

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS
INCORPORADA A LA U.N.A. DE M.

**HISTOQUIMICA DEL TEJIDO CONJUNTIVO:
PAPEL DE LA SUBSTANCIA FUNDAMENTAL
EN LAS AFINIDADES
TINTOREALES DE LAS FIBRAS CONJUNTIVAS**

Ana María Graciela Jara González

México, D. F.
1954



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

2 folios d. d. t.

611(04)

FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS
INCORPORADA A LA U.N.A. DE M.

**HISTOQUIMICA DEL TEJIDO CONJUNTIVO:
PAPEL DE LA SUBSTANCIA FUNDAMENTAL
EN LAS AFINIDADES
TINTOREALES DE LAS FIBRAS CONJUNTIVAS**

TESIS

Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

presenta

ANA MARIA GRACIELA JARA GONZALEZ

México, D. F.

1954

A. M. D. G.

A MIS PADRES
*con mi cariño e infinito
agradecimiento por su vida de
esfuerzos y bondad.*

Con singular cariño
A FRANCIS.
mi hermano y amigo.

AL SR. D. LUIS M. VEREA

con gratitud y estimación.

Con agradecimiento

AL SR. DR. RUY PEREZ TAMAYO.

*por su dirección y valiosa
ayuda para realizar este
trabajo.*

A MIS MAESTROS

A MIS FAMILIARES Y AMIGOS

A MIS COMPAÑEROS

S U M A R I O

Capítulo I.—INTRODUCCION.

Capítulo II.—MATERIAL Y METODOS

Capítulo III.—RESULTADOS

Capítulo IV.—DISCUSION

Capítulo V.—RESUMEN

BIBLIOGRAFIA

CAPÍTULO I

INTRODUCCION

Desde la iniciación de la Histología como ciencia, las razones por las que distintas estructuras histológicas aceptan determinados tipos de colorantes han sido motivo de discusión e investigación. Se han propuesto numerosas teorías para explicar el mecanismo de tinción o impregnación (afinidades químicas, diferencias de pH, cargas eléctricas opuestas, fenómenos de adsorción, etc.) pero ninguna es satisfactoria para todos los casos, ó todos los distintos métodos histológicos. La nueva rama de la ciencia llamada Histoquímica es la aplicación de principios de análisis químico cualitativo, en la mayoría de los casos, a los métodos histológicos. Por lo tanto el mecanismo por el cual se obtienen coloraciones de substancias ó grupos químicos en Histoquímica es mucho mejor conocido que los que gobiernan las reacciones histológicas clásicas.

Durante la última década se ha despertado un nuevo interés en el tejido conjuntivo. Las publicaciones de Klemperer (1, 2, 3) sobre la patología de las enfermedades que afectan al tejido conjuntivo como un sistema, y que fueron bautizadas por él como "enfermedades de la colágena", han contribuido grandemente a alimentar éste interés; de la misma manera han obrado los nuevos conocimientos sobre el efecto de las hormonas (4) sobre el tejido conjuntivo y sobre la química (5) y la fisiología (6) de la substancia fundamental. Todo esto ha hecho que biólogos, investigadores y médicos empiecen a dudar del dogma de Virchow sobre la patología celular y se preocupen por los distintos aspectos del sistema conjuntivo intersticial.

El tejido conjuntivo constituye, probablemente, una unidad

anatómico-funcional distribuida irregularmente en el organismo, con una fisiología propia y mecanismos de interrelación con otros sistemas y aparatos del organismo, complejos y mal conocidos. En la actualidad, sólo se conocen el efecto de una vitamina (1), tres enzimas (2) y muchas hormonas (3); un aminoácido esencial, la metionina (10), y otro derivado probablemente del anterior, la cistina (11). Aparte de las células que le son propias el tejido conjuntivo está formado por fibras y substancia intercelular. De acuerdo con sus características morfológicas y sus afinidades tinctoriales, las fibras se clasifican en reticulares, colágenas y elásticas. Aún cuando recientes estudios químicos y de microscopio electrónico tiendan a orientar la opinión de los investigadores en el sentido de que las fibras reticulares y las fibras colágenas son indistinguibles (12), para el histólogo, las diferencias que le han servido durante más de un siglo, tanto para la elaboración de conceptos como para su trabajo práctico, siguen ahí y no puede pasárselas por alto. Por el contrario, puede esperarse que mucho se aprenderá acerca de la naturaleza de las fibras conjuntivas cuando se pueda explicar las diferencias clásicas de morfología y coloración.

El tercer componente del tejido conjuntivo es la llamada substancia fundamental. Desde que fue descrita por Fleming (13) hace 78 años, hasta que Bensley (14) y Duran-Reynals (15) hicieron sus investigaciones sobre su distribución y propiedades y los factores de difusión, respectivamente, ha sido olvidada, y hasta negada (Nageotte) (16). Recientemente ha despertado nuevo interés pero es bien poco lo que se sabe de ella. Meyer (17) ha estudiado su composición química y la clasifica como una mucoproteína ó una mezcla de varias mucoproteínas y otras substancias. Clásicamente se sabe que es metacromática con colorantes como el azul de toluidina y la tionina, y que constituye el substratum de algunos factores de difusión como la hialuronidasa.

La interrelación entre los elementos fibrilares y la substancia fundamental del tejido conjuntivo se desconoce. Se ha sugerido (Meyer) (18) que la substancia fundamental actúa como cemento interfibrilar, reuniendo a las fibras reticulares para formar fi-

bras colágenas, y el trabajo reciente de Follis (19) parece apoyar esta opinión, así como la publicación de Highberger, Smith y Gross (20). Sin embargo todavía no es posible hacer ninguna afirmación definitiva.

En un artículo reciente, Ihnen y Pérez Tamayo (21) llamaron la atención al hecho de que, en el fibroadenoma mamario, las fibrillas conjuntivas poseen caracteres tintoreales y morfológicos ambiguos: es decir, fibrillas con los caracteres morfológicos de reticulina mostraban afinidades tintoreales de colágena. Los mismos autores presentaron una tabulación de otras áreas en las que las fibrillas conjuntivas cambian sus características tintoreales sin relación con su morfología. Un factor común a todas estas áreas, incluyendo los fibroadenomas, es la presencia de gran cantidad de substancia fundamental intersticial. Es posible que este cambio de coloración de las fibrillas sea debido a la presencia de substancia fundamental. He creído importante el examinar esta posibilidad como tema para mi tesis profesional.

CAPÍTULO II

MATERIAL

El material empleado consistió de 10 fibroadenomas de glándula mamaria, extraídos a mujeres cuyas edades oscilan entre los 18 y 35 años.

Las características macroscópicas de dichos fibroadenomas se pueden resumir en las siguientes:

Fragmentos de tejido con forma esférica a excepción de 2 que son irregulares, bien encapsulados, y que al corte muestran un color blanco grisáceo ó rosado, consistencia blanda, estructura lobular unos, mientras que otros presentan nodulaciones; dos de ellos dejan escapar un material filante. Su tamaño varía desde 1.3 cm. de diámetro para el más pequeño, mientras que el mayor mide 9 cm. en su eje mayor, siendo la medida común para los restantes la de 2 y 3 cm.

Microscópicamente se observa en ellos deformación de los conductos y acinis mamarios, proliferación del tejido conjuntivo pericanalicular laxo y con fibrillas finas, y en dos de ellos se observa substancia intercelular basófila.

Este material fué escogido para la realización del trabajo debido a que es precisamente en estos casos en los que se han observado las alteraciones morfológicas y tintoriales de las fibras conjuntivas en presencia de cantidades anormalmente abundantes de substancia fundamental. Además Wislocki, Bunting y Dempsey⁽²²⁾, Bunting⁽²³⁾, e Ihnen y Pérez Tamayo⁽²⁴⁾ han demostrado que la metacromasia interfibrilar que se encuentra en el parénquima mamario puede ser prevenida cuando se trata la preparación con hialuronidasa. Podemos, entonces, estudiar la influencia de la fracción metacromática de la substancia fundamental en las afinidades tintoriales de las fibras.

M E T O D O S

FIJACION.

Todos los fibroadenomas se fijaron en una solución de formol en agua al 10% durante 12 horas de donde pasan a una solución de formol al 10% en alcohol etílico de 80° por 8 horas, y por último durante 12 horas en alcohol de 80° con ácido picrico.

INCLUSION.

Una vez efectuada la fijación se sigue la técnica para su inclusión en parafina, que es la siguiente:

| | |
|---|------|
| Alcohol etílico 95° | 60' |
| Alcohol etílico absoluto I | 15' |
| Alcohol etílico absoluto II | 45' |
| Mezcla a partes iguales de etanol absoluto y CHCl ₃ .. | 60' |
| Cloroformo I | 15' |
| Cloroformo II | 105' |
| Parafina-cloroformo en estufa a 58°C. | 40' |
| Parafina en estufa a 58°C. | 30' |

Por último, formación del bloque en parafina-cera.

CORTES.

Una vez hecho el bloque se procede a cortarlo en el microtomo, graduándolo de modo de obtener secciones de 6 micras de espesor, las que se montan en portaobjetos limpios y desengrasados sobre los que previamente se ha extendido una delgada capa de glicerina; una vez hecho esto se llevan los cortes a la estufa a 58° durante 24 horas.

Sobre los cortes así obtenidos se hace actuar la enzima. Para ello se utilizó hialuronidasa testicular liofilizada manufacturada por Wyeth Incorporated bajo el nombre comercial de "WY-DASE", disuelta en una solución tampón de Na₂HPO₄ y ácido cítrico ajustada a un pH aproximado de 5.4

Se hacen 2 soluciones de 750 U. T. R. de hialuronidasa cada una, en 200 c.c. de solución tampón; una de las soluciones se lleva a la ebullición durante 10' con objeto de inactivar la enzima. La serie de cortes de cada caso se divide en 2 lotes que una vez deparafinizados se llevarán: uno dentro de la solución de enzima

activa, y el otro a la inactivada, incubándolos en estufa a 37° durante 21 horas. Después de éste tiempo se lavan en agua destilada procediendo inmediatamente a efectuar las distintas tinciones en los 2 lotes al mismo tiempo.

Los métodos de tinción que se eligieron fueron: el de metacromasia con azul de toluidina, el método de Van Gieson, la hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, el método de la leucofuch-sina de Schiff, el método tricrómico de Masson y la impregnación argéntica de Wilder. La metacromasia con azul de toluidina se utilizó para determinar la presencia y localización de la substancia fundamental en distintas áreas de cada caso, y la efectividad de la enzima en eliminarla. Los demás métodos constituyen los más comunmente usados para tejido conjuntivo en general. A continuación se detallan las técnicas histológicas seguidas.

TINCION.

a).—METODO DE VAN GIESON (2°).

Reactivos:

Solución de fuch-sina ácida al 1%

| | |
|-------------------------------------|-----------|
| Acido picrico | 1.5 gr. |
| Acido clorhídrico concentrado | 0.25 c.c. |
| Agua destilada | 95 c.c. |

La proporción usual es de 5 c.c. de fuch-sina ácida al 1% (50 mg. de colorante) que se agregan a 95 c.c. de solución acuosa saturada de ácido picrico. La adición de 0.25 c.c. de HCl concentrado a la mezcla anterior agudiza la diferenciación, de modo que el músculo aparece puramente amarillo y las fibras colágenas en rojo.

Hematoxilina de Weigert:

Mézclense 100 c. c. de solución fresca al 1% de hematoxilina en alcohol de 95° con 95 c. c. de agua destilada, 1 c. c. de HCl concentrado, y 4 c.c. de la solución de cloruro férrico al 29.1%.

Tinción:

- 1.—Se tiñen los cortes 5 minutos en cloruro férrico ácido de Weigert.

- 2.—Lavar en agua.
- 3.—Teñir durante 5 minutos en la mezcla fuchsina-ácido pícrico.
- 4.—Deshidratar y diferenciar por medio de 2 ó 3 cambios de alcohol de 95° y de 100°.
- 5.—Aclarar con una mezcla de alcohol de 100° y xilol, seguido de 2 ó 3 cambios de xilol puro.
- 6.—Móntense en resina sintética.

b).—HEMATOXILINA FOSFOTUNGSTICA DE MALLORY (**).

Reactivos:

Acido oxálico al 5%
 Yodo al 0.5% en alcohol de 95°
 Tiosulfato de sodio al 0.5%
 Permanganato de potasio al 0.25%
 Solución saturada de $HgCl_2$

Hematoxilina 1 gr.
 Acido fosfotúngstico 20 gr.
 Agua destilada 1000 c.c.

La hematoxilina y el ácido fosfotúngstico se disuelve en los 1000 c.c. de agua destilada. Este reactivo madura en varias semanas.

Tinción:

- 1.—Mordentar 60 minutos en la solución saturada de $HgCl_2$.
- 2.—Poner los cortes 5 minutos en la solución de yodo al 0.5%
- 3.—Solución de tiosulfato de sodio al 0.5% durante 5 minutos.
- 4.—Lavar en agua de la llave.
- 5.—Solución de permanganato de potasio al 0.25% durante 5 minutos.
- 6.—Lavar en agua.
- 7.—Cinco minutos en solución de ácido oxálico al 5%.
- 8.—Lavar en corriente de agua por 1 ó 2 minutos.

9.—Tefir en la hematoxilina fosfotúngstica durante 24 horas.

10.—Deshidratar rápidamente en alcohol de 95° y 100°, aclarar con una mezcla al 50% de un agente deshidratante y xilol, después 2 pasos en xilol. Montarlos en resina.

c).—METACROMASIA CON AZUL DE TOLUIDINA.* (**).

Reactivos:

Solución tampón.

A.—4.2gr. de ácido cítrico en 100 c.c. de agua destilada.

B.—5.9 gr. de citrato de sodio en 100 c.c. de agua destilada.

Mezclar 70 c. c. de la solución A con 30 c. c. de la solución B, con lo que se obtendrá una solución con un pH aproximado de 3.8.

Azul de toluidina 0.05 gr.

Solución tampón 100 c.c.

Tinción:

1.—Se tñen los cortes durante 4 horas en la solución de azul de toluidina.

2.—Lavar rápidamente en agua, montándolos inmediatamente en glicerina.

d).—LEUCOFUCHSINA DE SCHIFF. (**).

Reactivos:

{ Acido peryódico (H_2IO_6) 0.5 gr.

{ Agua destilada 100 c.c.

{ Agua destilada 194 c.c.

{ HCl concentrado 8 c.c.

{ Na_2SO_3 5 gr.

{ Fuchsin básica 2 gr.

{ Agregar y agitar carbón químico ... 1 gr.

Filtrar.

{ $NaHSO_3$ 0.5 gr.

{ Agua destilada 100 c.c.

(*) Este método mostró considerables variaciones en sus resultados de lote a lote de preparaciones y aún de día a día. El que se detalla es el que se siguió al final del trabajo, después de varias pruebas con otras variaciones.

Hematoxilina de Harris:

| | | |
|--------------------------------------|-----|------|
| Hematoxilina | 1 | gr. |
| Alcohol 96° | 15 | c.c. |
| Agua destilada | 100 | c.c. |
| Alumbre de NH ₄ y K | 20 | gr. |
| Oxido rojo de Hg | 0.5 | gr. |
| Acido acético | 10 | c.c. |

Disolver la hematoxilina en alcohol con ayuda de calor. Disolver el alumbre en agua, con ayuda de discreto calor. Mezclar las anteriores soluciones y calentar hasta que se inicie la ebullición. Agregar de un golpe el HgO, cuidando no se derrame la hematoxilina al efectuar ésta operación. Hervir durante 5 minutos y enfriar rápidamente sumergiendo el recipiente que los contiene, en hielo. Agregar ácido acético y filtrar como mínimo 5 veces, cambiando papel filtro frecuentemente.

Tinción:

- 1.—Acido peryódico durante 10 minutos.
- 2.—Lavar en agua destilada.
- 3.—Reactivo de Schiff durante 15 minutos.
- 4.—Lavar en agua destilada.
- 5.—Bisulfito de sodio durante 2 minutos, 3 veces.
- 6.—Lavar en corriente de agua.
- 7.—Hematoxilina de Harris.
- 8.—Virar en agua.
- 9.—Deshidratar por sucesivos cambios en alcohol, xilol-alcohol, xilol, para montarlos después con resina.

e).—TRICROMICO DE MASSON. (??) (Ligeramente Modificado).

Reactivos:

- 1).—Ponceau-fuchsina, de Masson.
Xilidene ponceau al 1% en ácido acético al 1% . 2 partes
Fuchsina ácida al 1% en ácido acético al 1% .. 1 parte

De la mezcla anterior se hace una dilución en el momento de efectuar la tinción. Así que:

| | | |
|-------------------------------|----|------|
| Mezcla fuchsina-ponceau | 10 | c.c. |
| Agua destilada | 90 | c.c. |

- 2).—Solución acuosa al 1% de ácido fosfomolibdico.

3).—Solución al 2% de verde luz en ácido acético al 1%, de la que en el momento de efectuar la tinción se emplea la siguiente dilución:

Solución al 2% de verde luz 10 c.c.
Agua destilada 90 c.c.

Tinción:

- 1.—Teñir durante 5 minutos en hematoxilina de Weigert.
- 2.—Lavar por 5 minutos en corriente de agua.
- 3.—Teñir en la mezcla fuchsina-ponceau durante 5 minutos.
- 4.—Lavar con ácido acético en dilución de 1:500.
- 5.—Mordentar 5 minutos en la solución de ácido fosfomolibdico.
- 6.—Ecurrir y teñir después durante 5 minutos en la solución de verde luz.
- 7.—Lavar con ácido acético al 1:500, y diferenciar durante 1 ó 2 minutos en dicho ácido.
- 8.—Deshidratar como usualmente, pasando por alcohol, xilol-fenol, xilol y montarlos en resina.

f).—IMPREGNACION ARGENTICA DE WILDER. (10).

Reactivos:

NH₄OH al 28% 1 c.c.
AgNO₃ al 10% 10 c.c.
Agua destilada 10 c.c.

En un frasco se pone 1 c.c. del NH₄OH, se le añaden 7 c.c. del AgNO₃ al 10% rápidamente y el resto lentamente hasta un total de 10 c.c., agitando el frasco después de cada adición para disolver las nubes color café del óxido de plata hasta que perdure una ligera opalescencia. Después añádase un volumen igual de agua destilada.

KMnO₄ al 0.5%
Acido oxálico en solución al 5%
Nitrato de uranilo al 1%
Formalina al 10%
Cloruro de oro al 0.2%
Tiosulfato de sodio al 5%

Tinción:

- 1.—Permanganato de potasio durante 2 minutos.
- 2.—Lavar en agua.
- 3.—Acido oxálico durante 2 minutos.
- 4.—Lavar en agua.
- 5.—Nitrato de Uranilo al 1% de Wilder durante 5-10 minutos.
- 6.—Lavar durante 3 minutos en corriente de agua y después con 2 cambios de agua destilada.
- 7.—Poniendo las laminillas horizontales, cubrirlas con el hidróxido de plata amoniacal. Déjese actuar durante 3 minutos, decántese y
- 8.—Lávense rápidamente en agua destilada.
- 9.—Reducir durante 2 minutos con formalina al 10%.
- 10.—Lavar por 3 minutos en corriente de agua.
- 11.—Dejar 2 minutos en cloruro de oro al 0.2%, o hasta coloración violeta.
- 12.—Lavar en agua de la llave.
- 13.—Fijar por 2 minutos en tiosulfato de sodio.
- 14.—Lavar en agua de la llave.
- 15.—Contrastar en agua de la llave durante 2 minutos. Diferenciar en 2 ó 3 cambios de alcohol de 95°.
- 16.—Deshidratar y montar en resina.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

Como era de esperarse, los resultados fueron variables según la técnica utilizada, por lo que se discutirán por separado. Las tablas 1 y 2 muestran un resumen de los resultados para cada caso y para cada técnica.

Método Tricómico de Masson.

En esta tinción se observó que 5 de los casos presentaron una coloración más pálida en los cortes sobre los que se hizo actuar la enzima en comparación con los que se trataron únicamente con enzima inactiva, mientras que 3 la presentaron más oscura. En 4 de los casos se observó una mejor definición de los elementos celulares y fibrilares.

Método de Van Gieson.

Se observó una coloración más pálida en 4 casos y fué más oscura en 5. Por otra parte 6 de ellos se encuentran mejor definidos, por lo que se puede decir que en esta tinción al eliminar la substancia fundamental se obtiene una mejor definición.

Hematoxilina Fosfotúngstica de Mallory.

Cuatro de los casos presentaron coloración más oscura, 1 más pálida, y en 4 no se observó ninguna diferencia.

Leucofuchsina de Schiff.

Se obtiene una coloración más intensa en 4 casos, y más pálida en 5. En este método se puede dar por resultado el obtener una mejor definición ya que 8 de los casos la presentaron.

Impregnación Argéntica de Wilder.

En 7 de los casos se observa mejor definición. En cuanto a la intensidad de la coloración, en 6 fue más pálida y en 1 más oscura. Los cambios de la coloración en este método son más abundantes y quedan expresados en el cuadro número 2.

T A B L A N° 1

| KASSON | VAN GEBSON | MALLORY | SCHEFF | WILSON |
|---|---|------------------------------|--|---|
| I Fibrillas más pálidas. | Fibras más rojas y mejor definidas | No se pueden comparar. | Fibras mucho mejor definidas y coloración más intensa. | Fibras mejor definidas; no hay cambios de color. |
| II Más oscuro, más detalle. | Más detalle y probablemente más oscuro. | Más oscuro y menos detalle. | Coloración más intensa y más detalle. | Coloración con mucho más detalle y menos intensa, pero más negra. |
| III Cortes de diferente espesor. No se comparan. | Más pálida | Coloración más intensa. | Coloración más intensa. | Coloración más intensa. |
| IV Núcleos menos brillantes; conjuntivo pálido. | Fibras pálidas. | No hay diferencia. | No hay diferencia. | Mucho más pálida. |
| V Más pálido y mejor definido. | No hay cambios. | Más oscura. | Más pálida pero mejor definida. | Más pálida, mejor definida y de color más negro. |
| VI Mejor definida y más oscura. | Más bien definidas y más rojas. | No hay cambios. | Más bien definidas y de color rojo oscuro. | Fibrillas mucho mejor definidas pero de color café. |
| VII Más pálido | Más oscuro. | No hay cambios. | Más pálido pero mejor definido. | Más pálido pero más negro y mejor definido. |
| VIII Más oscuro. | Más oscuro y mejor definido. | Más oscuro. | Más pálido pero mejor definido. | Más negro, más pálido y mejor definido. |
| IX No hay cambios. | Más pálido y mejor definido. | No hay cambios. | Más pálido y mejor definido. | Más pálido, mejor definido y menos café. |
| X Más pálido pero mejor definido. | Más pálido y mejor definido. | Más pálido y mejor definido. | Más pálido pero mejor definido. | No hay diferencias. |

Este cuadro se refiere a las observaciones hechas en las preparaciones tratadas con enzima activa en comparación con las tratadas únicamente con enzima inactiva.

T A B L A N º 2

| | MASSON | VAN GIESON | MALLORY | SCHIFF | WILDER |
|--------------------------|--------|------------|---------|--------|--------|
| Palida | 5 | 4 | 1 | 5 | 6 |
| Mejor definida | 4 | 6 | 1 | 8 | 7 |
| Menos detalle | — | — | 1 | — | — |
| Más oscura | 3 | 5 | 4 | 4 | 1 |
| No hay diferencia | 1 | 1 | 4 | 1 | 1 |
| No se comparan | 1 | — | 1 | — | — |
| Más negra | — | — | — | — | 5 |
| Más café | — | — | — | — | 1 |
| No hay cambios de color. | — | — | — | — | 1 |

CAPÍTULO IV

DISCUSION

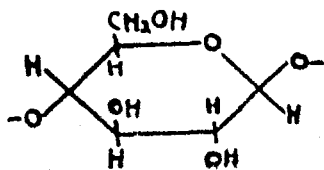
La explicación de por qué tiñen los distintos colorantes en Histología es un problema que está muy lejos de ser resuelto. Se han elaborado numerosas teorías pero ninguna de ellas satisface todos los casos. Es muy probable que cada colorante o cada grupo de colorantes tñan por distintos mecanismos de orden fisico-químico, y no debemos olvidar que la mayoría de los métodos histológicos sólo son útiles después de la fijación, otro proceso cuya naturaleza íntima no se conoce.

Las técnicas histológicas designadas a revelar sustancias o grupos químicos conocidos constituyen la base de la Histoquímica. De hecho, puede decirse que un método histológico cuya naturaleza sea revelada por distintas investigaciones como teniendo una base química que permita la identificación específica o semiespecífica de estructuras químicas pasará a formar parte de la Histoquímica.

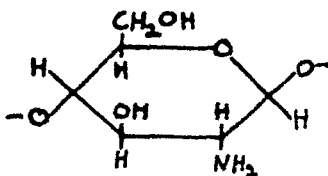
Uno de los métodos utilizados para este trabajo parece tener una explicación química: el método de la leucofuchsin de Schiff. La variante utilizada es la publicada por Mowry y colaboradores. La explicación ⁽³¹⁾ más aceptada es que por medio del ácido peryódico se oxidan los grupos glicoles y OH.- NH₂- vecinales, especialmente los que se encuentran en las porciones terminales de las cadenas, y por lo tanto son más accesibles a los reactivos. Por medio de dicha oxidación, los grupos mencionados antes, pasan a ser grupos aldehído con los que reaccionará el reactivo de Schiff. Se prefiere el ácido peryódico a otros oxidantes, porque no causa una posterior oxidación de los grupos aldehído obtenidos, aún des-

pués de prolongada acción sobre ellos; cuando dicha oxidación se verifica no es posible la identificación de los grupos aldehído pues se encuentran destruidos.

Las estructuras 1-2 glicol y amino-alcohol se encuentran, respectivamente, en los carbohidratos y hexosamina; de ahí que se haya empleado este método para la demostración histológica de mucina.

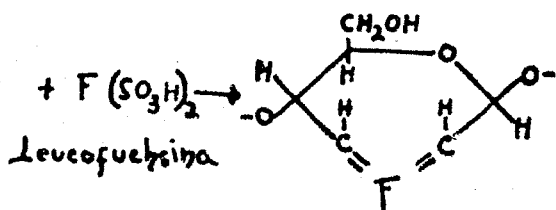
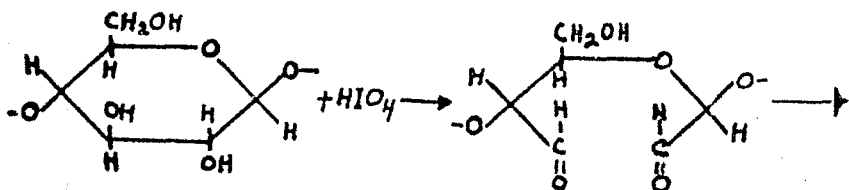


glucosa



glucosamina

La reacción del ácido peryódico con una molécula de un polisacárido se puede ilustrar del modo siguiente:



Se hace notar que el nuevo compuesto de color, rojo, formado por la unión de la leucofuchsin con el dialdehído, debe el color a esa unión y no como antes se suponía a la fuchsin reoxidada.

De acuerdo con Hotchkiss, resultados positivos se obtendrán con cualquier sustancia que llene las siguientes condiciones:

a).—Que contenga el grupo 1-2 glicol o el equivalente amino o alquil-amino derivado, o el producto de oxidación CHOH-CO.

b).—Que el material reaccionante no se difunda fuera del tejido durante la fijación.

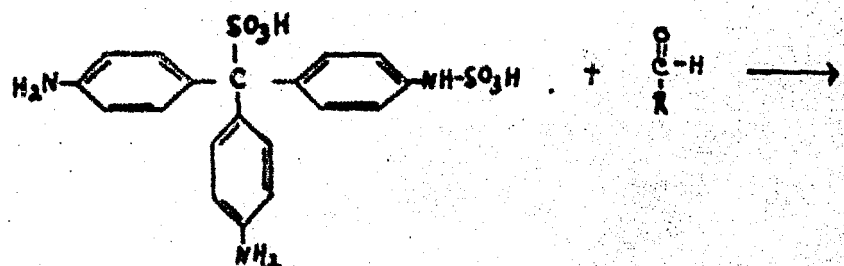
c).—Que se obtenga un producto de oxidación que no sea difusible.

d).—Que esté presente en suficiente concentración para dar una coloración visible.

Las sustancias en las que los grupos glicol 1-2 se encuentran substituidos no darán una reacción positiva.

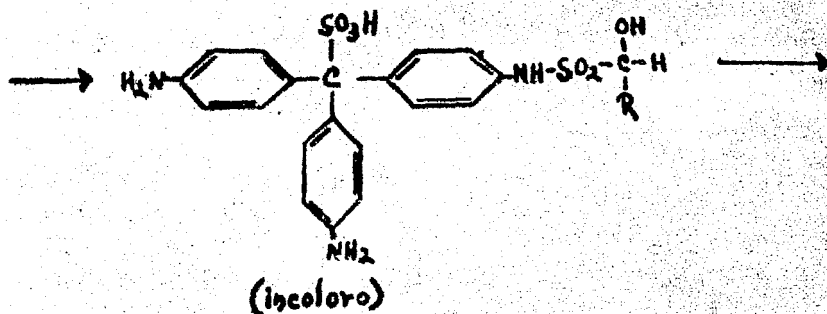
Aunque el mecanismo de la reacción no es conocido aún con certeza, fue considerado por Wieland y Scheuing ⁽³²⁾ ser de la naturaleza de una adición seguida por una condensación.

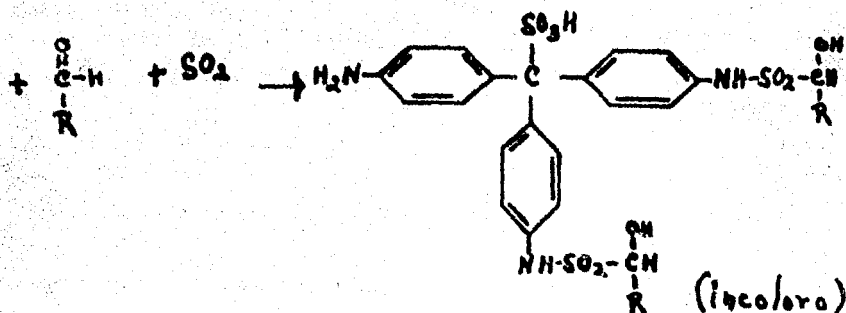
Así se tiene que:



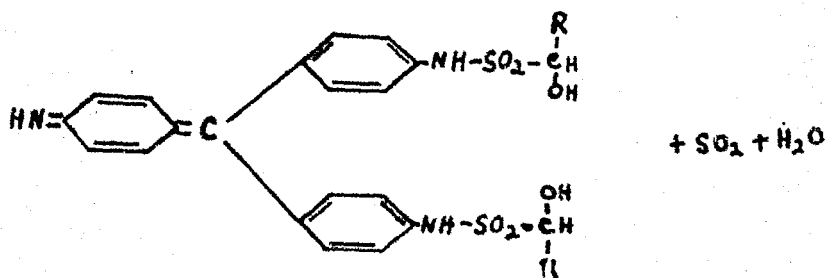
Leucofuchsina

Aldehído





Tiene lugar después un rearrreglo molecular desprendiendo SO_2 y H_2O y reconstituyéndose la unión quinónica, que es el cromóforo, y por lo tanto el resultante será un compuesto coloreado:



Como lo ha demostrado Foot (53) los métodos de impregnación argéntica no son propiamente tinciones sino precipitaciones de las partículas de plata metálica en las distintas estructuras orgánicas mediante la reducción del hidróxido de plata amoniacal, ya sea por los grupos aldehído que se encuentran libres en dichas estructuras, ó por medio de un agente externo como formalina, hidroquinona, etc.

La reacción general del hidróxido de plata amoniacal con los aldehidos es la siguiente: (54)



Lison (55) ha insistido en el hecho de que algunas sustancias (ácido ascórbico, polifenoles, aldehidos, ácido úrico, etc.) tienen la

propiedad de reducir las soluciones de plata bajo ciertas condiciones. Esta es la llamada reacción "argentafin" que se usa en la caracterización de sustancias reductoras. Debe ser distinguida de la obtenida por sustancias reductoras externas, como sucede en el método empleado en el presente trabajo, y que es la llamada "argirofilia".

El azul de toluidina se ha utilizado para obtener una tinción metacromática que nos indique la presencia y localización de los ácidos mucopolisacáridos que, en estado de alta polimerización, forman parte de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo. La especificidad de esta reacción ha sido muy discutida desde que Lison (²⁰) sugirió que revelaba específicamente radicales sulfato. Sylvén (²¹) también considera a esta reacción como específica para radicales sulfato pero distingue dos formas de metacromasia: la "verdadera" y la "falsa". Esto se debe a que la tinción con azul de toluidina da un color rosado (metacromasia) antes de iniciar la deshidratación, pero en cuanto el tejido metacromático se pone en contacto con alcohol, la mayor parte de la coloración rosada se transforma instantáneamente en color azul, quedando solamente algunas áreas que mantienen el color rosado. La primera forma de metacromasia es la llamada "falsa" y la segunda es la "verdadera". Este autor dice que solamente la metacromasia "verdadera" indica la presencia de radicales sulfato. Por otro lado existe la opinión de que la metacromasia es un fenómeno inespecífico, de muy poco valor y que no indica más que la presencia de distintos grados de polimerización.

Para explicar el fenómeno de la metacromasia (²²) se tienen que considerar las propiedades tanto del tejido como del colorante. De acuerdo con la nomenclatura de Ehrlich el tinte de la solución del colorante es el tinte ortocromático; el tinte con el que aparecen teñidos ciertos elementos tisulares es el metacromático; las sustancias que poseen la propiedad de teñirse en el tono metacromático son las sustancias cromotrópicas (o metacromáticas). De acuerdo con Lison la metacromasia es debida a que una forma tautómera del colorante (imina) se encuentra en lábil equilibrio con la forma ortocromática. Este equilibrio es desplazado hacia la forma metacromática por las sustancias cromotrópicas. Michaelis y Granick, por otra parte, han formulado la teoría de que la forma metacromática del colorante es un simple dímero (o polímero) de la forma ortocromática (monómero). Esto se ha comprobado midiendo la absorción máxima a distintas longitudes de onda. Factores que favorecen la polimerización son: altas concentraciones, baja temperatura, relativamente altos valores de pH, un medio acuoso, y especialmente la presencia de grupos ácidos adecuada-

mente colocados ($-\text{COOH}$, $-\text{OPO}(\text{OH})_2$, $-\text{OSO}_3\text{OH}$) que sean capaces de unirse a la molécula del polímero del colorante por sus grupos amina. Dichas sustancias con múltiples grupos ácidos son las cromotrópicas. Hasta ahora las únicas sustancias conocidas en el tejido animal que presenten metacromasia "verdadera" han sido los ésteres sulfúricos como en la heparina, y los ácidos condroitín— y mucoítín-sulfúrico.

Se ha demostrado repetidamente que la metacromasia de la sustancia fundamental del tejido conjuntivo obtenida por medio del azul de toluidina puede ser efectivamente prevenida si la preparación se trata previamente con hialuronidasa. Esta enzima (o grupo de enzimas) se obtiene de gran número de fuentes, aunque las más conocidas son la testicular y la estreptocócica, y probablemente ejerce su efecto depolimerizando los ácidos mucopolisacáridos de la sustancia fundamental. Estos ácidos son principalmente el ácido hialurónico y en menor cantidad, el ácido condroitín-sulfúrico.

Se utilizó en este trabajo la metacromasia con azul de toluidina después de la aplicación de enzimas activa e inactiva, exclusivamente para verificar que la enzima ha sido efectiva; es decir, que hemos removido del corte la capacidad para producir metacromasia. De aquí hemos inferido que al depolimerizarse los ácidos mucopolisacáridos de la sustancia fundamental, se han vuelto solubles y han dejado el corte. Es posible que, junto con los ácidos mucopolisacáridos, se pierdan otras sustancias poco conocidas, posiblemente de naturaleza proteica, que también participan en el fenómeno de la metacromasia. De cualquier manera, el propósito de eliminar cuando menos la parte o partes de la sustancia fundamental que producen la metacromasia se ha cumplido, y es de creer que los resultados obtenidos pueden atribuirse, cuando menos en parte, a la ausencia de la sustancia fundamental libre.

Los demás métodos utilizados en este estudio han resistido todos los intentos de explicación.

Recientemente algunos autores han atribuido las afinidades tintoriales de las fibras conjuntivas, por lo menos en parte, al contenido o relaciones de estas fibras de sustancia fundamental. Hardesty (39), en 1931, observó que el tejido conjuntivo que forma el centro de la cresta del gallo altera su morfología y sus características tintoriales cuando se deposita la sustancia fundamental bajo la influencia de estrógenos. Observaciones semejantes fueron hechas por Szirmai (40) en 1949 y Schiller, Benditt y Dorffman, (41) en

1952. Otras áreas anatómicas han mostrado el mismo fenómeno, tales como la piel sexual del macaco (Aykroyd y Zuckerman) (42), en 1938: Durán-Reynals, Bunting y van Wagenen (43), 1950) el estroma intralobular de la mama (Loeb y Simpson (44), 1938) y los fibroadenomas mamarios (Ihnen y Pérez Tamayo (45). Todos estos autores observaron que mientras mayor es el depósito de sustancia fundamental interfibrilar, mayor es el número de fibrillas finas, de morfología semejante a las reticulares pero que adquieren o mantienen una coloración idéntica a la mostrada por las fibras colágenas.

Gersh (46) sugiere que las fibras reticulares en tejidos químicamente fijados se tiñen porque la sustancia fundamental se ha trasladado hacia ellas. Bradfield y Kodicek (47), basados en experimentos con cuyos escorbúticos cuyos tejidos fueron tratados con colagenasa mostraron que aún cuando las fibras fueron digeridas por la enzima, dejaron una vaina que reacciona con la leucofuchsi-na de Schiff. Estos mismos autores sugieren que la argirofilia del retículo se debe a su contenido en polisacáridos.

Los dos grupos de observaciones mencionados en los párrafos anteriores sugieren que algunas propiedades tintoreales de las fibras conjuntivas se deben a su contenido en, o a sus relaciones con los ácidos mucopolisacáridos de la sustancia fundamental. Esto parece una hipótesis atractiva pero los resultados del presente trabajo, considerando las limitaciones del material, está en oposición. El análisis de los resultados muestra que algunos de los métodos utilizados han mostrado variaciones de poca o ninguna importancia (métodos de Masson y de Mallory) y que los demás métodos se alteran sólo en lo que respecta a la definición de las fibrillas. Si la sustancia fundamental fuera responsable de las propiedades tintoreales de las fibras conjuntivas hubiera sido de esperarse que algunos de los métodos utilizados después del tratamiento con enzima activa e inactiva, se hubieran modificado radicalmente, pero hemos visto que esto no fue así. Meyer (48) y Robb-Smith (49) han sugerido que quizá la sustancia fundamental constituye el cemento que reúne a las fibras reticulares para formar haces colágenos, y el experimento de Follis (50), que obtuvo metacromasia en fibras colá-

genas después de tratarlas con tripsina apoya esta sugestión. Además, los experimentos de Highberger (21) y colaboradores, que han reconstituido fibrillas de periodicidad semejante a la de la colágena en el microscopio electrónico (de 620 a 640 Å), agregando mucopolisacáridos a fibras disueltas por la acción del ácido acético, también sugiere que la presencia de substancia fundamental actúa de alguna manera en la constitución de las fibrillas conjuntivas. La enzima utilizada en el presente trabajo afecta solamente la substancia fundamental interfibrilar o "libre". Todavía queda, pues, la posibilidad de que la substancia fundamental intrafibrilar o "fija", si es que existe, participe en el mecanismo de la coloración por medio de los métodos utilizados.

CAPÍTULO V

R E S U M E N

En este trabajo se investiga la posible participación de la substancia fundamental en las afinidades tintoreales de las fibras del tejido conjuntivo. Con este propósito se utilizan diez fibroadenomas mamarios, fijados en formol al 10% y teñidos, después de exponerlos a hialuronidasa activa e inactiva, con los siguientes métodos histológicos: tricrómico de Masson, Van Gieson, leucofuchsin de Schiff, hematoxilina fosfotúngstica de Mallory y método de impregnación argéntica de Wilder. Para determinar el efecto de la enzima se utilizó la metacromasia con azul de toluidina.

Los resultados indican que la substancia fundamental sólo participa moderadamente en tres de los métodos utilizados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—KLEMPERER, P.: POLLACK, A. D. y BAHER, G.: Diffuse Collagen Disease. Acute disseminated lupus erythematosus and diffuse scleroderma. *J. A. M. A.* 119:331, 1942.
- 2.—KLEMPERER, P.: The Concept of Collagen Diseases. *Am. J. Path.* 26: 505, 1950.
- 3.—KLEMPERER, P.: The role of the connective tissue in diseases of the cardiovascular system. *Bull. New York Acad. Med.* 28: 204, 1951.
- 4.—DURAN-REYNALS, F., ED.: The Ground Substance of the Mesenchyme and the Hyaluronidase. *Ann. New York Acad. Sci.* 52:1006, 1950.
- 5.—MEYER, K. Y RAPPORT, M.M.: The mucopolysaccharides of the ground substance of the connective tissue. *Science* 113: 596, 1951.
- 6.—Gersh, I.: Ground substance and the plasticity of connective tissues. *Harvey Lectures, Serie XLV*, 1952.
- 7.—WOLBACH, S. B.: Controlled formation of collagen and reticulum a study of the source of intercellular substance in recovery from experimental scorbutus. *Am. J. Path.* 9: 689, 1933.
- 8.—Véase referencia 4.
- 9.—Véase referencia 4.
- 10.—PEREZ TAMAYO, R. e Iñnen, M: The effect of methionine in experimental wound healing. A morphologic study. *Am. J. Path.* 29: 233, 1953.
- 11.—WILLIAMSON, M. B., McCARTHY, T. H. y FROMM, H. J.: Relation of protein nutrition to the healing of experimental wounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 77: 302, 1951.
- 12.—GROSS, J: The structure and biological reactivity of connective tissue.

- en Ashford, M., Ed.: The Musculoskeletal System. McMillan, 1952.
- 13.—FLEMMING, W.: Anatomie und Histologie des Bindegewebes. Arch. f. mikr Anat. 12: 391 1876.
 - 14.—BENSLEY, S. H.: On the presence, properties and distribution of the intercellular ground substance of loose connective tissue. Anat. Rec. 60: 93, 1934.
 - 15.—DURAN-REYNALS, F.: Tissue permeability and the spreading factors in infection. Bact. Rev. 6: 197, 1942.
 - 16.—NAGEOTTE, J.: There is no amorphous substance in subcutaneous connective tissue. Soc. Biol. Paris. Compt. Rend. 87: 147, 1922.
 - 17.—MEYER, K.: The chemistry and biology of mucopolysaccharides and glycoproteins. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 6: 91, 1938.
 - 18.—MEYER, K.: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. Physiol. Rev. 27:335, 1947.
 - 19.—FOLLIS, R. H., Jr.: Effect of proteolytic enzymes and fixation on metachromasia of skin collagen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 76:272, 1951.
 - 20.—HIGHBERGER, J. H., GROSS, J. y SCHMITT, F. O.: The interaction of mucoprotein with soluble collagen: an electron microscope study. Proc. Nat. Acad. Sci. 37:286, 1951.
 - 21.—IHNEN, M. y PEREZ TAMAYO, R.: Breast Stroma. Morphological and histochemical study. Arch. Path. 56: 46, 1953.
 - 22.—WISLOCKI, G. B., BUNTING, H. y DEMPSEY, E. W.: Metachromasia in mammalian tissues and its relationship to mucopolysaccharides. Am. J. Anat. 81:1, 1947.
 - 23.—BUNTING, H.: The distribution of mucopolysaccharides in the organism.
Véase en referencia 4.
 - 24.—Véase referencia 21.
 - 25.—LILLIE, R. D.: Histological Technique, Ed. Blakiston, 1948, pp. 190.
 - 26.—Véase referencia 25, pp. 62.

- 27.—GOMORI, G.: *Microscopic Histochemistry*, Ed. Univ. Chicago 1952, pp. 73.
- 28.—MOWRY, R. W. y RAYMOND BANGLE, Jr.: *Histochemically demonstrable glycogen in the human heart*, *Am. J. Path.* 27:612, 1951.
- 29.—Véase referencia 25, pp. 196.
- 30.—Véase referencia 25, pp. 187.
- 31.—EVERSON PEARSE, A. G.: *Histochemistry*, Ed. Churchill, Ltd. 1953, pp. 135.
- 32.—Citado en referencia 31, pp. 191.
- 33.—FOOT, N. C.: *Chemical contrasts between collagenous and reticular connective tissue*, *Am. J. Path.* 4:525, 1928.
- 34.—FIESER, LOUIS F. y FIESER, MARY.: *Química Orgánica*, Ed. Atlante, 1948, pp. 200.
- 35.—LISON, L.: Citado en referencia 27, pp. 58.
- 36.—LISON, L.: *Histochemie animale*, Ed. Masson et Cie., 1936.
- 37.—SYLVEN, B.: *Ueber das vorkommen von Hochmolekulären Esterschwechelsäuren in Granulationsgewebe und bei der Epithelregeneration*, *Acta Chir. Scand.* 86 (Supl.), 1, 1941.
- 38.—Véase referencia 27, pp. 69-71.
- 39.—HARDESTY, M.: *The structural basis for the response of the brown leghorn fowl to the sex hormones*, *Am. J. Anat.* 47:277, 1931.
- 40.—SZIRMAI, J. A.: *The effect of testosterone propionate on the connective tissue of the head appendices and the skin of the capon*, *Anat. Rec.* 105:337, 1949.
- 41.—SCHILLER, S., BENDITT, E. P. y DORFFMAN, A.: *Effect of testosterone and cortisone on the hexosamine content and metachromasia of chick combs*, *Endocrinol.* 50:504, 1952.
- 42.—AYKROD, O. E. y ZUCKERMAN, S.: *Factors in sexual-skin edema*, *J. Physiol.* 94:13, 1938.

- 43.—DURAN-REYNALS, F., Bunting, H. y van WAGENEN, G.: en referencia 4, pp. 1006.
- 44.—Véase referencia 21.
- 45.—Véase referencia 21.
- 46.—GERSH, I.: Some Functional Considerations of Ground Substance of Connective Tissues. Ed. Ragan, C.: Trans. Second Conf. Conn. Tissues. 1951, pp. 25.
- 47.—BRADFIELD, J. R. G. y KODICEK, E.: Abnormal Mucopolysaccharides and "precollagen" in vitamin C. deficient skin wounds. Biochem. J. 49: XVII, 1951.
- 48.—Véase referencia 18.
- 49.—ROBB-SMITH, A.: citado por Ham, A. W.: Histology, Ed. Lippincott Co., 1953, pp. 107.
- 50.—Véase referencia 19.
- 51.—Véase referencia 20.