. (1967a). Hydroxyethyl metharylate combined with polyethylene glycol 400 and water; an embedding medium for routine 1-2 microsections. *Stain Technol.* 42, 119.

(1967b). Embedding media for 1-2 microsectioning. 2 hydroxyethyl methacrylate combined with 2-butoxyethanol. *Stain Technol.* 42, 253.

SALAZAR, H. (1964). Diethylene glycol distearate embedding and ultramicrotome sectioning for light microscopy. *Stain Technol.* 39, 13-17.

SIMS, B. (1974). A simple method of preparing 1-2 sections of large tissue blocks using glicol methacrylate. *J. Microscopy*, 101, 223.

Diverses cases comercials com l'EGA CHEMIE, FLUKA, FEROSA, SIGMA, PANREAC, PROBUS, etc. suministren part dels reactius emprats en la tècnica; però sols algunes els ofereixen tots:

| | TAAB | | POLYSCIENCES | | MERCK | |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|--------------|---------------|--------|------------------------|
| | Ref. | Quant. | Ref. | Quant. | Ref. | Quant. |
| HYDROXIETIL METACRIL. | H008 H009 H010 | 500 ml 250 ml 100 ml | 0227 | 500 g 1 Kg | 12243 | 250 ml |
| BUTIL CELLOSOLVE | B020 B019 | 2 ½ l 500 ml | 0228 | 500 g 1 Kg | 801554 | 1 l |
| AZOBISISOBUTIRONITRIL | A014 | 100 g | 0117 | 100 g | 12431 | 100 g |
| PEROXID DE BENZOIL | B002 B003 | 100 g 25 g | 3968 | 450 g | 12435 | 100 g |
| N,N, DIMETIL ANILINA | D029 | 100 ml | 0231 | 250 g | 803060 | 500 ml 1 l 2 ½ l |
| POLIETILEN GLICOL 400 | CQ03 | 500 g | 1109 | 1 kg | 807485 | 1 l |

Nota: Algunes cases, a més de vendre els produes per separat, venen també «KITS». HEMA KIT (TK6) Ref. H 017 (Taab), JB-4 EMBEDDING KIT Ref. 0226 (Polysciences).

ADRESSES

MERCK: IGODA, S.A. Apartat 381. Barcelona. Tel. 309-23-04

TAAB: 40 Grovelands Road. Reading, Berkshire, England. Tel. (0734) 5880033

F. GOMEZ C/ Navas de Tolosa n° 358-362. Barcelona-27. Tel. 351-15-85.

POLYSCIENCES LIMITED. 24 Low Farm Place. Moulton Park. Northampton NN3. 1HY. United Kingdom. Tel: (0604) 46496.