

2  
20j

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**"MICROMETODO CUANTITATIVO PARA LA DETERMINACION DE COLAGENA Y DE PROTEINAS NO COLAGENICAS EN CORTES HISTOLOGICOS DE HIGADO DE RATA"**

**T E S I S**  
Que para obtener el título de:  
**Q U I M I C O**  
P R E S E N T A  
**ALFREDO LOPEZ DE LEON**

Director de Tesis: DR. MARCOS ROJKIND MATLUK  
Asesor Interno: Q. F. I. GILDA FLORES ROSALES

Cuatitlán Izcalli, Estado de México - 1988.

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

	Pag.
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	3
I.1. COMPONENTES COLAGENICOS.....	4
I.2. COMPONENTES NO-COLAGENICOS.....	5
I.2.a. GLUCOSAMINOGLICANOS.....	5
I.2.b. FIBRONECTINA.....	6
I.2.c. LAMININA.....	6
I.2.d. HEPATONECTINA.....	7
II. ANTECEDENTES.....	8
II.1. METODOS DE TINCION HISTOLOGICOS.....	11
II.2. METODOS NO-INVASIVOS.....	13
III. OBJETIVO.....	17
IV. MATERIALES Y METODOS.....	18
IV.1. METODO DE TINCION.....	19
IV.2. DETERMINACIONES DE HIDROXIPROLINA Y PROTEINA.....	20
IV.2.a. DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA.....	20
IV.2.b. DETERMINACION DE PROTEINA.....	21
IV.3. ELECTROFORESIS EN GELES DE ACRILAMIDA.....	22
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
VI. CONCLUSIONES.....	48
VII. ANEXO I.....	50
VIII. ANEXO II.....	52
IX. BIBLIOGRAFIA.....	54

## INDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Determinación del tiempo de incubación óptimo para cortes de hígado en reactivo de Bradford.....	28
Figura 2. Fotomicrografías de cortes de hígado, bazo, riñón y pulmón, teñidos con Rojo sirio F3BA y Verde rápido FCF.....	31
Figura 3. Espectro de absorción del Rojo sirio F3BA.....	34
Figura 4. Espectro de absorción del Verde rápido FCF.....	35
Figura 5. Absorbencia relativa del Verde rápido FCF a 605 y 540 nm.....	36
Figura 6. Espectro de absorción de los colorantes eluidos de un corte de hígado cirrótico.....	37

## INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Color equivalente para la proteína no-colagénica determinado por la union del Verde rápido FCF.....	39
Tabla 2. Color equivalente para la proteína colagénica determinado por la union del Rojo sirio F3BA.....	40
Tabla 3. Determinación de la concentración de Colágena en los cinco tejidos estudiados, comparando el método químico y el de tinción.....	42
Tabla 4. Determinación de la colágena nativa tipo I gelificada a 37 C, comparando el método químico y el de tinción.....	44

## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método simple, sensible y cuantitativo para la determinación de colágena y de proteínas no-colagénicas en cortes histológicos, de hígado, riñón, pulmón, corazón y bazo de rata, fijados en formaldehído e incluidos en parafina.

El método se basa en la unión selectiva del Rojo sirio F3BA a los componentes colagénicos y del Verde rápido FCF a los componentes no-colagénicos. Ambos colorantes son estables en solución saturada acuosa de ácido pícrico.

La tinción de los componentes colagénicos, por el Rojo sirio F3BA no interfiere con la tinción de los componentes no-colagénicos por el Verde rápido FCF, por lo que la tinción se puede efectuar simultáneamente. Además, ambos colorantes son eluidos fácilmente en una mezcla equivolúmetrica de hidróxido de sodio 0.1 N y metanol absoluto.

Los colorantes, una vez eluidos, en la solución de NaOH-metanol muestran picos máximos de absorción (540 y 605 nm) lo suficientemente separados para permitir la determinación cuantitativa de cada uno.

La unión de los colorantes, a los cortes, es proporcional a su contenido protéico y dentro del error experimental todos los tipos genéticos de colágena, en cantidades similares de Rojo sirio F3BA.

Los colores equivalentes, para los componentes colagénicos (37.8 A 540nm /mg de colagena) y los no-colagénicos (2.08 A 605nm /mg de protefna), fueron determinados mediante el análisis químico (hidroxiprolina y micro-Kjeldhal) de cortes previamente analizados mediante el método de tinción.

El método puede detectar hasta 5.7 microgramos de colágena por miligramo de protefna y puede ser empleado para valorar el grado de fibrosis en biopsias y en la evaluación de los efectos de drogas antifibrogénicas.

## 1. INTRODUCCION

La cirrosis hepática es uno de los padecimientos humanos que cursan con fibrosis y ha sido ampliamente estudiada, tanto en México como en otras partes del mundo. En México, es la primera causa de muerte de sujetos jóvenes del sexo masculino, cuya edad oscila entre los 30 y los 50 años de edad.

La cirrosis hepática es la vía final común de todos los padecimientos crónicos que afectan al hígado en forma difusa y, desde el punto de vista anatómico, se caracteriza por un daño celular generalizado, regeneración del parenquima hepático, aumento del tejido conectivo, formación de nódulos de hepatocitos rodeados por bandas de colágena y distorsión de la arquitectura lobular. A consecuencia del daño celular y de las modificaciones estructurales, se presentan importantes cambios hemodinámicos y funcionales (41).

El aumento del tejido conectivo hepático en la cirrosis es el principal responsable de las alteraciones que afectan al hígado. La naturaleza del tejido conectivo hepático es bastante heterogénea y está constituido principalmente por dos tipos de compuestos: los colagénicos y los no-colagénicos (41).



### I.1. Componentes colagénicos.

Las colágenas son una clase heterogénea de proteínas extracelulares caracterizadas por una composición de aminoácidos única. Contienen 30% de glicina, 20% de prolina, más hidroxiprolina y cantidades variables de hidroxilisina y carbohidratos (glucosa y galactosa). Estructuralmente las colágenas se componen de tres cadenas polipeptídicas, helicoidales con giro hacia la izquierda, de aproximadamente 100,000 daltones de peso molecular cada una (cadenas alfa). Estas tres cadenas se acomodan en una triple hélice dextrógira de aproximadamente 300,000 daltones de peso molecular, conformando la molécula de colágena. Esta molécula posee en sus extremos zonas de tipo globular, las cuales son eliminadas por digestión enzimática cuando la procolágena es convertida en colágena (37).

Existen varios tipos genéticamente distintos de esta proteína, éstos son: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX y X, los cuales difieren en su composición de aminoácidos, ubicación y función dentro del organismo(6, 37, 45).

Esta proteína es la más abundante en los animales superiores ya que constituye el 33% o más de la proteína total.

En el hígado de rata se encuentran principalmente las colágenas tipo I (45.5%), III(47.7%) y V(6.6%), así como

colágena de membrana basal (tipo IV) (44). En otras especies, incluyendo al ser humano, los porcentajes son semejantes aunque la cantidad total varía.

## I.2. Componentes no-colagénicos

Los principales componentes no-colagénicos son los glicosaminoglicanos y las glicoproteínas: fibronectina, laminina y heparanectina (41).

### I.2.a. Glucosaminoglicanos

Los proteoglucanos son agregados de alto peso molecular, hechos de heteropolímeros de proteína y azúcar. La unidad básica o monómero de proteoglucano está constituida por varias cadenas de glucosaminoglicanos unidas a una estructura proteica. Aunque la organización y estructura tridimensional (en el hígado) no ha sido elucidada, actualmente se conoce la composición porcentual, casi el 75% corresponde a heparán sulfato, 10% es ácido hialurónico, 7% dermatán sulfato y 7% condroitín sulfato (41).

### 1.2.b. Fibronectina

La fibronectina es un dímero formado por dos subunidades diferentes, con un peso molecular de 220,000 daltones cada una, unidas covalentemente por un puente disulfuro cerca del extremo carboxilo terminal. Esta proteína existe en dos formas: una que es insoluble y es conocida como fibronectina celular o tisular y otra, la cual es soluble y se encuentra en el plasma sanguíneo en una concentración de 30 mg por 100 ml de plasma; esta forma soluble es también conocida como globulina insoluble en frío (Clg por sus siglas en inglés).

La fibronectina presenta varias regiones que poseen una alta especificidad de unión a ciertas macromoléculas como: colágena, gelatina, fibrina, fibrinógeno, glicosaminoglicanos (heparina, heparán sulfato y ácido hialurónico), actina, estafilococos y células (41, 47).

### 1.2.c. Laminina

La laminina es una glicoproteína de aproximadamente 800,000 daltones y consta de dos subunidades, una de 400,000 y otra de 200,000 daltones, unidas por puentes disulfuro. La actividad biológica de la laminina no está bien determinada, pero se ha sugerido que es el principal factor de adhesión para

células epiteliales en cultivo y que puede jugar un papel importante en la morfogénesis y en la diferenciación celular (40, 42).

#### I.2.d Hepatonectina

La heptonectina es una glicoproteína de alto peso molecular, recientemente aislada y aún no caracterizada. Se ha sugerido que esta glicoproteína puede ser el factor específico de adhesión para hepatocitos (40).

Durante el proceso fibrogénico no todos los componentes se ven igualmente afectados, aunque ésto debe tomarse con cierta reserva, ya que los cambios de composición sólo se han establecido cuantitativamente para los componentes colagénicos, e inmunológicamente para los no-colagénicos.

De los componentes colagénicos se sabe que durante las primeras etapas la relación de las colágenas I/III se mantiene más o menos constante - 1.0 - y en las fases tardías esta relación se ve alterada, alcanzando valores de aproximadamente 3.0. Esta variación en la relación I/III se ha sugerido como un marcador de la reversibilidad o irreversibilidad del proceso (41, 43).

En cuanto a la dinámica del proceso, el aumento en la concentración de colágena se ha propuesto que se debe a un

incremento en su síntesis y no a una disminución en su degradación, ya que la colagenasa no se encuentra disminuida sino por el contrario, está aumentada en su forma activa como activable (22).

## II. ANTECEDENTES METODOLOGICOS

En los últimos 20 años varias enzimas, metabolitos y componentes del tejido conectivo se han empleado para estimar el grado de fibrosis de un hígado dañado. Estos métodos se han enfocado principalmente a dos componentes, los no-colagénicos y los colagénicos (31).

Debido a que la colágena es el marcador de fibrogénesis más ampliamente usado, la metodología encaminada a su cuantificación es la que más se ha desarrollado. Estos métodos se pueden clasificar en métodos invasivos y no invasivos.

Los métodos invasivos son aquellos que requieren necesariamente de una muestra del tejido dañado, esencialmente son métodos de tipo químico y están basados principalmente en la premisa de que toda la hidroxiprolina se encuentra confinada en la colágena (26).

Así, desde 1933 Lang, Naldschmidt-Leitz y Akabori, basándose en el rico contenido en hidroxiprolina de la colágena, desarrollaron el primer método cuantitativo para determinar colágena. Este método se basó en la oxidación química de la hidroxiprolina a pirrol con hipoclorito de sodio y la posterior formación de un cromóforo con isatín (indol-2-3-diona) o p-dimetilaminobenzaldehído.

Seis años después, McFarlane y Guest desarrollaron un método que involucraba la oxidación de la hidroxiprolina con peróxido de sodio y la formación de un complejo colorido con cobre e isatín.

Las investigaciones subsecuentes buscaron optimizar los métodos anteriores ya que éstos requerían de grandes factores de corrección, así como de cantidades relativamente altas de muestra y su precisión era baja.

En 1950, Neuman y Logan optimizaron el método de McFarlane y Guest empleando peróxido de hidrógeno y p-dimetilaminobenzaldehído para formar el cromóforo en lugar de cobre e isatín (29).

Durante los siguientes 10 años, este método fue a su vez modificado varias veces buscando eliminar las variaciones resultantes de la destrucción incompleta del peróxido de hidrógeno (7), de la inestabilidad del cromóforo (20) y de la interferencia producida por cromóforos parásitos de tirosina, triptofano y otras sustancias (9, 27). En general, estos

métodos eran sólo aplicables a muestras relativamente puras, por lo que su uso en hidrolizados de tejido y orina estaba condicionado a una purificación previa.

Posteriormente, Prockop y Udenfriend desarrollaron un método basado en los anteriores pero que involucraba la adición de alanina como agente controlador del paso de oxidación, purificación de la muestra con una mezcla de resina de intercambio iónico/carbón activado y extracción con tolueno (34).

Con el advenimiento de los compuestos marcados con radioisótopos en una posición específica de la molécula, se hizo necesario que se desarrollaran métodos capaces de medir las pequeñas cantidades de prolina incorporadas en hidroxiprolina, así como de diferenciar entre la radioactividad específica de ambas.

En 1962, Peterkofsky y Prockop desarrollaron un método para medir simultáneamente la radioactividad específica de la prolina-  $^{14}\text{C}$  y la hidroxiprolina-  $^{14}\text{C}$ , presentes en materiales biológicos. Este método fue modificado después por Switzer y Summer (48), ya que el método no era muy reproducible debido a la gran cantidad de prolina e hidroxiprolina frías (sin marca) que se tenía que agregar como acarreador. Esta modificación eliminaba la necesidad del acarreador pero sólo permitía determinar la radioactividad específica de la hidroxiprolina.

Posteriormente en 1974, Rojkind y González implementaron un método, basado en el método de Woessner, para la determinación de la hidroxiprolina y en la extracción específica con tolueno de Peterkofsky y Prockop. El método permite la determinación simultánea de la radioactividad específica de la prolina-<sup>14</sup>C y la hidroxiprolina-<sup>14</sup>C, presentes en proteínas colagénicas y no colagénicas (39).

## II.1 METODOS DE TINCIÓN HISTOLOGICOS

Históricamente, el primer método empleado para teñir específicamente colágena fue la tinción de Van Gieson con picrofuscina en 1889. A partir de esta técnica, la investigación acerca de la tinción selectiva de la colágena con colorantes ácidos derivados de la anilina se desarrolló ampliamente. Primero se modificó el método de Van Gieson ya que éste presentaba dos serios problemas: 1) la fuscina ácida se decoloraba rápidamente y 2) las membranas basales y fibras reticulares se teñían muy pobremente; Lille, en 1945, mejoró la coloración de estas estructuras mediante la adición de ácido a la solución del colorante y Harms, en 1957, sustituyó a la fuscina ácida por rojo de tiazina R, pero los cortes seguían decolorándose después de un tiempo.



Posteriormente en 1964 el colorante Rojo sirio F3BA mostró tener excelentes propiedades tintorias, cuando se empleaba disuelto en una solución saturada de ácido pícrico y además, de ser altamente selectivo hacia la colágena, presentaba una magnífica definición (46). En la actualidad se sabe que el color es estable hasta por 10 años.

Aprovechando estas cualidades, en 1979 Junqueira y colaboradores, implementaron un método cuantitativo para la determinación de colágena gelificada sobre porta objetos (10).

El descubrimiento de que la cantidad de colorante unido a la proteína era proporcional a su concentración y que este podía ser eluido cuantitativamente y determinado espectrofotométricamente, dio un nuevo matiz a la tinción desarrollada por Swett, lo que dio origen a nuevos métodos basados en el de Junqueira.

Así se han desarrollado métodos para medir colágena, colagenasa bacteriana (17,28), para cuantificar diferentes tipos genéticos de colágenas separados en geles de poliacrilamida (1), y en conjunción con la microscopía de polarización se han desarrollado técnicas que permiten diferenciar y localizar a los diferentes tipos genéticos de colágena en cortes histológicos y relacionar la estructura molecular obtenida por difracción de rayos X, con las propiedades anisotrópicas de la colágena teñida con Rojo sirio (4, 50).

## II.2. METODOS NO-INVASIVOS

Los métodos no invasivos, no requieren de una muestra del tejido dañado y estan basados en la medición química o inmunológica de metabolitos y enzimas relacionadas directamente con el metabolismo de la colágena.

De este tipo de exámenes, desafortunadamente, la posibilidad de obtener diagnosticos enzimáticos órgano-específicos, es muy baja, debido a la similitud en los patrones metabólicos de los diferentes desórdenes que cursan con fibrosis, como la artritis reumatoide, la fibrosis hepática y la cicatrización, por lo que el objeto de estos métodos se reduce a medir y monitorear la actividad del proceso fibrótico en el suero o plasma, independientemente de su localización o etiología.

La característica principal de estos métodos es que el metabolito o enzima elegido como monitor debe ser secretado por la célula, ya que si éste es liberado sólo cuando haya necrosis celular, representará mas bien un parámetro de daño o muerte celular que de actividad fibrogénica y obviamente, la cantidad de producto secretado deberá estar en relación directa con el proceso metabólico alterado.

De los métodos no- invasivos, los mas exitosos son:

a) Análisis del péptido de la colágena tipo III.\*

La colágena como muchas otras protefnas es biosintetizada en primera instancia como procolágena, la cual es soluble en condiciones fisiológicas. Al llegar al espacio extracelular, sufre una digestión enzimática específica, perdiendo cerca del 40% de su longitud original, al ser removidos péptidos en ambos extremos de la molécula

El péptido correspondiente al extremo amino terminal, en el caso de la colágena tipo III, pasa al torrente circulatorio conservando su tamaño original y sólo cuando es eliminado en la orina es degradado. Con base en esto, se ha desarrollado un inmunoensayo que permite medir la concentración de este péptido en la sangre, aunque el origen del péptido no está bien establecido, ya que se ha demostrado que la colágena tipo III puede existir como procolágena en el tejido, y el propéptido podría provenir de la destrucción tisular(5, 18).

b) Inmunoensayo para la Prolilhidroxilasa.

Esta enzima participa en las modificaciones postraduccionales que sufre la colágena, hidroxilando ciertos residuos de prolina.

La determinación de actividad enzimática de la prolilhidroxilasa en el suero, no tiene significado alguno, ya que esta enzima se inactiva con el tiempo y además existen inhibidores en el suero.

Sin embargo, la concentración de esta enzima en el suero determinada por radioinmunoensayo con anticuerpos monoclonales, correlaciona con los niveles de actividad enzimática en homogenados de hígado, por lo que este tipo de determinación podría reflejar la actividad fibrogénica en el hígado (5, 18).

c) Medición de Prolina en suero y Láctico en sangre.

Una de las características distintivas del daño hepático en pacientes alcohólicos, comparado con otras enfermedades crónicas del hígado, es la presencia de hiperprolinemia (15).

El mecanismo mediante el cual se desarrolla esta hiperprolinemia es desconocido, pero se ha sugerido que puede estar relacionado con la hiperlactacidemia encontrada en cirróticos alcohólicos, debido al efecto inhibitorio del láctico en la prolil-oxidasa, que es la primera enzima de la vía catabólica de la prolina.(15).

Este aumento de prolina podría producir un aumento en la síntesis de colágena. Aunado a esto, se ha demostrado en cultivos de fibroblastos que el láctico activa a la enzima 4-prolilhidroxilasa (15).

Por otro lado, estudios con voluntarios no-alcohólicos y con buena salud, han demostrado que el nivel de alcohol en sangre posterior a la ingestión de una dosis aguda de etanol, no correlaciona con el aumento en los niveles de estos, por lo que

se ha propuesto que el ácido láctico se eleva en enfermos alcohólicos que tienen daño hepático ya establecido o, en la población susceptible a desarrollar cirrosis.

A pesar de las ventajas de los métodos anteriores para el paciente, el cual ya no tiene que correr el riesgo que implica la toma de una biopsia, la correlación entre los valores determinados de estos metabolitos y la cantidad de colágena depositada no se ha logrado esclarecer claramente, ya que los valores obtenidos son comparados contra estimaciones arbitrarias de la cantidad de colágena en un corte histológico. Debido a que este tipo de "medida" esta sujeta a la subjetividad del patólogo que efectúa el análisis, no es posible establecer una relación cuantitativa entre los valores séricos de estos metabolitos y enzimas y la cantidad de colágena depositada en un tejido. La solución ideal, a este problema, sería efectuar la determinación cuantitativa de la colágena en la misma biopsia.

Actualmente no existen métodos adecuados para cuantificar la concentración de colágena en una biopsia, por lo que, aprovechando las cualidades del Rojo sirio, se decidió desarrollar un método capaz de cuantificar la cantidad de colágena presente en un corte histológico.

### III. OBJETIVO

Desarrollar un micro-método no-destructivo, reproducible, rápido y simple, para determinar la concentración de colágena en muestras de tejidos parenquimatosos, fijados en formalina e incluidos en parafina.

#### IV. MATERIALES Y METODOS

Reactivos empleados: Ver anexo I

Preparación de soluciones: Ver anexo II

Los cortes empleados se obtuvieron de ratas macho (Wistar albinas) de aproximadamente 200 gramos de peso, se mataron por decapitación y con la ayuda de una navaja se obtuvieron secciones de 3 a 4 milímetros de grosor, de hígado, pulmón, bazo, corazón y riñón; fijándolas inmediatamente en una solución de formaldehído al 10% (v:v) en amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.2, conteniendo 0.15 M de cloruro de sodio.

Las muestras se incluyeron en parafina y se efectuaron cortes de aproximadamente 15  $\mu$ m de grosor. Los cortes se desparafinaron en grupos de 10 a 20, incubandolos en la siguiente secuencia de alcoholes: xileno, xileno:etanol (1:1), etanol, etanol:agua (1:1), y agua. Las muestras ya desparafinadas se guardaron en agua destilada a 4 °C y se utilizaron durante el curso de una semana.

#### IV.1. METODO DE TINCION

Se colocaron cortes individuales en tubos de ensaye pequeños (10 x 75 mm) y se cubrieron con 0.2 ml de una solución de ácido pícrico saturado, que contenfa 0.1% de Rojo sirio F3BA y 0.1% de Verde rápido FCF. Los tubos se cubrieron con papel aluminio y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos, en agitación constante.

Terminada la tinción, la mezcla de colorantes se retiró cuidadosamente con una pipeta pasteur y el corte se lavó exhaustivamente con agua bidestilad.

El corte se transfirió a un tubo limpio, se le agregó un mililitro de la solución de hidróxido de sodio-metanol y se agitó suavemente hasta que todo el color fue elufdo del corte (habitualmente en pocos segundos).

Inmediatamente se determinó la absorbencia de esta solución a 540 y 605 nm, correspondiendo estas longitudes de onda a los máximos de absorbencia del Roj sirio F3BA y el Verde rápido FCF, respectivamente.

En este estudio, la absorbencia de las soluciones y las mediciones de densidad óptica se efectuaron en celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz y con la ayuda de un espectrofotómetro Beckman 35.



## IV.2. DETERMINACIONES DE HIDROXIPROLINA Y PROTEINA

Se transfirieron grupos de 3 o 4 cortes (desteñidos) a ampollitas de vidrio, se resuspendieron en 0.5 ml de ácido clorhídrico 6 N, se sellaron al vacío y se hidrolizaron por 18 horas a 104 °C.

Terminada la hidrólisis, el exceso de ácido se removió al vacío, la muestra se resuspendió en 0.5 ml de ácido clorhídrico 2 N, se incubó con Dowex-Norita para remover la humina (34), se neutralizó a pH 5-6 con hidróxido de sodio y se llevó a un volumen final de dos mililitros.

Del hidrolizado se tomaron alcuotas de 0.2 y 0.5 ml para la determinación de hidroxiprolina, por el método de Rojkind y Gonzalez (39), y un mililitro para la determinación de nitrógeno por el método micro-kjeldhal (24).

### IV.2.a. DETERMINACION DE HIDROXIPROLINA

En tubos con tapón de rosca (20 x 150 mm), se colocaron alcuotas del hidrolizado (0.2 y 0.5 ml) y se aforaron a un mililitro con agua bidestilada.

A cada tubo se le añadió un mililitro de la solución de cloramina-T, se agitó durante 30 segundos en un agitador mecánico, a máxima velocidad (vortex), se dejó reposar

durante 20 minutos y se detuvo la reacción con 0.5 ml de la solución de tiosulfato de sodio. A cada tubo se le añadió un mililitro de una solución 1.0 M de hidróxido de sodio y aproximadamente 2.0 g de cloruro de sodio.

Se agregaron 6.0 ml de tolueno, se agitó a máxima velocidad durante 30 segundos, la fase orgánica se desechó, los tubos se taparon y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

Se adicionaron otros 6.0 ml de tolueno, se volvió a agitar vigorosamente, y de la capa orgánica se transfirió un mililitro a un tubo de ensayo limpio (15 x 150 mm). A cada tubo, mientras se agitaba se le adicionaron 4.0 ml del reactivo de Erlich, se permitió que la reacción procediera a temperatura ambiente durante 20 minutos y se determinó la absorbencia de la solución a 560 nm.

Paralelamente se preparó un tubo con agua como control y un estándar de hidroxiprolina (0.1 umoles).

#### IV.2.b. DETERMINACION DE PROTEINA

En matraces de Kjeldhal de 30 ml se colocaron alícuotas de 1 mililitro del hidrolizado. A cada tubo se añadieron 3 ml de la mezcla digestora y unas perlas de vidrio para controlar la

ebullición. Las muestras se mantuvieron en ebullición suave de 8 a 10 horas hasta que la solución tomo una coloración verde esmeralda.

Terminada la digestión la muestra se transfirió al aparato de destilación y se añadieron 5 ml de NaOH 12 N. El destilado se recuperó en un matraz que contenfa una solución de ácido bórico al 4 % y dos gotas de una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno.

El destilado se tituló con una solución valorada de ácido sulfúrico 0.05 N.

### VI.3 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Para corroborarse que todos los tipos genéticos de colágena se teñan con el Rojo sirio F3BA y no con el Verde rápido FCF, se solubilizaron colágenas de biomatrices de pulmón bazo y riñón con pepsina (1) y, a alfcuetas conteniendo 50 a 100 ug de colágena determinada por análisis de hidroxiprolina (39), se les efectuó una electroforesis en geles de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida.

Los geles fueron del tipo discontinuo; el gel concentrador fue 5 % acrilamida, 0.13 % bis-acrilamida, 0.125 M tris pH 6.8 y 0.1 % SDS. El gel separador fue 5 % acrilamida, 0.13 % bis-acrilamida, 0.375 M tris pH 8.8 y 0.1 % SDS.

La electroforesis se efectuó en amortiguador de tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%, pH 8.3. Terminada la electroforesis los geles se trataron de acuerdo al método descrito por Armendariz-Borunda y Rojkind (1), excepto que los geles se tñieron con una mezcla de Rojo sirio F3BA y Verde rápido FCF.

Los geles se destñieron con una mezcla de: metanol:ácido acético:agua (30:7:63, v:v:v), y se les efectuó una densitometría a 540 y 605 nm.

Una vez determinados los colores equivalentes, se procesaron nuevos cortes de tejidos, comparando los resultados al emplear el método químico y el método de tñición.

Para este estudio comparativo, se utilizaron muestras de tejido con un peso aproximado de 250 mg (peso húmedo), para el análisis químico y grupos de 10 a 20 cortes para el método por tñición.

Los cortes empleados fueron obtenidos de cuatro animales.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

El procedimiento aquí reportado, fue aplicado únicamente a tejidos fijados con formaldehído por lo que su aplicación a tejidos fijados con otros agentes requiere de una investigación previa.

Para poder desarrollar un método cuantitativo y estimar la concentración de colágena en un corte histológico, fue necesario referir la cantidad determinada de colágena a un segundo parámetro, igualmente cuantitativo.

Debido a que los cortes empleados estaban fijados en formaldehído, su peso no podía ser empleado como un parámetro al cual referir la cantidad de colágena determinada con el Rojo sirio F3BA . Por lo tanto, se investigó la posibilidad de determinar el contenido protéico de los cortes.

Primeramente, se intentó disolver los cortes con una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%, para después determinar el contenido protéico por el método de Lowry (23), esta técnica se probó tanto a temperatura ambiente como a 37 °C, con agitación constante hasta por 72 horas sin éxito alguno, ya que el tratamiento con formaldehído hace resistentes los cortes a la acción del detergente.

En vista de ésto, se pensó que se podría aplicar a las proteínas no-colagénicas, el mismo principio mediante el cual se pretendía determinar la colágena, es decir teñir estas proteínas con un colorante específico.

El primer colorante empleado fue el azul de coomassie G-250, la elección de este colorante era lógica ya que éste ha sido ampliamente usado para determinar proteínas en solución, como agente activo en el reactivo de Bradford (3), y para teñir proteínas separadas en geles de poliacrilamida (51).

Los primeros experimentos mostraron que al incubar con Rojo sirio F3BA disuelto en una solución de ácido pícrico saturado, los núcleos de las células se teñían ligeramente, lo cual al nivel de detección en que se estaba trabajando ( $\mu\text{g}$ ) era importante impedir.

Para tratar de eliminar esta tinción colateral, se probó incubar previamente con solución de ácido pícrico saturado y con solución de Bouin (ácido pícrico, formaldehído, ácido acético glacial), pero no se logró eliminar del todo.

En las primeras pruebas con el azul de coomassie G-250, se le empleó como reactivo de Bradford. En experimentos de tinción doble, rojo/azul, se encontró que la tinción de los núcleos por el Rojo sirio F3BA ya no era observable y que ambos colorantes mostraban una buena selectividad, ya que las bandas de colágena se teñían solo de rojo y el parénquima de azul.

Para la elución de los colorantes había tres opciones: 1) eluirlos en hidróxido de sodio 0.1 N, ya que en esta solución se eluye fácilmente el Rojo sirio F3BA; 2) eluirlos en metanol, el cual es un disolvente adecuado para el

Azul de coomassie G-250 y, 3) probar una mezcla equivolúmetrica de hidróxido de sodio y metanol absoluto.

Al probar la mezcla NaOH-metanol se observó que el corte se desteña perfectamente, sin embargo, el eluido fue de color rosa, indicando que el coomassie en medio básico cambia de azul a rojo. Esto era un problema, ya que de esta forma no era posible diferenciarlo espectrofotométricamente del Rojo sirio F3BA.

Debido a que el Rojo sirio F3BA no presenta efectos metacromáticos en función del pH, se probó acidificar el eluido con ácido fosfórico, ya que éste es el ácido que lleva el reactivo de Bradford, para que el azul de coomassie G-250 cambiara de nuevo a su forma azul.

De esta forma el espectro mostró dos picos, uno a 540 nm y otro a 625 nm, correspondiendo a los máximos de absorción del Rojo sirio F3BA y del Azul de coomassie G-250, respectivamente.

A continuación, se efectuaron experimentos en serie para determinar el tiempo de incubación óptimo; para esto se emplearon cortes de 15  $\mu$ m de grosor, 30-50 mm de área y medio mililitro de reactivo de Bradford. Estos experimentos mostraron que a los 30 minutos la solución del reactivo de Bradford se decoloraba casi completamente, indicando que la cantidad de colorante en solución podía estar limitando la cantidad unida al corte. Debido a esto, se aumentó a un mililitro la cantidad de colorante y se cambió, cada 30 minutos, por otro mililitro de reactivo fresco.

En la figura 1, se puede observar, que la cantidad de colorante unido a los cortes no muestra una zona de saturación en función del tiempo de incubación, indicando que el colorante forma agregados superiores no-proporcionales al contenido protéico del corte.

Aunque el azul de coomassie G-250 ha sido ampliamente usado en la determinación de proteínas (2) y, para teñir proteínas separadas en geles de poliacrilamida (51), los resultados de este estudio muestran que el colorante presenta un comportamiento poco deseable para estos fines, principalmente, por la formación de agregados no-proporcionales al contenido protéico del corte. Además, las observaciones anteriores coinciden con un estudio efectuado en geles de poliacrilamida (51).

Debido a este comportamiento anormal y al efecto metacromático se decidió cambiar de colorante, y se buscó un colorante que tuviera un máximo de absorción diferente al del Rojo sirio F3BA, que fuera estable en medio básico y soluble, ya fuera en hidróxido de sodio 0.1N en la mezcla NaOH-metanol o en una similar.

El colorante que mostró reunir estos requisitos fue el Verde rápido FCF.

El colorante resultó ser soluble en solución saturada de ácido pícrico al igual que el Rojo sirio F3BA y en experimentos de tinción doble, en los cuales primero se incubaba con Verde rápido FCF, disuelto en una solución de



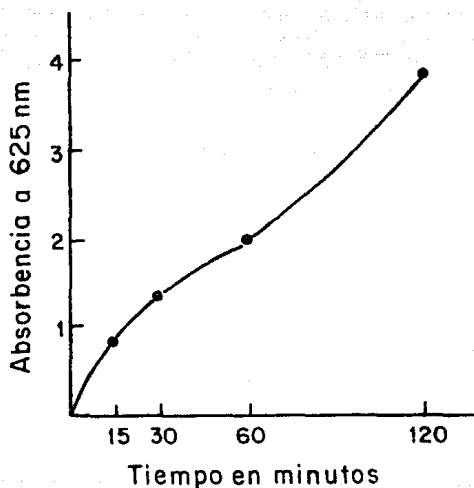


Figura 1. Determinación del tiempo de incubación óptimo para cortes de hígado en reactivo de Bradford (Azul de coomassie G-250).

ácido pícrico saturado al 0.1% y, después con Rojo sirio F3BA en las mismas condiciones, mostró tener una alta selectividad hacia las proteínas no-colagénicas ya que la cantidad de colorante (verde) unido a un mismo corte con y sin Rojo sirio F3BA variaba muy poco.

Además, en experimentos en función del tiempo, la cantidad unida al corte, mostró ser constante después de 30 minutos y la prolongación de las incubaciones hasta por 2 horas, no produjo un incremento significativo en la cantidad de colorante unido al corte.

En experimentos con cortes provenientes del mismo bloque, pero de diferente grosor (5, 10 y 15  $\mu$ m), la cantidad de Verde rápido FCF, al igual que la del Rojo sirio F3BA, mostró ser proporcional al grosor del corte.

De estos cortes, una vez desteñidos, se seleccionaron grupos de 3 o 4 cortes para determinarseles el contenido protéico por el método de micro-Kjeldhal, encontrándose nuevamente que la cantidad unida al corte era proporcional al contenido protéico del corte.

Aunado a ésto, la definición y contraste de estos dos colorantes resultó ser estupenda, en vista de que ambos colorantes eran solubles en la solución de ácido pícrico saturada, se investigó la posibilidad de efectuar una tinción simultánea. Así, grupos de 4 o 5 cortes se incubaron primero con Verde rápido FCF y luego con Rojo sirio F3BA, se eluyeron

los colorantes con la mezcla NaOH-metanol y los cortes se retifieron con una mezcla de ambos colorantes. Puesto que las absorbencias de los colorantes eluidos a 540 y 605 nm, fueron esencialmente idénticas, independientemente del tipo de tinción - secuencial o simultanea -, todos los siguientes experimentos se efectuaron con la mezcla de Verde rápido FCF 0.1% y Rojo sirio F3BA 0.1%, disueltos en la solución de ácido pícrico saturada. Sin embargo, es importante enfatizar que la presencia del ácido pícrico es una condición ineludible, puesto que la interacción del Rojo sirio F3BA, con la colágena, es dependiente de su presencia.

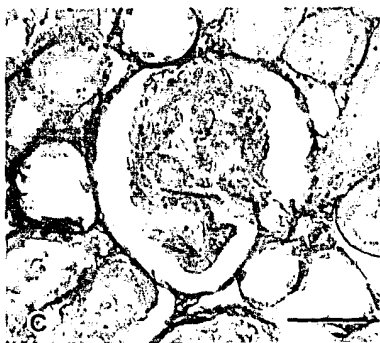
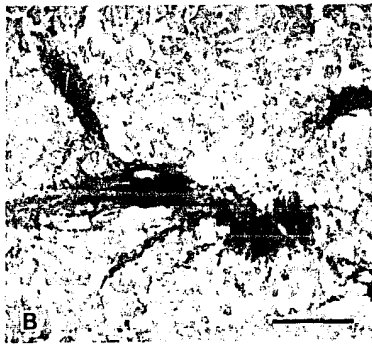
Además, en el caso del hígado y el bazo, se encontró que los núcleos de los hepatocitos y linfocitos se segufan tiñendo de rojo, lo cual se logró evitar preincubando los cortes de estos tejidos, con una solución de Verde rápido FCF al 0.1% en ácido pícrico saturado, durante 15 minutos, previniendo así, el teñido inespecifico del Rojo sirio F3BA.

La figura 2, muestra el patrón de teñido que se obtiene con la mezcla de colorantes en diferentes tejidos.

Las colágenas que se tiñen de rojo, tienen una apariencia fibrilar y los componentes no colagénicos que estan teñidos de verde muestran un patrón más difuso.

Las figuras 2A, 2B Y 2F, muestran que las colágenas intersticiales de los espacios porta, las fibras reticulares del

Figura 2. Fotomicrografías de cortes de 15  $\mu\text{m}$  teñidos con Rojo sirio F3BA 0.1% y Verde rápido FCF 0.1% en solución acuosa saturada de ácido pícrico. Las colágenas tanto intersticiales (A, B y F) como de membrana basal (C, D y E) se tiñen equivalentemente. Amplificaciones finales hígado y bazo x320 pulmón y riñón x160. Barra = 40  $\mu\text{m}$ .



hígado y del bazo y las fibras intersticiales del corazón se tiñen fuertemente de rojo, sugiriendo que las colágenas intersticiales I y III (2, 8, 14, 49), poseen afinidad por el colorante Rojo sirio F3BA.

A su vez, las figuras 2C, 2D, Y 2F, ilustran que las membranas basales del glomerulo, túbulo y bronqueolo (25), también se tiñen con el Rojo sirio F3BA, así como las finas fibrillas del mesangio del riñón (fig. 1C), las cuales se ha sugerido son colágena tipo V (2).

Estos resultados sugieren que al nivel histológico, tanto las colágenas intersticiales como las de membrana basal, se tiñen con el Rojo sirio F3BA, sin embargo, no es posible obtener datos cuantitativos de estas observaciones.

Para poder demostrar que las colágenas no se tiñen significativamente, bajo las condiciones aquí reportadas, con el Verde rápido FCF y que si se tiñen selectivamente con el Rojo sirio F3BA, se efectuaron electroforetogramas con colágena obtenida de riñón bazo y pulmón, ya que se sabe que estos tejidos poseen diferentes proporciones de los distintos tipos genéticos de colágena.

Los geles obtenidos se tiñeron con la mezcla de colorante y una vez desteñidos, se les efectuó una densitometría a 540 y 605 nm, mostrando que todas las colágenas contenían material que absorbía en la región de 540 nm y, que solo en el caso de la región de la cadena alfa 1 de la colágena tipo I, se

observó una leve traza de material que absorbía en la región de 605 nm.

La figura 3 muestra el espectro de absorción del Rojo sirio F3BA. Como se observa, su máximo de absorción está a 540 nm. En la figura 4 se observa que el Verde rápido FCF posee su máximo de absorción a 605 nm, pero tiene un hombro en la región de 540 nm.

En vista de que este "hombro" podría interferir con las lecturas del rojo, era importante determinar su contribución total, a esta longitud de onda (540 nm).

Para determinar esta contribución, se prepararon soluciones de Verde rápido FCF, a diferentes concentraciones, empleando como disolvente la mezcla NaOH-metanol y se les determinó la absorbencia relativa a 540 y 605 nm.

Como se observa, en la figura 5, la absorbencia a 540 nm es proporcional a la obtenida a 605 nm y equivale al  $29.1\% + 0.16$ .

Como el Rojo sirio F3BA no absorbe en la región de 605 nm no interfiere con la determinación de las proteínas no-colagénicas.

En la figura 6, se muestra el espectro de absorción obtenido de un corte de hígado cirrótico teñido con la mezcla de colorantes y eluidos con la mezcla NaOH-metanol. Se puede observar que los picos máximos de absorción tienen una separación adecuada, para permitir la determinación simultánea de las proteínas colagénicas y no-colagénicas.

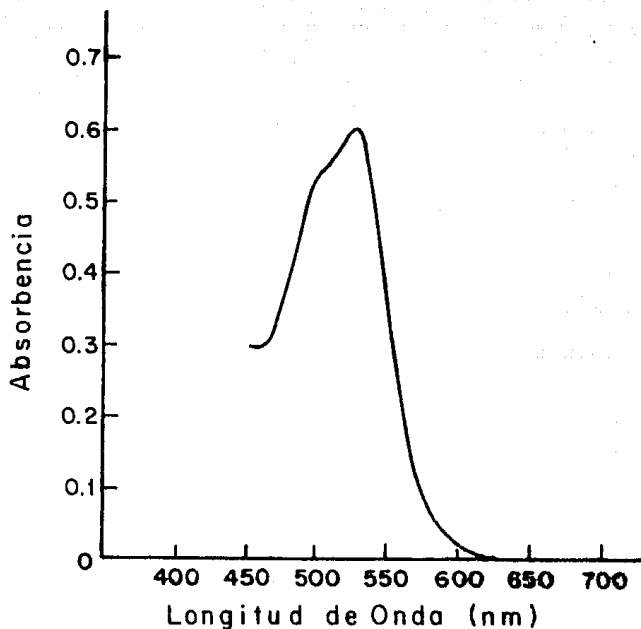


Figura 3. Espectro de absorción del Rojo sirio F3BA eluido de un corte de hígado previamente teñido con Roj sirio F3BA 0.1% en solución acuosa saturada de ácido pícrico. El colorante fue eluido del corte con un mililitro de una mezcla 1:1 (v:v) de NaOH 0.1 N-metanol absoluto.



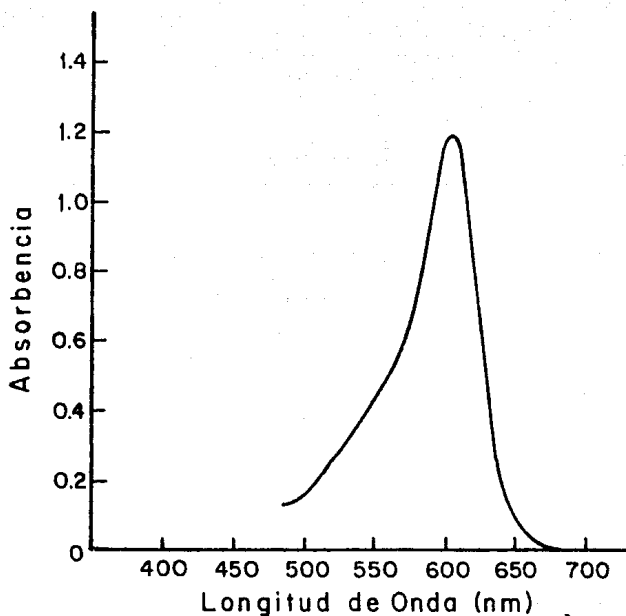


Figura 4. Espectro de absorción del Verde rápido FCF eluido de un corte de hígado previamente teñido con Verde rápido FCF 0.1% en solución acuosa saturada de ácido pícrico. El colorante se eluyó como se describió en la figura 3.

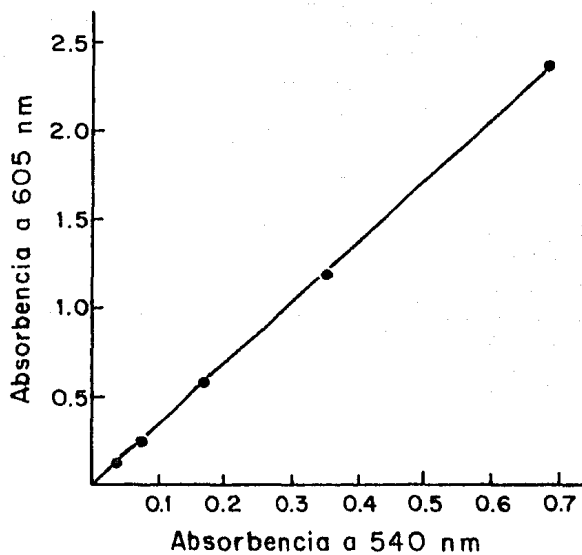


Figura 5. Absorbencia relativa del Verde rápido FCF a 605 y 540 nm en solución NaOH-metanol.

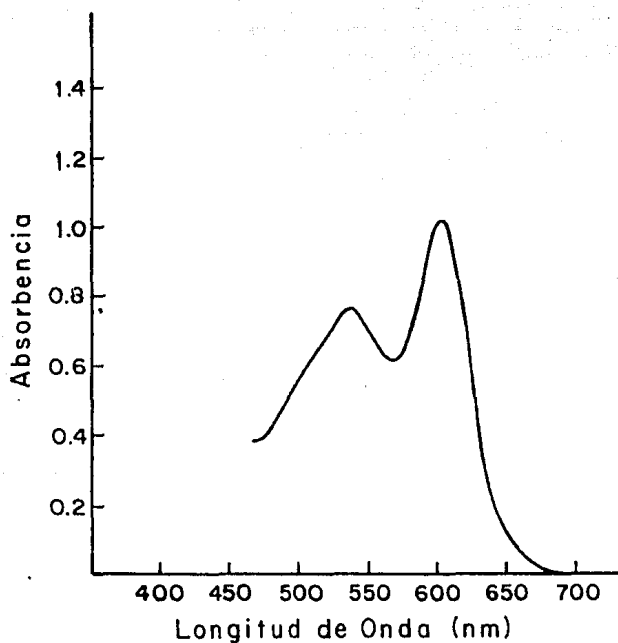


Figura 6. Espectro de absorción de los colorantes eluidos de un corte de hígado cirrótico. El corte fue teñido como se describió en la figura 2 y los colorantes se eluyeron con la mezcla NaOH-metanol como se describió en la figura 3.

Para determinar los colores equivalentes, se relacionaron las absorbencias obtenidas de los colorantes eluidos y las mediciones químicas de colágena y protefna efectuadas con los cortes desteñidos.

Las tablas 1 y 2 muestran los resultados típicos obtenidos con cortes preparados, de un solo animal, usando el mismo bloque de parafina.

En la tabla 1, el color equivalente promedio obtenido para el Verde rápido FCF, fue de  $2.08 \pm 0.18$  y muy parecido para todos los tejidos empleados.

El color equivalente obtenido para el Rojo sirio F3BA, fue aproximadamente 20 veces mas grande que el del Verde rápido FCF y también muy parecido para los 5 tejidos investigados -  $37.8 \pm 2.05$  - (tabla 2).

Promediando los colores equivalentes de varios experimentos, efectuados con cortes diferentes obtenidos de 4 animales, los valores obtenidos fueron:  $38.41 \pm 3.27$  para el Rojo sirio F3BA y  $2.08 \pm 0.2$  para el Verde rápido FCF.

Una vez que los colores equivalentes fueron establecidos, nuevamente se determinó el contenido de protefnas colagénicas y no-colagénicas en cortes de los 5 tejidos, comparando el método de tinción y el método químico.

A continuación, se detallan los pasos seguidos para determinar la concentración de colágena,

Tabla 1. Color equivalente para la protefna no-colagénica determinado por la union del Verde rápido FCF.

Tejido	Absorbencia 605nm	Contenido de protefna µg/corte	Color equivalente
Hfgado	0.740 ± 0.066	355.0	2.06 ± 0.118
Riñón	0.350 ± 0.093	176.5	1.96 ± 0.132
Pulmón	0.221 ± 0.002	99.0	2.22 ± 0.025
Corazón	0.408 ± 0.005	229.0	1.78 ± 0.021
Bazo	0.185 ± 0.001	83.7	2.21 ± 0.120
		Promedio	2.04 ± 0.180

- a) Absorbencia promedio ( $\pm$ D.E) de 5 cortes obtenidos de un animal.  
 A estos cortes se les determinó protefna por el método de micro-Kjeldhal.
- b) A grupos de 3 a 4 cortes desteñidos se les determinó la concentración de protefna por el método de micro-Kjeldhal. Los valores son promedios.
- c) El color equivalente está expresado como Absorbencia a 605nm por miligramo de protefna. Los valores son promedios  $\pm$ D.E.

Tabla 2. Color equivalente para la protefna colagénica determinado por la unión del Rojo sirio F3BA.

Tejido	Absorbencia corregida a 540nm	Contenido de Colágena ug/corte	Color equivalente
Hígado	0.346 ± 0.032	8.59	39.7 ± 1.30
Riñón	0.267 ± 0.049	6.97	37.3 ± 3.63
Pulmón	0.240 ± 0.005	6.63	36.3 ± 0.73
Corazón	0.111 ± 0.011	3.13	35.6 ± 2.05
Bazo	0.181 ± 0.032	4.50	40.2 ± 3.70

- a) Absorbencia promedio ( $\pm$ D.E.) de 5 cortes obtenidos de un animal. Los valores fueron corregidos restandoles el 29.1% de la absorbencia del Verde rápido FCF a 605nm. Estos cortes se emplearon posteriormente para determinar la concentración de colágena por el método de hidroxiprolina
- b) A grupos de 3 a 4 cortes desteñidos se les determinó la concentración de Colágena por el método de hidroxiprolina. Los valores son promedios.
- c) El color equivalente está expresado como Absorbencia corregida a 540nm por miligramo de colagena. Los valores son promedios  $\pm$  D.E.

una vez eluidos los colorantes del corte en cuestión:

1. Se determina la absorbencia a 605 y 540 nm del eluido.
2. Se calcula el 29.1% de la absorbencia a 605 nm. Lo que representa la contribución del Verde rápido FCF a la absorbencia a 540 nm.
3. A la absorbencia determinada a 540 nm, se le resta el valor anterior, (absorbencia corregida).
4. Se divide la absorbencia a 605 nm y la corregida a 540 nm, entre su respectivo color equivalente (2.08 y 37.8), obteniendo así, la cantidad neta de colágena y protefna no-colagénicas en el corte.

La protefna total será la suma de ambas cantidades y, la cantidad de colágena por miligramo de protefna se calcula por medio de una simple regla de tres.

Como se ilustra en la tabla 3, la concentración de colágena estimada por el método de tinción o por el químico, es muy parecida y la desviación estandar es pequeña, así como la dispersión de datos.

Para corroborar el color equivalente obtenido para la colágena, un extracto ácido de tendón de cola de rata (principalmente colágena tipo I), se dializó contra un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, 0.2 M de NaCl, hasta que el pH de la solución de colágena fue el mismo del amortiguador (28).

A esta solución se le determinó la concentración de colágena por el método de la hidroxiprolina (39).

Tabla 3. Determinación de la concentración de Colágena en los cinco tejidos estudiados, comparando el método químico y el de tinción.

Tejido	Método químico <u>µg de Colágena</u> mg de proteína	Método de tinción <u>µg de Colágena</u> mg de proteína
Hígado	5.8 ± 1.1	5.8 ± 0.2
Bazo	17.4 ± 3.3	17.4 ± 1.4
Pulmón	65.0 ± 14.0	59.1 ± 4.3
Riñón	18.9 ± 8.3	17.9 ± 3.7
Corazón	17.0 ± 4.2	16.8 ± 1.9

- a) Los valores son promedios (± D.E.) del análisis por duplicado de tejidos obtenidos de cuatro animales.
- b) Los valores son promedios (± D.E.) de al menos 10 cortes obtenidos de cuatro animales.



Alícuotas de esta solución, cuya concentración de colágena era conocida, se colocaron y dejaron gelificar a 37 C por 30 minutos en placas de 96 posos, para multititulaciones.

Los geles se tiñeron durante 30 minutos, con una solución de Rojo sirio F3BA al 0.1%, en ácido pícrico saturado y se destiñeron como se describió en materiales y métodos.

Los valores obtenidos por los dos métodos, como se aprecia en la tabla 4 fueron, dentro del error experimental, bastante parecidos.

Las observaciones a nivel histológico indican que los tipos genéticos de colágena presentes en el hígado se tiñen perfectamente con el Rojo sirio F3BA. Además, la similitud de los colores equivalentes encontrados para los diferentes tejidos investigados y el conocimiento de su diferente contenido de colágenas intersticiales, endoteliales y de membrana basal, corrobora estas observaciones.

Con base en lo anterior, es posible concluir que dentro del error experimental, todos los diferentes tipos genéticos de colágena unen cantidades similares de Roj sirio F3BA.

Por lo tanto, el método puede ser aplicado para medir el contenido de colágena en tejidos normales y patológicos, independientemente de las proporciones relativas de los diferentes tipos genéticos de colágena que pudieran estar presentes.

Tabla 4. Determinación de Colágena nativa tipo I gelificada a 37 °C, comparando el método químico y el de tinción.

Concentración de Colágena	
Método químico (µg)	Método de tinción (µg)
10	12.7
	12.2
30	33.3
	35.4
40	41.6
	43.7
50	46.3
	51.5

- a) El análisis por hidroxiprolina se efectuó antes de la formación del gel a 37 °C.
- b) La Colágena gelificada se tiñó con Rojo sirio F3BA como se describió en materiales y métodos. Los datos son valores únicos de experimentos por duplicado.

El Verde rápido FCF, bajo las condiciones empleadas en este estudio, mostró ser un buen colorante para determinar proteínas no-colagénicas, ya que además de teñir homogéneamente los cortes, no interfiere con el teñido de las fibras de colágena por el Rojo sirio F3BA y la cantidad de colorante unido al corte es proporcional a su contenido protéico.

El Rojo sirio F3BA, es un colorante azóico, con un peso molecular de 1372 y ha sido extensamente empleado para teñir, selectivamente, colágena en cortes histológicos (4, 10, 11, 12, 13, 30, 46, 52) y para la cuantificación de colágena solubilizada de diferentes tejidos (10). El colorante tiene 4 grupos azo y un coeficiente de extinción muy alto, lo que facilita la detección de pequeñas cantidades de proteína. Como se muestra en este estudio es posible detectar cantidades tan bajas como  $5.76 \pm 0.2$  ug de colágena / mg de proteína, equivalente a 1 mg de colágena por gramo de hígado fresco (45).

El número de moléculas que se une a las colágenas I, II y III es muy constante y se ha estimado que es aproximadamente de 126 (10).

Aunque el mecanismo exacto de interacción del Rojo sirio F3BA con la colágena no se conoce, se ha sugerido que los 6 grupos sulfónicos del colorante, interactúan fuertemente con los grupos cargados positivamente de la proteína (10).

Sin embargo, las diferencias entre el color equivalente reportado para la colagena en solución "10" (1) y el encontrado por nosotros "37.8", indica que otros factores están involucrados, lo que sugiere que tal vez la organización tridimensional de esta protefna sea importante para la interacción con el colorante.

Recientemente se ha demostrado que las colágenas intersticiales, endoteliales y de membrana basal, solubilizadas mediante un tratamiento con pepsina y separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se tiñen idénticamente con el Rojo sirio F3BA (1). Los resultados mostrados en la figura 1 y en las tablas 1, 2 y 4 confirman esta observación.

El presente micrométodo además de tener un contraste visual muy atractivo, es simple, sin complicaciones técnicas, relativamente rápido y no requiere de equipo sofisticado. Además, es posible procesar varias muestras simultáneamente y debido a que no es un método destructivo, un mismo corte, en caso necesario, puede ser teñido varias veces con una gran reproducibilidad.

Las condiciones descritas del teñido y desteñido, trabajan perfectamente con todos los tejidos probados. Para cortes de diferente grosor y área transversal, la cantidad de la solución de colorantes que debe agregarse, el tiempo de tinción, así como el volúmen de la mezcla NaOH-metanol en

la cual los colorantes deben eluirse para su cuantificación, deberá de ajustarse previamente.

Sin embargo, independientemente del tamaño o grosor del corte, una vez ajustadas las condiciones, el método es cuantitativo y reproducible.

Debido a que la naturaleza exacta de la interacción entre los colorantes y las proteínas no es conocida y también a la observación de que los núcleos se tiñen de rojo, es recomendable checar al microscopio los cortes histológicos, mientras se estandarizan las condiciones del método.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método simple, sensible y cuantitativo para la determinación de colágena y de protefnas no-colagénicas en cortes histológicos fijados en formaldehído e incluidos en parafina.

2. El método se basa en la unión selectiva de dos colorantes; Rojo sirio F3BA y Verde rápido FCF, a los componetes colagénicos y no-colagénicos, respectivamente, del corte histológico.

3. Los colorantes son estables en solución saturada acuosa de ácido pícrico y, son eluidos fácilmente en una mezcla equivolométrica de NaOH 0.1 N y metanol absoluto.

4. La tinción de los componentes colagénicos, por el Rojo sirio F3BA, no interfiere con la tinción de los componentes no-colagénicos, por el Verde rápido FCF, lo que permite una tinción simultanea.

5. Los máximos de absorción de los colorantes en la solución NaOH-metanol estan lo suficientemente separados para permitir una determinación cuantitativa de cada uno.

6. La unión de los colorantes, al corte histológico, es

proporcional al contenido de protefmas colagénicas (Rojo sirio F3BA) y no-colagénicas (Verde rápido FCF).

7. Dentro del error experimental, todos los tipos genéticos de colágena unen cantidades similares de Rojo sirio F3BA.

ANEXO I  
LISTA DE REACTIVOS

REACTIVO	MARCA	GRADO
Acetato de Sodio	Baker	Analítico
Acido Acético	Baker	Analítico
Acido Bórico	Baker	Analítico
Acido Cítrico	Baker	Analítico
Acido Clorhídrico	Baker	Analítico
Acido Pírico	Baker	Analítico
Acido Sulfúrico	Baker	Analítico
Acrilamida	Bio-Rad	Electroforesis
Azul de Coomassie	Pierce	I.C. 42655
Azul de Metileno	Merck	I.C. 53015
4-(dimetilamino)- Benzaldehído	Merck	Analítico
Bis-Acrilamida	Bio-Rad	Electroforesis
Carbonato de Sodio Anh.	Baker	Analítico
Cloramina-T	Sigma	Analítico
Cloruro de Amonio	Merck	Analítico
Cloruro de Sodio	Merck	Analítico
Dodecil Sulfato de Sodio	Sigma	Analítico
Dowex Norit-A	Fisher	Analítico
Etanol	Baker	Analítico



REACTIVO	MARCA	GRADO
Formaldehído	Baker	Analítico
Fosfato de Potasio monobásico	Baker	Analítico
Fosfato de Sodio Dibásico	Baker	Analítico
Glicina	Bio-Rad	Electroforésis
Hidroxido de Sodio	Merck	Analítico
Hidroxi prolina	Sigma	Analítico
Metanol	Baker	Analítico
Metilcelosolve	Pierce	Sequanal
Persulfato de Amonio	Bio-Rad	Electroforésis
Rojo de Metilo	Merck	I.C. 13020
Rojo Sirio F3BA	Mobay	I.C. 34780
Sulfato de Cobre	Baker	Analítico
Sulfato de Potasio Dibásico	Baker	Analítico
TEMED	Bio-Rad	Electroforésis
Tiosulfato de Sodio	Merck	Analítico
Tris	Bio-Rad	Electroforésis
Tolueno	Baker	Analítico
Verde Rápido FCF	Allied	I.C. 42053
Xileno	Baker	Analítico

ANEXO II  
PREPARACION DE SOLUCIONES

Amortiguador de ácido cítrico-acetato de sodio, pH 6.0.

En aproximadamente 800 mililitros de agua bidestilada se disuelven, 50 g de ácido cítrico, 120 g de acetato de sodio y 15 ml de ácido acético glacial, se lleva a un volumen cercano a un litro, se ajusta el pH a 6.0 y se afora a un litro. La solución es estable por varios meses a 4 C.

Solución de cloramina-T (sal sódica de la N-cloro-4-metilbencensulfonamida).

Cada 10 ml de esta solución contienen, 0.141 g de cloramina-T, 2.0 ml de agua bidestilada, 3.0 ml de metil celosolve (libre de peróxidos) y 5.0 ml de amortiguador de ácido cítrico/acetato de sodio. Esta solución debe prepararse el mismo día del ensayo.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### Solución de tiosulfato de sodio.

Esta solución se prepara a una concentración de 2.0 M en agua bidestilada y es estable por varios meses.

### Reactivo de Erlich.

10 mililitros de esta solución contienen 0.5 g de p-Dimetilaminobenzaldehído, 9.0 ml de etanol absoluto y 1.0 ml de ácido clorhídrico concentrado. Esta solución debe ser preparada el mismo día del ensayo y protegida de la luz.

### Solución de hidróxido de sodio-metanol

Se mezclan volúmenes iguales de una solución 0.1 N de hidróxido de sodio y de metanol absoluto. La mezcla es estable por una semana a 4 C.

### Reactivo de Bradford.

A 800 ml de agua bidestilada se les añaden 100 mg de Azul de coomassie G-250 disueltos en 50 ml de etanol al 95%, esta solución se agrega lentamente a 100 ml de ácido fosfórico al 85% y se afora a un litro.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Armendáriz-Borunda, J. y Rojkind, M. (1984): A simple quantitative method for collagen typing in tissue samples: its application to human liver with schistosomiasis. Coll. Rel. Res. 4, 35-47.
- 2.- Biempica, L., Morecki, R., Wu, C.H., Giambone, M.A. y Rojkind, M. (1980): Immunocytochemical localization of type B collagen, a component of basement membrane in human liver. Am J. Pathol. 98, 591-602.
- 3.- Bradford, M.M.(1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
- 4.- Dzedzic-Gocławska, A., Rozycka, M. Czyba, J.C., Moutier, R., Lenczowski, S y Ostrowski, K. (1982): Polarizing microscopy of picosirius stained bone sections as a method for analysis of spatial distribution of collagen fibers by optical diffractometry. Bas. Appl. Histochem. 26, 227-239.

- 5.- Fuller, G.C., Nolan J.C., Fink, S. y Rodil, J.V. (1976): Prolylhydroxylase activity in normal and diseased human liver. Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 151, 61-64.
- 6.- Furthmayr, H., Widemann, H., Timpl, R., Odermatt, E. y Engel, J. (1983): Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. Biochem. J. 211, 303-311.
- 7.- Grunbaum, B.W. y Glick, D. (1956): Studies in histochemistry. XLV. Determination of hydroxyproline in microgram amounts of tissue. Arch. Biochem. Biophys. 65, 260- 267.
- 8.- Hahn, E., Wick, G., Pancev, D. y Timpl, R. (1980): Distribution of basement membranes proteins in normal and fibrotic liver: collagen type IV, laminin and fibronectin. Gut. 21, 63-71.
- 9.- Hutterer, F. y Singer, E.J. (1960): A modified method for hydroxyproline determination. Anal. Chem. 32, 556-558.
- 10.- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G. y Brentani, R.R. (1979): A simple and sensitive method for the cuantitative estimation of collagen. Anal. Biochem. 94, 96-99.

- 11.- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G. y Brentani, R.R. (1979): Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem.J.* 11, 447-455.
- 12.- Junqueira, L.C.U., Cossermelli, W. y Brentani, R.R. (1978): Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch. Histol. Jpn.* 41, 267-274.
- 13.- Junqueira, L.C.U., Montes, G.S. y Sanchez, E.M. (1982): The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the picro-sirius polarization method. *Histochemistry* 74, 153-156.
- 14.- Kanomi, H., Sano, J. y Nagai, Y. (1981): Immunohistochemical localization of type I, III and IV (basement membrane) collagens in liver. *Acta Pathol. Jpn.* 31, 973-978.
- 15.- Kershenobich, D., Carcfa-Tsao, G., Alvarez, S.S. y Rojkind, M. (1981): Relationship between blood lactic acid and serum proline in alcoholic liver cirrosis. *Gastroenterology* 80, 1012-1015.

- 16.- Kowaloff, E.M., Phang, J.M., Granger, A.S. y Downing, S.J. (1977): Regulation of proline oxidase activity by lactate. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 5368-5371.
- 17.- Kuttan, R. y Di Ferrante, N. (1980): Sirius-red-collagen interaction: a method for the measurement of collagen and bacterial collagenase activity. Biochem. Int. 1, 445-462.
- 18.- Kuuti-Savolainen, E.R., Ristelli, J., Miettinen, T.A. y Kiviriko, K.I. (1979): Collagen enzymes in serum and hepatic tissue in liver disease. I. Prolil hidroxilase. Eur. J. Clin. Invest. 9, 89-95.
- 19.- Laemmli, V.K. (1970): Cleavage of estructural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227, 680-685.
- 20.- Leach, A.A. (1960): Notes on a modification of the Neuman and Logan method for the determination of hydroxyproline. Biochem.J. 74, 70-71.
- 21.- Lieber, C.S. (1983): Precursor lesions of cirrhosis. Alcohol and alcoholism. 18, 5-20.

- 22.- Lindblad, W.J. y Fuller, G.C. (1983): Hepatic collagenase activity during carbon tetrachloride induced fibrosis. *Fund. Appl. Toxicol.* 3, 34-40.
- 23.- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 24.- Ma, T.S. y Zuazaga, G. (1942): Micro-Kjeldahl determination of nitrogen. A new indicator and an improved rapid method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 14, 80- .
- 25.- Martínez-Hernández, A. y Armenta, S.P. (1983): The basement membrane in pathology. *Lab. Invest.* 48, 656- .
- 26.- Mata, J.M., Kershenovich, D., Villareal, E. y Rojkind, M. (1975): Serum free hidroxiprolina in patients with chronic liver disease. *Gastroenterology.* 68, 1265-1269.
- 27.- Miyada, D.S. y Tappel, A.L. (1956): Colorimetric determination of hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 28, 909-910.
- 28.- Muñoz, M.L., Calderon, J. y Rojkind, M. (1982): The collagenase of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med.* 155, 42- .



- 29.- Neuman, R.E., Logan, M.A. (1950): The determination of hydroxyproline. *J. Biol. Chem.* 184, 299-306.
- 30.- Pérez-Tamayo, R. y Montfort, I. (1980): The susceptibility of hepatic collagen to homologous collagenase in human and experimental cirrhosis of the liver. *Am J. Pathol.* 100, 427-442.
- 31.- Pott, G., Rautberg, J., Voss, B. y Gerlach, U. (1982): Connective tissue components of the normal and fibrotic liver. *Klin. Wochenschr.* 60, 1-7.
- 32.- Puchtler, H., Waldrop, F.S. y Valentine L.S. (1973): Polarization microscopic studies of connective tissue stained with picro-sirius red F3BA. *Beitr. Path. Bd.* 150 174-187.
- 33.- Peterkofsky, B. y Prockop, D.J. (1962): A method for the simultaneous measurement of the radioactivity of proline-<sup>14</sup>C and hydroxyproline-<sup>14</sup>C in biological materials. *Anal. Biochem.* 4, 400-406.
- 34.- Prockop, D.J. y Udenfriend, S. (1960): A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. *Anal. Biochem.* 1, 228-239.

- 35.- Rhode, H., Hahn, E. y Timpl, R. (1978): Radioimmunoassay for aminoterminal procollagen peptides in liver disease. Fresenius Z. Analyt. Chem. 290, 151-152.
- 36.- Rhode, H., Vargas, L., Hahn, E. Kalbfleisch, H., Bruguera, M. y Timpl, R. (1979): Radioimmunoassay for type III procollagen peptide and its application to human liver disease. Eur. J. Clin. Invest. 9, 451-459.
- 37.- Rojkind, M. (1979): Chemistry and biosynthesis of collagen. Bull. on the Rheum. Diseases. 30, 1006-1011.
- 38.- Rojkind, M. y Kershenobich, D. (1981): Hepatic fibrosis. Clin. Gastroenterol. 10, 737-754.
- 39.- Rojkind, M. y Gonzalez, E. (1974): An improved method for determining specific radioactivities of proline- C and hydroxyproline- C in collagen and in non-collagenous proteins. Anal. Biochem. 57, 1-7.
- 40.- Rojkind, M. y Kershenobich, D. (1982): Liver extracellular matrix: Fibrosis and cirrhosis. En: The Liver Annual 2, editado por: I.M.Arias. pp 180-210. Elsevier, Amsterdam.

- 41.- Rojkind, M. y Kershenobich, D. (1982): Fisiopatología y tratamiento de la fibrosis en la cirrosis hepática. Prog. en Hepatol. 5, 37-51.
- 42.- Rojkind, M. y Kershenobich, D. (1983): Liver fibrosis: A dynamic process. Clin. Hepatol. 126-142.
- 43.- Rojkind, M. y Martinez-Palomo, A. (1976): Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73, 539-543.
- 44.- Rojkind, M., Rojkind, M.H. y Cordero-Hernandez, J. (1983): In vivo collagen synthesis and deposition in fibrotic and regenerating rat livers. Collagen Rel. Res. 3, 335-347.
- 45.- Rojkind, M.: The extracellular matrix. En: The Liver Biology and Pathobiology. editado por I.M. Arias, H. Poper, D. Schachter y D.A. Shafritz. Raven Press. New York. (en prensa).
- 46.- Sweat, F., Putschler, H. y Rosenthal, S.I. (1964): Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. Arch. Pathol. 78, 69-72.

- 47.- Switalski, L.M., Rydén, C., Rubin, K., Ljungh, A., Hook, M. y Wadstrom, T. (1983): Binding of fibronectin to staphylococcus strains. *Infect. Immun.* 42, 628-633.
- 48.- Switzer, B.R. y Summer, G.K. (1971): Improved method for hydroxyproline analysis in tissue hydrolizates. *Anal Biochem.* 39, 487-491.
- 49.- Voss, B., Rauterberg, J., Allam, S. y Poot, G. (1980): Distribution of collagen type I and Type III and of two collagenous components of basement membranes in human liver. *Pathol. Res. Pract.* 170, 50-60.
- 50.- Vidal, B.C., Mello, M.L.S. y Pimentel, E.R. (1982): Polarization and microspectrophotometry of sirius red picrosirius and chlorantine fast red aggregates and of their complexes with collagen. *Histochem. J.* 14, 857-878.
- 51.- Wilson, C.M. (1979): Studies and critique of Amido Black 10B, Coomassie Blue R and Fast Green FCF as stains for proteins after polyacrilamide gel electroforesis. *Anal. Biochem.* 96, 263-278.
- 52.- Zambrano, N.Z., Montes, G.S., Shighihara, K.M., Sanchez, E.M., Junqueira, L.C.U. (1982): Collagen arrangement in cartilage. *Acta Anat.* 113, 26-38.