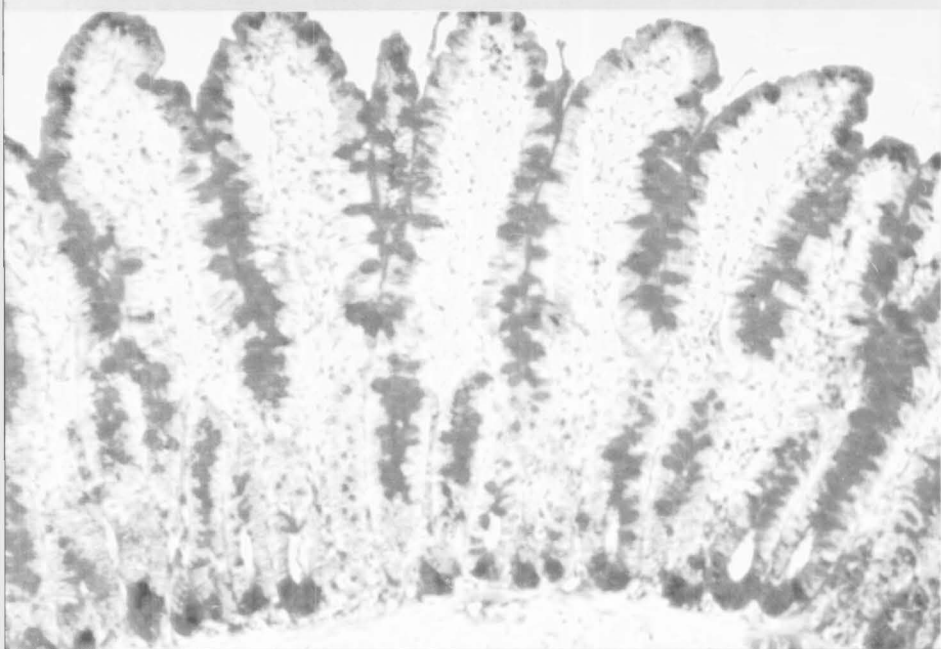


M

anual de Técnicas de Histoquímica Básica

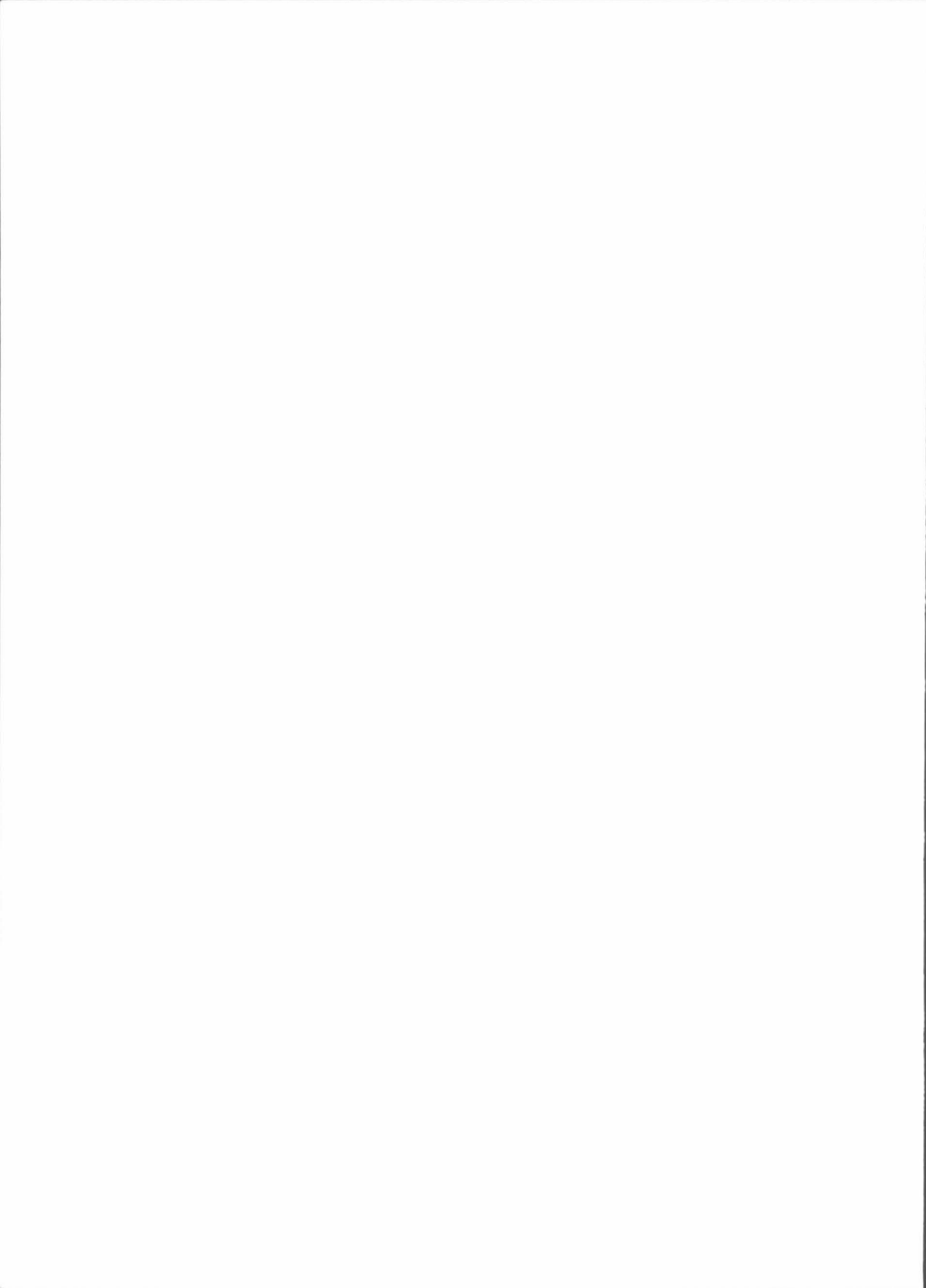


Dr. Claudio Montero

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
SAN LUIS POTOSI, S.L.P., México, 1997**

MANUAL DE TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA BÁSICA

Claudio Montero



MANUAL DE TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA BÁSICA

Claudio Montero

Departamento de Anatomía Patológica
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí

San Luis Potosí, S.L.P., México, 1997

© Derechos Reservados *by*
Claudio Montero

© Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Medicina

ISBN 968-7674-27-X
0542-97032-A0132

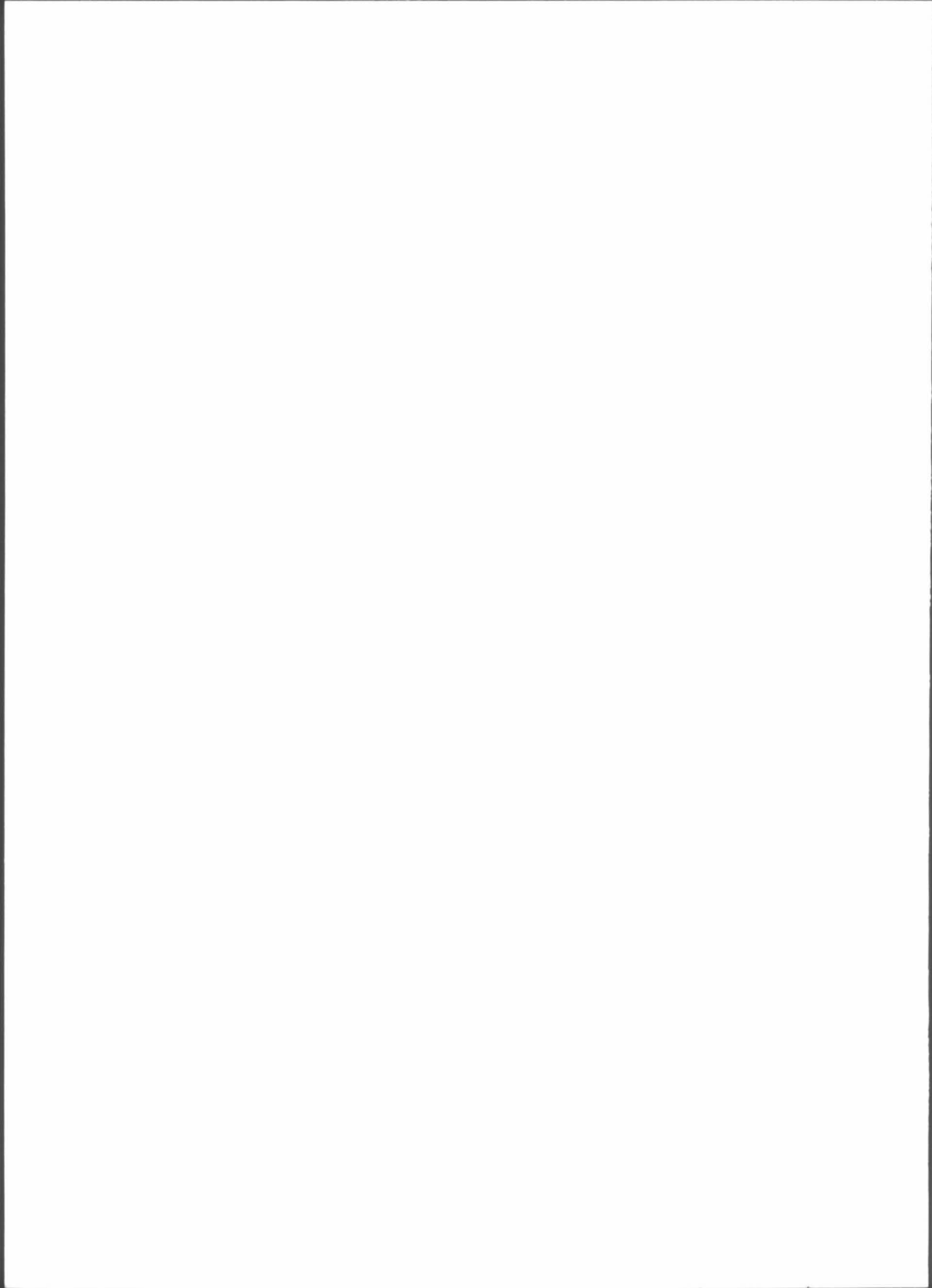
Editorial Universitaria Potosina

Indice

	Pág.
Dedicatorias	7
Presentación	9
Prólogo	13
Tema 1.- La fijación en Histoquímica.	15
Tema 2.- Métodos diversos de procesado de los tejidos para la microscopía óptica.	23
Tema 3.- Algunos conceptos básicos sobre colorantes.	31
Tema 4.- Mecanismo de unión colorante-sustrato.	37
Tema 5.- Unión indirecta del colorante con los tejidos.	41
Tema 6.- Introducción a la histoquímica de los carbohidratos.	46
Tema 7.- Métodos histoquímicos para carbohidratos.	53
Tema 8.- Colorantes catiónicos. Azul alciano. Metacromasia. Métodos de las diaminas de Spicer. Método del hierro coloidal. Tratamientos enzimáticos en histoquímica de carbohidratos.	62
Tema 9.- Marcadores de unidades sacáridas. Las lectinas.	72
Tema 10.- Introducción a la histoquímica de proteínas.	79
Tema 11.- La demostración histoquímica de algunos grupos funcionales de proteínas.	84
Tema 12.- Estructura química de los ácidos nucleicos.	94
Tema 13.- Histoquímica de los ácidos nucleicos.	98
Tema 14.- Introducción a la histoquímica de los lípidos.	103
Tema 15.- Métodos histoquímicos e histofísicos para la demos-	

tración de lípidos.	108
Tema 16.- Introducción a la histoquímica de las enzimas.	114
Tema 17.- Histoquímica de las hidrolasas.	122
Tema 18.- Histoquímica de las oxidoreductasas.	126

*A mi esposa Estela y a mis hijos
Claudio, Estela, Rogelio, Carlos y David Alberto*



Presentación

Bienvenido este Manual de Técnicas de Histoquímica Básica del Dr. Claudio Montero, Profesor Investigador en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Bienvenido este libro que es como un respiro ante la avalancha de publicaciones acerca de la estructura de la célula y de la miríada de interacciones de los genes, las cuales parecería que quisieran desplazar a las técnicas básicas de la microscopía óptica. Y no es así. Técnicas de coloración y de reacción histoquímica siguen siendo base para el enfoque inicial del estudio normal y anatomopatológico del ser humano, y la pauta para proponer estudios más elaborados y complejos. Bienvenido este Manual, cuyo contenido es de interés y de utilidad para muy diversos sectores de las ciencias de la salud. Desde luego, para los departamentos de Anatomía Patológica, para aquellos que no cuentan todavía con un laboratorio de histoquímica y para los que ya lo tienen. Para los laboratorios de histología y para las escuelas y laboratorios de químicos farmacobiólogos.

Bienvenida esta publicación porque su utilidad, a más de cubrir los aspectos prácticos de estas técnicas (que van desde el procesado básico de los tejidos para su estudio adecuado), está diseñado para propiciar el desarrollo de talleres de histoquímica, como bien lo hace resaltar el autor en el prólogo, donde los alumnos realicen sus propios estudios sobre cortes histológicos y los observen al microscopio.

CLAUDIO MONTERO

Bienvenido este Manual que constituye un modelo de planeación y de organización, en donde todos los temas se desarrollan de manera lógica y concreta, diría yo con una nítida claridad (como deben ser las buenas preparaciones histológicas).

Bienvenido este Manual que, aparte de sus bondades científicas, tiene la rara virtud de estar escrito con toda la propiedad del idioma, lo cual facilita grandemente las labores de revisión editorial.

Bienvenidas a la Facultad de Medicina y a la Universidad Autónoma de San Luis Potosí este tipo de publicaciones.

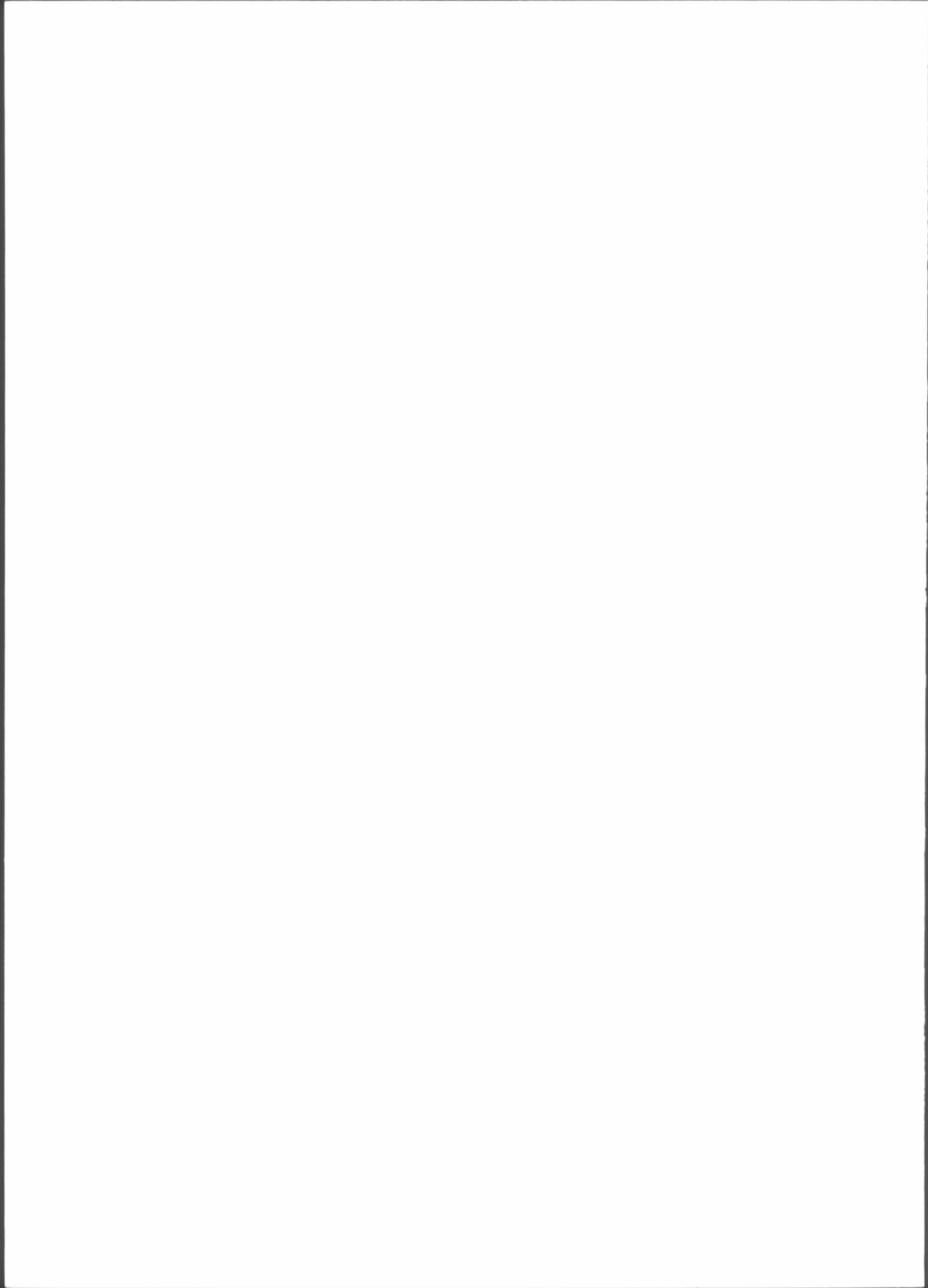
Agosto de 1997

Dr. Enrique Torre López.

Jefe de la Oficina Editorial de
la Facultad de Medicina.

Dr. Claudio Montero

El doctor Claudio Montero, originario de Cádiz, España, pionero de la Histoquímica, fue Jefe de Laboratorio de esta disciplina en la Facultad de Medicina de Sevilla. Aparte de sus valiosas contribuciones en el mundo hispano-americano y en el ámbito internacional, el Dr. Montero tiene estrechos lazos con México y con San Luis Potosí. De 1965 a 1968, llevó a cabo el curso de Anatomía Patológica, para profesores, con el maestro Isaac Costero, en el Instituto Nacional de Cardiología de la ciudad de México. En San Luis Potosí, en 1991, después de impartir un curso de 18 días, inauguró el laboratorio de Histoquímica en el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto. Posteriormente, regresó en 1994 para aprovechar un año de Beca, a nivel de excelencia, del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología. A partir de 1996, el Dr. Montero se ha incorporado nuevamente a esta institución, como profesor investigador y como maestro de los cursos de pre y posgrado en Anatomía Patológica.



Prólogo

El presente Manual de técnicas histoquímicas está escrito con el ánimo de que sirva de ayuda a los posibles alumnos de un curso de iniciación en la Histoquímica, algo abandonada en estos últimos tiempos ante el alud de cursos y cursillos que actualmente se dedican a la difusión de las técnicas de Biología Molecular.

Sin pretender en lo más mínimo quitar su extraordinaria importancia a la contribución de esas modernas técnicas al enorme incremento de nuestros conocimientos sobre la Biología Celular, queremos, sin embargo, hacer hincapié en el hecho de que muchos de éstos últimos adelantos se deben a técnicas íntimamente relacionadas con las histoquímicas.

Queremos añadir, además, que el conocimiento de los distintos apartados de la Histoquímica y sus técnicas básicas han contribuido y pueden seguir contribuyendo, per se, al conocimiento íntimo de los mecanismos de multitud de reacciones, tanto a nivel celular como a niveles subcelulares. Podríamos poner como ejemplo de lo que decimos algunos de nuestros propios trabajos publicados, pero no es este el momento indicado para ello.

En los temas que componen el presente libro empezamos desarrollando someramente el problema de la fijación, que tanta importancia tiene para la correcta interpretación de los resultados de cualquier técnica histoquímica.

Aunque la coloración histológica no se considere, estrictamente, una

reacción histoquímica, incluimos tres temas donde se dan nociones muy elementales sobre colorantes y sobre las formas de unión entre un colorante y los cortes tisulares con que se trabaja usualmente.

Los temas propiamente histoquímicos incluyen a los métodos, para demostración de carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, para finalizar con técnicas para la demostración de algunas actividades enzimáticas.

Queremos recalcar lo de actividades enzimáticas, porque con esas técnicas histoquímicas no se demuestra la enzima como tal proteína que es, sino su actividad catalítica sobre un sustrato específico, combinado con uno o varios pasos más para obtener una reacción coloreada.

Esperamos que este libro sirva de ayuda a lo que me parece más importante: la realización de talleres de Histoquímica, donde el alumno realice sus propias reacciones sobre cortes histológicos y vea luego el resultado al microscopio.

Quiero agradecer a la Dra. Beatriz Velásquez, directora de la Facultad de Medicina, el apoyo y el respaldo que siempre ha prestado a este proyecto, así como las facilidades que tanto ella como el Dr. Reynaldo Falcón Escobedo, jefe del departamento de Anatomía Patológica, han puesto a mi disposición para su realización. Agradezco también al Sr. Alejandro Palafox Echevarría su extraordinaria colaboración en la solución de los problemas computacionales que se presentaron.

Y, finalmente, no quiero terminar este preámbulo sin antes referirme con profundo afecto a mi maestro, el Dr. Manuel Gutiérrez, doctor en Medicina y Cirugía y doctor en Química por la Universidad de Cádiz, nuestra tierra natal común. El me inició en la Histoquímica y aun ahora me sigue enseñando a través de la distancia. He admirado siempre, y sigo aun admirando, sus extraordinarios conocimientos químicos, con los cuales me ha ayudado a mejorar este librito y por ello le digo ¡GRACIAS!

San Luis Potosí, S.L.P., México, 1997.

Claudio Montero

Tema 1. Fijación

Introducción

Definición.- Con la palabra fijación queremos indicar, en nuestro campo de la Histología y de la Anatomía Patológica, el proceso mediante el cual detenemos la destrucción de las células, que se produciría ineludiblemente en las biopsias y, en general, en cualquier muestra de material orgánico, una vez separado del organismo a que pertenecía, por la acción de las enzimas liberadas por los lisosomas destruidos. Pero, como dice Baker (1963), eso sería solo conservación; con la fijación se pretende además mantener la ordenación espacial tridimensional de células y fibras, que constituyen el tejido orgánico, lo más parecida posible a su disposición original: este es un ideal difícil de conseguir y, a lo sumo, solo podemos decir que quizás nos acerquemos algo a ello con algunos procedimientos.

Los reactivos químicos utilizados para fijar las células y fibras en la disposición en que estaban originariamente se llaman, pues, "fijadores" y, en principio, los podemos clasificar en *simples* y *mixtos o mezclas*. Iniciaremos este estudio con los fijadores simples, entre los cuales el *formaldehído* ocupa un lugar preferente, debido a su uso predominante en los laboratorios de Anatomía Patológica de todo el mundo.

Fijadores simples

Los fijadores se pueden clasificar, por el efecto que producen en los tejidos sobre los que actúan, en dos grupos: fijadores *no coagulantes* y *coagulantes*. Entre los primeros podemos incluir, por orden de impor-

tancia: el *formaldehido*, que ya hemos mencionado, el *tetróxido de osmio*, que tuvo, y aún conserva, gran importancia en la fijación para microscopía electrónica, el *bicromato potásico* y el *ácido acético*.

La lista de los fijadores primarios coagulantes es más extensa e incluye el *metanol*, *etanol*, *acetona*, *ácido nítrico*, *ácido clorhídrico*, *ácido tricloroacético*, *ácido picrico*, *cloruro mercurico*, *ácido cloroplatinico* y el *trióxido de cromo*.

Dos observaciones son, aquí, pertinentes por la importancia que tienen en la práctica diaria del laboratorio: 1. La solución saturada de ácido picrico se prepara añadiendo, a una cantidad fija de agua destilada, porciones de ácido picrico y agitando, hasta que ya no se disuelva más y quede una pequeña porción de este reactivo, en el fondo de la botella. 2. El etanol absoluto, debido a su gran avidez por el agua, absorbe la humedad ambiental, por lo que una forma cómoda de conservarlo seco es añadir, una cantidad de sulfato sódico anhidro, que absorbe hasta 10 moléculas de agua por molécula de la sal, agitar y dejar decantar. Con una capa de sulfato sódico anhidro de uno o dos centímetros de alta, aproximadamente, en el fondo de la botella, es suficiente.

Mezclas fijadoras

Con la idea de contrarrestar los efectos de retracción de los fijadores coagulantes, manteniendo sus restantes cualidades conservadoras, los histólogos idearon, principalmente en la segunda mitad del siglo XIX y principios del XX, una serie de combinaciones de fijadores de uno y otro grupo. Entre dichas mezclas, mencionaremos la de Clarke (1851), compuesta por etanol y ácido acético, a la que Carnoy (1886) añadió cloroformo que, por cierto, no contribuye apenas a cambiar el resultado final, según Baker (1963). Otra mezcla, que es muy popular en los laboratorios de Histología, es la de Zenker (1894), que está compuesta por cloruro mercurico-dicromato potásico y ácido acético, la de Bouin (1897), compuesta por formalina-ácido picrico-ácido acético y, más recientemente, la mezcla llamada B-5, que ha resultado de gran utilidad,

según algunos autores, para la demostración de inmunoglobulinas en inmunohistoquímica.

De acuerdo con Lillie (1965), el B-5 consiste en una solución saturada de cloruro mercúrico (6%), a la que en el momento de usar se añade formaldehído en la proporción del 10% v/v. Para evitar el pH demasiado ácido, Lillie le añadió acetato sódico anhidro para que quedara, en la solución final, al 1,25%, lo que da un pH final de 5,8 a 6,0. Un problema que hay que tener en cuenta con este fijador, como con todos los fijadores que contengan mercurio, es el precipitado cristalino de color negro, que se observa, por lo general, en los cortes de material fijado con estos fijadores. Dicho precipitado, sin embargo, puede quitarse sometiendo los cortes, antes de su tinción, a un tratamiento con solución de Lugol, de 5 a 10 minutos, seguido por un tratamiento con solución de tiosulfato de sodio al 5% de 1 a 5 minutos, para decolorar los cortes, que quedan de color tabaco después del tratamiento con la solución de Lugol.

Existe una larga serie de mezclas fijadoras, cada una con sus defectos y virtudes y el interesado puede consultar textos como el de Baker (1963), pero en los laboratorios de Anatomía Patológica rara vez se usan.

Formaldehído

Este aldehído, el primero de la serie alifática, se obtiene a partir del metanol y se presenta en solución acuosa, a la máxima concentración que se consigue durante su fabricación (37 a 38% p/v). Esto quiere decir que en un litro de formaldehído comercial hay aproximadamente 370 gramos de formaldehído. Este aldehído fue introducido por Blum (1893), como un reactivo "endurecedor" de los tejidos orgánicos, esto es, como un fijador. Desde entonces se ha convertido en el fijador más popular en los laboratorios de Histología y Anatomía Patológica de todo el mundo.

La concentración a la que normalmente se usa este aldehído es al 10% acuoso, volumen a volumen (v/v). Esto se hace añadiendo a 10 ml de la

solución de formaldehído del comercio, 90 ml de agua destilada o del amortiguador que se desee. Si tenemos en cuenta que en 10 ml de la solución comercial de formaldehído hay a lo sumo 3,7 gramos de formaldehído, podemos hablar de una solución al 3,7% p/v. Estas consideraciones deberían tenerse siempre en cuenta y evitar así muchos de los errores que, a veces, se cometen, tanto en la descripción de los métodos, en los artículos científicos, como en la preparación de las diluciones del formaldehído.

El formaldehído se usa en la práctica, como hemos dicho, a la concentración del 10% v/v en agua destilada o en amortiguador fosfatos de Sorensen, 0,05 a 0,1 M y pH 7,0. El tiempo de fijación es muy variable, sin embargo, el tiempo que se recomienda siempre es el de 24 horas. En cuanto a la temperatura, se ha usado casi siempre la ambiental y durante algún tiempo se recomendó la del refrigerador (4°C aprox.), pensando que así se "moderaba" la acción del fijador, lo que permitiría unos mejores resultados de las técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, la acción del formaldehído en estas condiciones está muy debilitada, ya que, como bien se sabe, las reacciones químicas se enlentecen con el descenso de la temperatura. En nuestra experiencia, el empleo de la temperatura de 37°C mejora la fijación y por tanto la conservación de las estructuras histológicas, pero afecta excesivamente a la demostración de antígenos proteicos, aunque no la impide totalmente en algunos casos.

Hay que tener en cuenta que en el proceso de inclusión en parafina, que se sigue de rutina en nuestros laboratorios, los fenómenos de retracción y otros artefactos que alteran la estructura histológica se deben en su mayor parte a la deshidratación en etanoles de concentración ascendente, al aclaramiento en xileno y a la inclusión en parafina a 60°C. La fijación más energética a 37°C durante 24 horas, como acabamos de decir, permite al tejido poder soportar en mejores condiciones los pasos subsiguientes. Aunque existen una serie de trabajos que estudian estos factores, no se tiene, sin embargo, un conocimiento completo al respecto.

Respecto a la influencia del pH en la fijación, queremos mencionar el trabajo de Berod, *et al* (1981), en el que se perfundía formaldehído amortiguado a pH alrededor de la neutralidad, para luego continuar con formaldehído a pH más alto hasta casi alcanzar un pH de 10. Según estos autores, el pH del lado alcalino favorece la formación de puentes metilénicos entre los grupos -OH del fijador y los aminos de las proteínas tisulares.

Uno de las mejores actualizaciones del tema de la fijación con el formaldehído está en el trabajo de Fox, *et al* (1985).

Para mayor precisión en la preparación de la solución fijadora de formaldehído es preferible partir del paraformaldehído. La forma de preparación es como sigue:

1. Añadir 20 gramos de paraformaldehído a 150 cc de agua destilada agitando con una varilla de vidrio.
2. Calentar a 60° hasta obtener una solución clara, añadiendo, si es necesario, varias gotas de NaOH al 2,5%, siempre con agitación. Filtrar y dejar enfriar.
3. Completar hasta 1000 cc con amortiguador fosfato preparado como se indica a continuación:

NaH ₂ PO ₄ · 1 H ₂ O	1.80 g
Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O	23.25 g
NaCl	5.00 g
Agua destilada csp	1000.00 ml

La presión osmótica del fijador así preparado es de 440 mOsM y el pH deberá estar alrededor de 7.3 o 7.4.

El tiempo de fijación debe ser, para piezas de no más de 5 mm de espesor, de 2 a 4 horas a temperatura ambiente, seguido de un lavado con agua destilada de 18 a 24 horas de duración, a temperatura ambiente. Finalmente, se procede a la deshidratación e inclusión en parafina de la forma usual.

Acción "Fijadora" del Formaldehido

En general se piensa que el formaldehido actúa reaccionando con grupos laterales de proteínas, principalmente aminos, creando enlaces cruzados entre restos de cadenas diferentes, de la misma o de distintas proteínas, lo que produciría el efecto de fijar las moléculas en estados diferentes a como estaban en el ser vivo. Es obvio que el fijador produce alteraciones en la arquitectura general de la célula y de las macromoléculas que la componen; sin embargo, puesto que muchas proteínas pueden ser demostradas por su actividad enzimática, aún en tejidos fijados y que, por otro lado, pueden ser demostradas como tales proteínas antigénicas por su reacción con el anticuerpo correspondiente, es evidente que, en muchos casos, las alteraciones no pueden ser muy importantes.

Glutaraldehido

Desde que Sabatini, *et al* (1963) introdujeron una serie de aldehidos, entre ellos el glutaraldehido, ha sido éste el que ha obtenido una amplia aceptación en los laboratorios de microscopía electrónica. Su capacidad de fijación es mayor que la del formaldehido pero, por ello mismo, su penetración es más lenta. Las primeras micras fijadas por el glutaraldehido, lo son en tal forma que parecen constituir una barrera para la ulterior penetración del fijador. Esto exige que las piezas de biopsia que se van a fijar deban ser sumamente pequeñas (1 mm cúbico aproximadamente).

La solución que se usa normalmente suele ser al 2,5% v/v, aunque diluciones al 1% v/v y al 4% v/v se usan también con frecuencia. Hay varias formas de presentación comercial, pero una muy corriente es al 25%, de la que se pueden obtener las diluciones requeridas disolviendo en amortiguador cacodilato, que es uno de los más empleados.

Su molécula, constituida por cinco átomos de carbono con dos grupos carbonilos, uno en cada extremo, lo convierten en un ligado bifuncional, que se ha empleado también para marcar macromoléculas proteicas con

otras proteínas más pequeñas. Cada uno de los carbonilos se une a sendos grupos aminos, dando lugar a la formación de bases de Schiff y enlazando ambas moléculas entre sí.

Methacarn

Finalmente, queremos referirnos a una mezcla que sustituye al CARNOY con ventaja; es el llamado METHACARN por sus autoras (Puchtler, *et al*, 1970). Estas investigadoras, aprovechando que el metanol sube la temperatura máxima que puede soportar un tejido sin retraerse, modifican la fórmula del CARNOY así: 6 partes de metanol, 3 partes de cloroformo y 1 parte de ácido acético. La deshidratación la realizan después con metanol y metilbenzoato y los resultados han sido excelentes en nuestra experiencia. Nosotros hemos observado que el metilbenzoato puede ser sustituido por el benceno o por el tolueno con buenos resultados.

Bibliografía

- BAKER, J. R. *Principles of Biological Microtechnique. A study of fixation and Dyeing.* Methuen Co. Ltd, London, 1963.
- BEROD, A., HARTMAN, BK., PUJOL, JF. *Importance of fixation in immunohistochemistry: Use of formaldehyde solutions at variable pH for the localization of tyrosine-hydroxylase.* J. Histochem. Cytochem. 29: 844-850, 1981.
- BLUM, f. *Der Formaldehyde als Hartungsmittel.* Z. Weiss. Mikrosk. 10: 314-315, 1893.
- BOUIN, P. *Etude sur l'évolution normale et l'involution du tube seminifera.* Arch. d'Anat. micr. 1: 225-339, 1897.
- CARNOY, J. B. *Etude comparée du noyau et du protoplasme.* La Cellule 3: 1-103, 1886.
- CLARKE, J. L. *Researches into the structure of the spinal cord.* Phil. Trans. Roy. Soc London. 141/II: 607-621, 1851.
- FOX, C.H., JOHNSON, F.B., WHITING, J., ROLLER, P.P. *Formaldehyde fixation.* J. Histochem. Cytochem. 33: 845-853, 1985.
- LILLIE, R. D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* McGraw-Hill Co., 3^a ed., New York, 1965.
- PUCHTLER, H., WALDROP, F.S., MELOAN, S.N., TERRY, M., CONNER, H.M. *Methacarn (Methanol-Carnoy) fixation. Practical and theoretical considerations.* Histochemie 21: 97-116, 1970.
- SABATINI, D.D., BENSCH, K., BARNETT, R.J. *Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation.* J. Cell Biol. 17: 19-58, 1963.
- ZENKER, K. *Chromkali-sublimat-Eisessig als Fixierungsmittel.* Münch. Med. Wochen. 41: 537-538, 1894.

Tema 2. Métodos diversos de procesado de los tejidos para la microscopía óptica

Introducción

Todos los métodos de procesado de los tejidos orgánicos tienen un fin similar, a saber, la producción de cortes finos, entre 5 y 6 micras, de superficies paralelas, que se puedan adherir a los portaobjetos de cristal, que se emplean en microtécnica, a fin de proceder después a su coloración o a las reacciones histoquímicas que se describen en capítulos posteriores.

En los albores de la técnica histológica se usaban predominantemente cortes obtenidos en los llamados microtomos de congelación. Dichos cortes se manipulaban, dejándolos flotar en agua destilada y cambiándolos de un pocillo a otro mediante agujas de histología.

Con la introducción de los procedimientos de inclusión en parafina resulta más fácil obtener cortes finos en los microtomos especialmente diseñados para ello.

Modernamente se han introducido nuevos procedimientos de congelación y corte en microtomos de congelación llamados criomicrotomos, que alcanzan los -25°C , así como otros procedimientos cuya lista se da a continuación.

1. Congelación con CO_2 y manipulación de cortes flotantes.
2. Fijación e inclusión en parafinas o plásticos.
3. Congelación, liofilización e inclusión en parafinas o plásticos.
4. Criosustitución.
5. Congelación y corte en el criomicrotomo.

1.- Congelación con CO₂ y manipulación de cortes flotantes en agua destilada

Esta forma de congelación de tejidos se usa actualmente sólo para la demostración de grasas neutras y, en mucha menor escala, para la realización de técnicas de impregnación argéntica.

Los cortes, una vez obtenidos en el microtomo de congelación (con CO₂), se dejan flotar sobre agua destilada, en cajas de Petri, de donde se trasladan, usando agujas de cristal curvado, a vidrios de reloj o a pocillos, que contienen las soluciones colorantes y los lavados sucesivos. Finalmente, los cortes se adhieren firmemente al portaobjeto, presionando con papel de filtro sobre los mismos; después se deshidratan, aclaran y cubren con un montante sintético.

2.- Inclusión en parafinas o plásticos

Para la inclusión en parafina de piezas fijadas en formaldehído, como se ha descrito en el Tema 1, hemos de deshidratarlas, llevándolas a través de una serie de etanoles de graduación ascendente, hasta el etanol absoluto. Una vez asegurados de su deshidratación, se debe impregnar la pieza en un disolvente de las grasas (xileno, benceno, tolueno, cloroformo, etc.) tras lo cual se pueden sumergir las muestras de tejido en la primera parafina a 59-60°C, por ejemplo, en donde permanecerán el tiempo necesario para que penetre la parafina y se evapore el disolvente que se haya empleado (xileno, benceno, tolueno, etc.). El paso a través de dos baños adicionales de parafina es suficiente, en general, para la impregnación del tejido y subsiguiente realización del bloque.

Hay muchas pautas a seguir, pero nosotros damos a continuación una que se puede realizar manualmente en una mañana, para piezas de pequeño tamaño, que no pasen de los 3 o 4 mm de espesor.

Las piezas que se han fijado durante un período de 24 horas, por ejemplo, se lavan al chorro de agua de la llave, una media hora. A continuación se pasan a una serie ascendente de etanoles de 70, 80 y 90 % y dos de etanol absoluto, por períodos de 30 minutos cada uno, más dos de

xileno de 15 a 20 minutos cada uno. Durante estos pasos, las piezas deberán ponerse translúcidas, lo que nos dirá que están bien impregnadas por el disolvente de las grasas y listas, pues, para pasar a las parafinas. Corrientemente pueden tenerse en dos parafinas a 58° ó 59° por períodos de 30 minutos cada uno. Finalmente, en una tercera parafina estarán 2 o 3 horas o incluso toda la noche. El bloque se puede hacer entonces a la mañana siguiente, al iniciar la jornada.

Existen otras alternativas, no solo de tiempo, sino también de deshidratantes, por ejemplo, metanol o acetona, en sustitución del etanol. Asimismo, actualmente, y desde hace ya algún tiempo se emplean los procesadores automáticos de tejidos que, de todas formas, deben ser programados según las necesidades del laboratorio.

En cualquier caso hay que asegurarse que la pieza esté translúcida, en el último paso de xileno o benceno, antes de pasarla al primer baño de parafina. Existen parafinas de bajo punto de fusión, pero en nuestro medio, donde predominan las altas temperaturas, es preferible usar las parafinas de 59 a 60°C de punto de fusión.

Existen otros medios de inclusión. Nos referimos a los plásticos, como el JB4 de la marca Polyscience, que se ha ensayado en algunos laboratorios, al parecer con buenos resultados. Nuestra experiencia a este respecto es muy limitada y no nos extenderemos en este punto.

3.- Congelación, liofilización e inclusión en parafinas o plásticos

Los tejidos pueden ser liofilizados, después de congelados y, una vez hecho esto, incluidos en las parafinas adecuadas o en plásticos. El método es complejo y necesita de aparatos costosos y de uso complicado. No obstante ello vamos a explicar someramente el procedimiento.

El primer paso, esto es, la congelación, es común con los otros dos procedimientos que siguen a continuación por lo que vamos a describirlo con algún detalle. Hay distintas formas de congelar una biopsia, pero hemos de buscar aquella que la congele en su totalidad en el menor tiempo posible. Existen muchos congelantes simples y mezclas conge-

lantes: nitrógeno líquido, helio líquido, freones, mezclas de sal e hielo, etc. El nitrógeno líquido, a pesar de alcanzar los -190°C (83 K), no deja penetrar el frío en la pieza con suficiente rapidez, debido a la capa de ebullición que le rodea, tan pronto entra en él, por lo que Moline y Glenner (1964) aconsejaron del uso de polvo de talco de la mejor calidad para espolvorear la pieza, antes de introducirla en el N líquido. Nosotros aunque hemos usado al principio este método, pasamos finalmente a usarlo sólo para enfriar el metilbutano (isopentano) contenido en un pequeño vaso de precipitado que se sumerge parcialmente en el nitrógeno líquido. Cuando se recibe la pieza, se descongela el metilbutano (que congela a -160°C , igual a 113 K) aproximadamente hasta la mitad de su contenido. En la interfase sólido-líquida habrá exactamente -160°C y allí caerá la biopsia que nos interesa congelar, en donde debe permanecer alrededor de 30 segundos. De allí se toma con pinzas, previamente enfriadas a la misma temperatura y se pasa a donde se desee, en nuestro caso al liofilizador.

Preparación previa del liofilizador. - Un aparato para liofilizar piezas de tejido orgánico, debe constar básicamente de una cámara donde se hace el vacío (hasta unas 5 atmósferas) y se consigue un frío aproximado de -25°C (248° K). Para introducir la pieza congelada en la cámara del liofilizador, se corta brevemente el vacío, el tiempo justo de poner la pieza en la cámara y, una vez tapada, se vuelve a poner en marcha el vacío. La liofilización consiste en la sublimación del agua de congelación, que impregna la pieza, la cual pasa al estado de vapor y se condensa en los tubos refrigerantes del aparato. Este es un proceso lento que, para tejidos muy ricos en agua, como los del sistema nervioso, puede durar casi 7 días. Un tejido de otro tipo puede requerir 3 o 4 días. Algunos liofilizadores disponen de un mecanismo según el cual se va subiendo gradualmente la temperatura hasta llegar al punto de fusión de la parafina, que, en forma de pastilla, ocupa todo el suelo de la cámara. De esta manera la pieza se sumerge en la parafina y se embebe en ella, pro-

ceso que, a la presión de 5 atmósferas es muy rápido (cinco minutos aproximadamente).

A pesar de todo, nosotros no hemos obtenido buenos resultados con este procedimiento que es engorroso de llevar a cabo. Preferimos romper el vacío y sumergir las piezas en parafina como se hace en la forma habitual, en la estufa de 60°C.

Para la inclusión en plásticos no habrá más que seguir los pasos necesarios de deshidratación y aclaramiento según el plástico de que se trate.

4.- Criosustitución

Este método consta de los siguientes pasos: (1) congelación de la pieza en la forma acostumbrada (metilbutano enfriado con nitrógeno líquido), (2) sustitución del agua de congelación por un deshidratante a muy baja temperatura (usualmente -80°C) y (3) inclusión en parafinas o resinas. El primer paso ya lo conocemos. El segundo, que es la clave de éste método, consiste en sumergir la pieza recién congelada, en metanol o etanol, acetona u otro deshidratante cualquiera, que previamente se ha puesto en un arcón a temperatura de 80°C. Nosotros hemos seguido el proceder de Feder y Sidman (1958) en ácido pícrico al 5% en etanol. Se supone que el deshidratante retira el agua que, en forma cristalina, está dentro de los tejidos, sin que se altere la estructura celular.

Aquí son también necesarios varios días para que se complete el proceso, tras lo cual se deja que el tejido, aún inmerso en el deshidratante, alcance la temperatura ambiente, para proceder después a la inclusión en parafina o resina, en la forma acostumbrada.

Como dicen Chayen, *et al* (1969), tanto este método como el de la liofilización adolecen de varios defectos, entre otros, el de que nadie sabe exactamente cuanto tiempo necesitan los tejidos para completar su proceso de deshidratación, así como que se requieren costosas instalaciones, lo que les impide convertirse en métodos de rutina.

5.- Congelación y corte en el criomicrotomo

La congelación de biopsias, procedentes del quirófano, para su procesa-

do, corte en el criomicrotomo y estudio histoquímico, cualquiera que éste sea (estudio enzimático, inmunocitoquímico o inmunofluorescente) requiere en primer lugar una serie de condiciones que debemos hacer que se cumplan. En primer lugar, el tiempo transcurrido entre la extirpación de la biopsia y su llegada a nuestras manos debe ser mínimo y, al decir mínimo, queremos hacer hincapié en el ideal que sería poderla congelar en el mismo quirófano. Hay excepciones y la biopsia muscular es, precisamente, una de ellas, ya que entre su extirpación y su congelación es preferible que transcurran al menos 20 minutos. Pearse (comunicación personal) así lo ha aconsejado siempre.

Para el traslado de la pieza, desde el quirófano, se aconseja depositarla sobre gasas húmedas en suero fisiológico y colocadas sobre hielo picado. La biopsia se deposita sobre dicha gasa y se tapa con otra también humedecida con suero fisiológico.

Un método que se puede seguir es el indicado en el apartado 3 y tras la congelación, según esa pauta, se coloca la muestra en la matriz de inclusión colocada sobre la platina del criomicrotomo, en forma líquida y se espera su endurecimiento en el área de enfriamiento rápido del mismo. La obtención de cortes finos en el criomicrotomo, como cualquier otro método de cortes finos, es una cuestión que participa tanto de una vertiente eminentemente técnica, como de otra puramente habilidosa. Es obvio que la mayor experiencia, esto es, el paso del tiempo y el trabajo continuado durante él, nos da como un sexto sentido para saber el camino a seguir ante una situación imprevista, pero no se puede negar que el conocimiento profundo de la criogenia, por una parte, y de los elementos que intervienen en el corte, por otra, ayudan ampliamente a conseguir el fin que nos proponemos, a saber, la obtención de cortes impecables en el criomicrotomo. Desistimos, pues, de intentar aquí seguir con algo que solo la práctica puede proporcionar, experiencia, y daremos, a continuación, como alternativa, un consejo útil y práctico sobre el tema.

"A veces es deseable o necesario en Histoquímica, obtener cortes de material fijado en formaldehído. Para esto hay que seguir el método de Holt, *et al.* (1960), quienes añaden sucrosa al formaldehído y, después de fijar en dicha mezcla a 4°C, en el refrigerador, durante 24 horas, pasan la pieza a una mezcla de sucrosa y goma acacia o arábica, otras 24 horas a la misma temperatura. Tras este tratamiento es muy fácil obtener buenos cortes en el criomicrotomo".

A continuación damos el método de Holt *et al.* (1960), según Pearse (1968, vol. 1, tercera edición, pág. 602), que damos también en el Tema 16, y que es como sigue:

(a) Formaldehído amortiguado:

Formaldehído al 37-38 %	10.0 ml
Amortiguador fosfatos 0.067 M, pH 7.2	50.0 ml
Sucrosa	7.5 g

Disolver la sucrosa y completar hasta un litro con el amortiguador.

(b) Sucrosa-goma arábica o de acacia:

Mezclar en estado seco, 30 gramos de sucrosa y 1 gramo de goma acacia. Este paso dispersa la goma y evita los grumos durante la solución. Añadir agua destilada hasta completar 100 ml. Añadir un cristal de timol y almacenar en el refrigerador. Con el cristal de timol se evita la formación de hongos.

Procedimiento de fijación en formol-sucrosa

- (1) fijar en (a) de 12 a 24 horas a 4°C, trozos delgados de 1 a 2 mm. de espesor,
- (2) lavar brevemente en agua destilada,
- (3) transferir a (b) de 12 a 24 horas, o más tiempo, a 4°C.

Bibliografía

CHAYEN, J., BITENSKY, L., BUTCHER, R. *Practical Histochemistry*. John Wiley & Sons, London. 1969.

FEDER, N., SIDMAN, B.L. *Histological fixation by a modified freeze-substitution method*. *J. Histochem. Cytochem.* 6: 401, 1958.

HOLT, S.J., HOBBIGER, E.L., PAWAN, G.L.S. *Preservation of integrity of rat tissues for cytochemical staining purposes*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7: 383-386, 1960.

MOLINE, S.W., GLENNER, G.G. *Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen*. *J. Histochem. Cytochem.* 12: 777-783, 1964.

PEARSE A.G.E. (comunicación personal).

Tema 3. Algunos conceptos básicos sobre colorantes

Introducción

Las partes constitutivas de las células y sustancias intercelulares son, por lo general, transparentes e incoloras y no se pueden distinguir entre sí a menos que haya diferencias apreciables en el índice de refracción. LEEUWENHOEK (1759) fue el primero que usó un colorante para obviar este problema. Entre 1848 y 1858 se realizó un gran esfuerzo en este sentido y de ahí en adelante aumentó casi exponencialmente la experimentación empírica de nuevos métodos de coloración.

Algunas definiciones

En el área de la coloración tenemos que distinguir entre "sustancia coloreada" y "materia colorante": la *primera* aunque dotada de color, no ejerce acción alguna sobre las fibras y tejidos vegetales o animales, o incluso en materiales sintéticos, pero las aplicaciones citohistológicas son las que aquí nos interesan; la sustancia coloreada actuaría, pues, como una pintura que recubre una pared; la *segunda*, o sea la materia colorante reacciona de forma diferente con las células y fibras que constituyen un corte de tejido, dependiendo de su constitución química y llegando a no reaccionar con algunos de los constituyentes tisulares, en algunas ocasiones. Esta coloración diferencial es la que nos permite distinguir, los elementos que integran el tejido, unos de otros.

Definiremos ahora lo que son grupos *cromóforos* y grupos *auxocromos*.

Grupos cromóforos. - Son grupos atómicos, generalmente sencillos,

dotados de dobles enlaces, entre los cuales, por citar solo algunos, tenemos el grupo nitro ($-\text{NO}_2$), el grupo azo ($-\text{N}=\text{N}-$) y el grupo imino ($>\text{C}=\text{NH}$), los cuales cuando están incorporados a anillos aromáticos (benceno, naftaleno, etc.) originan los grupos CROMOGENOS (o sea, generadores de color); insistimos diciendo que estos grupos no son colorantes pero pueden *engendrar color*.

Grupos auxocromos.- Son grupos o radicales químicos que añadidos a la molécula anterior o cromógeno, le da el carácter básico o ácido a la materia colorante; entre los básicos los más frecuentes son el $-\text{NH}_2$ y los derivados alquílicos o arílicos y entre los ácidos, el radical carboxilo ($-\text{COOH}$), el radical sulfonato ($-\text{SO}_3\text{H}$) y el grupo hidroxilo ($-\text{OH}$).

Finalmente, el colorante propiamente dicho tiene que venir en forma de sal (cloruro, sulfato, acetato u oxalato, en orden decreciente de frecuencia).

Batocromía e Hipsocromía

Existen, finalmente, dos conceptos, el de batocromía y el de hipsocromía, es decir, la capacidad de ciertos auxocromos de aumentar la intensidad del color, por ejemplo, el azul hacia el púrpura y el violeta (batocromía) o de disminuir su intensidad, desviación hacia el amarillo (hipsocromía); por ejemplo, los auxocromos $-\text{NH}_2$ y el $-\text{OH}$ son batocromícos y los radicales acilos o la pérdida progresiva de alquilos o arilos son hipsocromícos.

Observaciones

El uso de la nomenclatura química completa de los colorantes sería tan difícil y complicado que se usan nombres arbitrarios que aluden a su color o a la intensidad del mismo, por ejemplo, Light Green SF (C.I. 42095), que se traduce generalmente por Verde Luz, cuando en realidad quiere decir Verde Ligero o Verde Suave. Debido a la confusión creada por el hecho de que el mismo colorante haya recibido varios nombres por cada fabricante, ahora se prefiere usar el número del "Color Index" (C.I.) que debe figurar en la etiqueta del frasco. Otros tienen

nombres fantásticos como, por ejemplo, Rojo Congo o Azul de Nilo. Los nombres de los colorantes tienen a veces letras que aclaran algunos puntos como, por ejemplo, B, del alemán Blueish (azulado), Gelb (amarillento), WS del inglés "water soluble" o A, B, C para indicar que son distintos, como en el caso de los Azules.

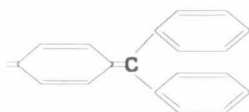
Clasificación de los colorantes

Se hace atendiendo al esqueleto sobre el que van los cromóforos. Como casi todos los colorantes deben su color a la posesión de un anillo quinonoide, un enlace azoico o un grupo nitro, podemos decir que hay tres grandes grupos de colorantes.

Colorantes quinonoides, que tienen la estructura básica siguiente:

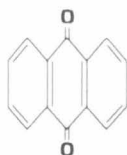


Entre los colorantes que se incluyen en este grupo están los del trifenilmetano: fucsina básica, verde de metilo, violeta de metilo, violeta genciana, verde cristal, y verde malaquita, entre otros, todos ellos básicos, y la fucsina ácida, el azul de metilo, el azul de anilina y el verde luz, entre los ácidos, cuya estructura básica es:



Trifenilmetano

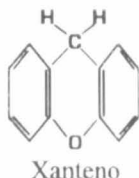
Los **antraquinonoides**, incluyen la alizarina, el rojo de alizarina, el rojo nuclear y el ácido carmínico, cuyo grupo básico es:



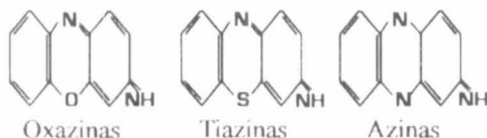
Antraquinona

Los **xantenos** incluyen a la pironina G que es básica y a la eosina Y, a la ertrósina G y a la floxina que son ácidas.

su fórmula básica es la siguiente:



Finalmente, las azinas, que incluyen tres grupos: las oxazinas, con el azul de Nilo y el azul celestín; las tiazinas, con la tionina, el azul de metileno, el azul de toluidina y los azures, entre otros; y las azinas, propiamente dichas, como el rojo neutro y el verde Janus B. A continuación se dan las fórmulas genéricas de estos grupos.



Colorantes azoicos

La fórmula básica general de los colorantes azoicos es la siguiente:



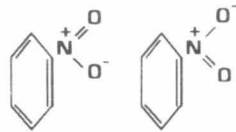
Fórmula Básica de los colorantes azoicos

Los que tienen uno solo de los grupos $-N=N-$ se llaman monoazos, los que tienen dos se llaman bisazos y cuando tienen tres, trisazos. El número de estos colorantes que se usan en la rutina del laboratorio de anatomía patológica es limitado. Los que tienen más utilidad en estos laboratorios son el Orange G y el Ponceau 2R (monoazo ácido), Pardo Bismarck Y (bisazo básico) y el Azul Tripano (bisazo ácido).

Colorantes nitro

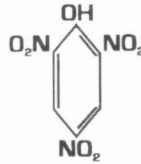
El color de este limitado grupo de colorantes se debe a las posiciones

resonantes entre las dos posiciones posibles de la carga eléctrica negativa. El nitrobenzeno tiene la fórmula siguiente:

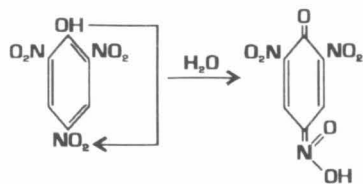


Nitrobenzeno
Posiciones resonantes

y es un líquido amarillo que no contiene auxocromos y no es colorante. Un derivado, que contiene tres grupos nitro y un grupo OH (auxocromo), es el trinitrofenol o ácido pícrico, que es al mismo tiempo fijador y colorante, aunque su uso como colorante es muy limitado. Su fórmula es como sigue:



Es un ácido fuerte, considerablemente ionizado en solución acuosa, que va acompañado de una transposición parcial de la molécula, según Hantzsch, como se indica a continuación:



Cromóforo p-quinonoide

Bibliografia

BAKER, J.R. *Principles of Biological Microtechnique. A study of fixation and dyeing.* Methuen Co., London, 1963.

LILLIE, R.D. H.S. CONN's. *Biological Stains.* Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1969.

Tema 4. Mecanismo de unión directa colorante-sustrato

Generalidades

La unión colorante-sustrato, entendiendo por sustrato los tejidos orgánicos preparados para su coloración, se realiza principalmente por uniones electrovalentes entre grupos catiónicos o aniónicos del tejido con restos aniónicos o catiónicos del colorante, respectivamente. Aunque existen otras fuerzas de unión no son de importancia práctica para entender el mecanismo de la coloración.

Hemos dicho ya que hay colorantes básicos o catiónicos, que son aquellos en los que el grupo que está ionizado y dispuesto a unirse a grupos aniónicos del tejido es el radical $-NH_2$. En el caso de los colorantes ácidos el grupo que les da dicho carácter suele ser el grupo sulfónico. Parece obvio que si las uniones son electrovalentes, los colorantes básicos se unirán con grupos ácidos, esto es, con cargas negativas del sustrato y lo contrario ocurrirá con los colorantes ácidos.

En el tejido existen normalmente tres posibilidades de grupos ácidos: los grupos carboxilos ($-COOH$) de proteínas y carbohidratos, los fosfóricos ($-PO_3H_2$) de los ácidos nucleicos y los sulfatos ($-SO_3H$) de los carbohidratos ácidos (Scott, 1989). En cuanto a los grupos básicos, el más importante y que merece especial mención es el grupo $-NH_2$, el grupo imidazol de la histidina y el guanidilo de la arginina, todos ellos en las proteínas.

Dado que las uniones sustrato-colorante dependen del grado de ionización de los grupos ácidos y básicos de ambos componentes de la

reacción, es evidente que el pH es uno de los parámetros más importantes a considerar en este tipo de reacciones.

Influencia del pH en el grado de ionización del sustrato

El grado de ionización de grupos ácidos y básicos en los tejidos depende del pH. Si el pH está del lado ácido del punto isoelectrico, los grupos ácidos de las proteínas disminuyen su grado de disociación y los aminos lo aumentan. El punto isoelectrico es el pH correspondiente a aquel en el que los grupos básicos y los ácidos están ionizados al 50% cada uno, por lo que en ese pH concreto no habrá tinción. Si el pH de la solución tintorial pasa al lado básico del punto isoelectrico, los grupos aminos estarán cada vez menos ionizados hasta que su acción sea suprimida, mientras que en ese rango de pH los grupos ácidos estarán cada vez más ionizados.

La supuesta determinación del punto isoelectrico

Como se ha dicho, el carácter electropolar de una proteína está profundamente influenciado por el pH de la solución en la que se encuentra. A medida que disminuye el pH, el número de cargas positivas aumenta, ya que los radicales ácidos tienden a pasar a la forma no ionizada. En medio muy ácido, la proteína es portadora únicamente de cargas positivas.

Cuando el pH aumenta, se produce el proceso inverso. A un cierto pH, el número de cargas positivas es igual al de cargas negativas; en ese momento la proteína, colocada en un campo eléctrico no migra ni hacia el ánodo, ni hacia el cátodo. Este pH es, por definición, el punto isoelectrico. Está claro que toda modificación del pH debe influenciar profundamente la unión de las proteínas con los aniones y los cationes y en particular con los colorantes aniónicos y con los catiónicos.

Lison (1953) razona, sin embargo, que el punto isoelectrico de un sustrato proteico, entendido como el punto en el que se cruzan las curvas de intensidad de coloración de un colorante ácido y otro básico

(pág. 19 de su *Traité D'Histochemie et cytochemie animale*) o sea el punto de coloración mínimo para los colorantes, no es realmente el punto isoeléctrico.

En efecto: (1) el empleo de pares diferentes de colorantes proporciona valores diferentes para el llamado punto isoeléctrico; (2) la coloración varía según la concentración del colorante y la del amortiguador y (3) el llamado "punto isoeléctrico", determinado por el método de los colorantes, no concuerda con el determinado por el método electroforético. Este autor termina diciendo que no es exacto que en el punto isoeléctrico no se tiñan las proteínas y que lo que se ha llamado punto isoeléctrico, no lo es.

Basados en las anteriores consideraciones Gutiérrez - Montero (1964) concluyeron que sería preferible llamar, por lo tanto, "punto cromóforo" a aquella concentración de hidrogeniones (pH de la solución tintorial) en la que no existe afinidad de un sustrato determinado ni por un colorante aniónico ni por uno catiónico.

Influencia de la fijación sobre la coloración

La fijación de los tejidos que, como hemos visto, tiene una influencia importante sobre los grupos funcionales de proteínas, en el caso de los fijadores no coagulantes o aditivos, es indudable que va a producir una influencia sobre los resultados finales de la tinción.

No podemos extendernos en la explicación de la influencia detallada de cada uno de los fijadores, por lo que solo citaremos el caso del formaldehído, el cual, al reaccionar con grupos aminos con producción de puentes metilénicos, es obvio que deberá disminuir en diversa medida la apetencia del tejido por los colorantes ácidos como, por ejemplo, la eosina.

Bibliografía

GUTIERREZ, M., MONTERO, C. *Chromophobic point: A new denomination for the so-called isoelectric point in histochemistry*. Anales del Desarrollo (Granada, España) 12: 63-64, 1964.

LISON, L. *Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et Methodes*. Gauthier Villars, Paris. 1953.

SCOTT, J.E. *Ion binding: Patterns of "affinity" depending on types of acid groups*. Symposia of the Soc Exp Biol 43 111-115, 1989.

Tema 5. Unión indirecta del colorante con los tejidos

Introducción

No todos los colorantes se unen a los componentes tisulares mediante los mecanismos expuestos hasta aquí; existen algunos que lo hacen mediante un reactivo intermediario, el cual suele ser una sal metálica. Estos colorantes no tiñen por sí mismos con suficiente intensidad, mientras que con ayuda de estas sales metálicas se produce una intensa coloración que, además, resiste toda una serie de tratamientos ulteriores. Las sales metálicas que se emplean con ese fin se llaman mordientes, porque se compara su acción con la de "morder" el tejido, mientras que su combinación con el colorante se llama "laca".

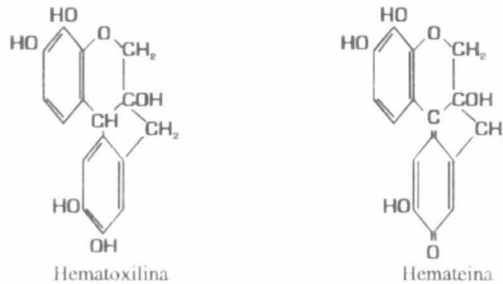
La gran ventaja de la tinción indirecta a través de un mordiente, con formación de una laca, es que una vez formado el complejo tejido-mordiente-colorante, este complejo es insoluble en cualquiera de los líquidos que normalmente se usan en la técnica histológica.

Los colorantes que forman lacas, en particular los dos que se usan corrientemente, actúan como si fueran colorantes básicos. Estos dos colorantes de que hablamos son la hemateína y el ácido carmínico.

La hematoxilina

Se obtiene del *Hematoxylum campechianum* Linn, que es un pequeño árbol, de ramas curvas, espinoso cuando joven y nudoso cuando viejo. Se da en Campeche, México, de donde proviene su apellido. El corazón del tronco, esto es, su porción más central, es la que se usa para extraer

la hematoxilina, a partir de la cual se obtiene el colorante. La hematoxilina es un sólido incoloro, pero si se humedece, se oxida por el oxígeno del aire y se convierte en hemateína, que es el verdadero colorante. Sus fórmulas se dan a continuación:

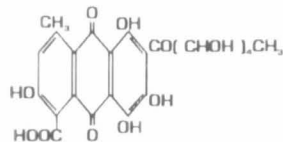


Se podría pensar que si partiéramos de la hemateína nos ahorraríamos el proceso de oxidación, sin embargo, las soluciones de hemateína floculan con facilidad, al continuar dicho proceso, por lo que es preferible emplear la hematoxilina como punto de partida.

Como decíamos en la introducción, se usan sales metálicas como mordientes, para unir la hematoxilina al sustrato tisular. Un sin fin de autores han introducido diversos metales y, actualmente, disponemos de hematoxilinas férricas, plúmbicas, cúpricas, aluminicas, etc. (Gray, 1954). Sobre el mecanismo de la unión indirecta volvemos más adelante.

El ácido carmínico

Es el único colorante de origen animal que se usa en microtécnica, y se obtiene del insecto *Dactilopius cacti*. El colorante constituye casi el 10% del peso seco de la hembra del insecto. Las hembras desecadas constituyen, pues, la "cochinilla" de la que se extrae el colorante. La fórmula del ácido carmínico es la siguiente:



En ella se aprecia la estructura quinonoide del anillo central con sus dobles enlaces alternados, así como un resto carboxilo en el anillo de la izquierda, lo que le da su carácter ácido.

La unión indirecta de los colorantes a los tejidos

Se trata de un mecanismo químico tan complejo y tan poco conocido, incluso en la actualidad, que no daremos aquí más que algunas indicaciones de lo que se entiende por "unión indirecta".

En este tipo de coloración tenemos tres componentes principales: el sustrato tisular, el mordiente y el colorante. El resultado final de la interacción entre estos tres componentes es la "laca". Por la forma como el mordiente se une a los otros dos componentes, a estos compuestos se les llama *quelatos*. Como los metales que se usan en este tipo de tinción son catiónicos se unen a los grupos ácidos del tejido, por lo que el conjunto, esto es el quelato, actúa como si fuera un colorante básico. Es por ello que la hematoxilina férrica, por ejemplo, tiñe principalmente la cromatina nuclear en la mayor parte de sus fórmulas utilizadas. En parte esa tinción se debe a los restos fosfóricos del ADN y decimos en parte porque se ha extraído el ADN usando ácido tricloroacético y se ha visto que la hematoxilina sigue tiñendo los núcleos. Se supone que lo que ahora tiñe sean las proteínas ácidas nucleares. Por otro lado, la tinción con hematoxilina no se limita al núcleo, sino que en células como las plasmáticas, con un elevado contenido de ARN citoplásmico se obtiene un cierto grado de tinción hematoxilínica en el citoplasma también. Si hacemos un tratamiento con ARNasa desaparece esa basofilia citoplásmica.

En técnica histológica puede actuar primero el mordiente y luego el colorante o ambos a la vez, nunca el mordiente después del colorante, aunque según Baker (1963), haya un par de ejemplos al respecto.

Se han empleado diferentes metales como mordientes, junto con la hematoxilina. Entre los más usuales está el hierro, el aluminio, el plomo y el cromo. El hierro tiene mayor apetencia por las proteínas citoplásmicas

y por los lípidos que el aluminio o el cromo, es por ello por lo que escogemos la hematoxilina férrica para teñir mitocondrias (a través de los lípidos mitocondriales) y hematoxilas aluminicas o crómicas para teñir la cromatina.

— — — — —

Bibliografía

BAKER, J.R. *Principles of Biological Microtechnique. A study of Fixation and Dyeing.* Methuen Co. Ltd. London, 1963.

GRAY, P. *The microtomeist's formulary and guide.* The Blakinston Division. McGraw-Hill Co. Inc. New York, 1954.



Tema 6. Introducción a la histoquímica de los carbohidratos

Introducción

A efectos prácticos la Histoquímica se divide en los mismos apartados que la Bioquímica y tendremos así, una Histoquímica de Carbohidratos, una Histoquímica de Proteínas, otra de Lípidos, etc. Obviamente, cada uno de estos apartados de la Histoquímica exige un conocimiento, aunque sea mínimo, de las entidades químicas correspondientes. Por lo tanto, creemos que es necesario dar primero un repaso a cada uno de los capítulos de la Bioquímica, antes de entrar en la descripción de los métodos histoquímicos con los que se pretenden demostrar los grupos funcionales de carbohidratos, proteínas, lípidos, o bien, actividades enzimáticas, en los cortes tisulares.

Bioquímica de los carbohidratos

Definición.- Son polihidroxialdehidos o polihidroxicetonas, con la fórmula empírica $(\text{CH}_2\text{O})_n$, que reciben también el nombre de sacáridos o azúcares.

Al hablar de estos azúcares, usamos los términos *monosacárido*, *disacárido*, *oligosacárido* o *polisacárido*, refiriéndonos a una unidad sacárida, dos unidades sacáridas, unas pocas unidades sacáridas y muchas unidades sacáridas, respectivamente.

El monosacárido más abundante en la naturaleza es la glucosa, azúcar de seis átomos de carbono, que es al mismo tiempo el combustible principal de la mayoría de los organismos vivos.

En la fórmula $(\text{CH}_2\text{O})_n$, la n puede ser igual a tres como mínimo; en

este caso tendríamos las triosas, que son dos: el gliceraldehído y la dihidroxicetona.

Todos los azúcares se nombran haciéndolos terminar en *-osa*, y los nombres genéricos comienzan por un prefijo que indica el número de átomos de carbono; así tendremos las dos triosas mencionadas y, además, las tetrasas, las pentosas y las hexosas. Entre estos grupos encontramos los azúcares más importantes para nosotros, sobre todo las pentosas y las hexosas.

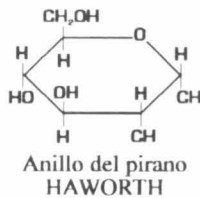
De las dos triosas se derivan las aldosas y las cetosas y, dentro de estos dos grupos están las aldotetrosas y las cetotetrosas, las aldopentosas y las cetopentosas y las aldohexosas y las cetohexosas.

Entre las pentosas que más nos interesan están la ribosa y la deoxiribosa (que se encuentran en los ácidos nucleicos) y entre las hexosas, la glucosa, la galactosa y la manosa que son componentes de las mucinas epiteliales.

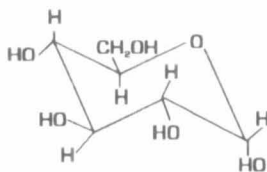
La configuración de la molécula de los monosacáridos se conoce ahora con exactitud, pero al principio se daban las fórmulas lineales, las cuales dan la constitución química pero no la conformación real de la molécula.

Después de una serie de estudios, que no vamos a detallar ahora, se dedujo que las fórmulas acabadas de dar, llamadas de cadena abierta, no eran las verdaderas y se introdujeron entonces las llamadas fórmulas de proyección de Haworth, que resultan de la formación de un hemiacetal, por reacción entre el aldehído y el resto alcohólico del carbono 4 o 5, según se trate de una pentosa o de una hexosa, fórmulas furánicas o piránicas, respectivamente.

Según Haworth, el anillo del pirano se debe representar así:



La fórmula de Haworth es, sin embargo, también engañosa, porque parece indicar que los cinco átomos de C están en el mismo plano, junto con el O, lo cual no es cierto. En realidad, se ha visto, que pueden adoptar dos formas, en “silla” o en “bote”. A continuación mostramos la fórmula en silla:



Fórmula en silla

Nuestra insistencia en dar una idea de la forma de la molécula se debe a la importancia que atribuimos a dicha conformación molecular para el entendimiento de las reacciones biológicas entre las macromoléculas. No obstante ello, las fórmulas según Haworth son las más usadas en Histoquímica por su claridad y facilidad de representación.

Derivados de estos azúcares

Entre los derivados, de interés en Histoquímica, vamos a mencionar tan sólo los derivados aminados, de los cuales los más importantes son la glucosamina y la galactosamina, resultantes de la reacción de un grupo amino con el carbono 2 de la glucosa o galactosa, respectivamente. Ambos componentes se encuentran en componentes azucarados del organismo animal, como las glicoproteínas y los glicosaminoglicanos. Otro derivado de importancia es el ácido neuramínico, el cual consiste en un resto manosamina unido al ácido pirúvico. Los derivados acetilados del ácido neuramínico son los ácidos siálicos, importantes componentes de las glicoproteínas y de los glicolípidos, en los animales superiores.

Polisacáridos o Glicanos

Los polisacáridos o glicanos, como se les conoce en la moderna nomenclatura de los carbohidratos, son importantes componentes, bien

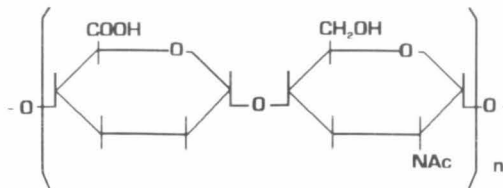
como sustancias de almacenamiento energético, como el glucógeno o, como componentes estructurales, formando parte de las glicoproteínas o glicolípidos. En realidad, participan más en tareas de reconocimiento celular, que en las funciones arquitecturales, aunque a estos niveles moleculares ambas funciones son difíciles de separar.

Glucógeno

Es especialmente abundante en los hepatocitos y en la célula muscular y tiene una función energética preponderante. Es un polímero ramificado de la glucosa; forma enlaces $1 \rightarrow 4$ y cada 8 o 10 unidades se ramifica mediante enlaces $1 \rightarrow 6$. Se puede hidrolizar mediante las enzimas alfa y *beta*-amilasa, que al extraerlo sirve de control de las reacciones histoquímicas para su demostración, al dar una reacción negativa, como veremos en su lugar.

Glicosaminoglicanos unidos a proteínas o proteoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAG), llamados anteriormente *Mucopolisacáridos ácidos* (Meyer, 1969) se encuentran todos unidos a un eje proteico, menos el ácido hialurónico (HA), que se da en cadenas polisacáridas libres. Los complejos de GAGs y proteínas reciben el nombre de *proteoglicanos* (PG). Los restantes glicosaminoglicanos, unidos todos y cada uno de ellos a un eje proteico, son los *galactosaminoglicanos*, *condroitín sulfatos* (CS) y *dermatán sulfatos* (DS) y los *glicosaminoglicanos*, *heparán sulfatos* (HS), la *heparina* y los *queratán sulfatos* (KS). Son, pues, seis variantes cuya heterogeneidad se ve aumentada por la localización y el grado de sulfatación de sus unidades sacáridas. Todos los GAGs son polímeros de un dímero con la fórmula general



El ácido hialurónico, componente importante del tejido conjuntivo, carece de grupos sulfatos. Los restantes GAGs están todos sulfatados, siendo el heparán sulfato y la heparina los que lo están en mayor grado. La sulfatación tiene lugar en los C3, C3 y C6, C6, en el amino del C2 y, en este, más el C6.

La unión de los GAGs con el eje proteico tiene lugar en los restos serinas del eje proteico, mediante una cadena constituida por ácido glucurónico → galactosa → galactosa → xilosa → O de la serina. Las funciones de los PGs van de las estrictamente mecánicas, hasta las de diferenciación celular y morfogénesis, pasando por las de adhesión y motilidad (Kjellen y Lindahl, 1991).

Glicoproteínas

Este grupo de proteínas, generalmente localizadas en las membranas celulares, a las que atraviesan, tienen una importante misión en el reconocimiento intercelular. Los restos carbohidratados se localizan siempre en el extremo de la proteína situada en el espacio extracelular y dada la extraordinaria hidrofilia de estos restos constituyen un considerable impedimento al giro de la glicoproteína para un eventual cambio de dirección.

Las unidades carbohidratadas se unen, bien al nitrógeno amídico de la asparagina, bien al átomo de oxígeno de la serina o de la treonina y el carbohidrato que realiza dicha unión es usualmente la Nacglucosamina o la Nacgalactosamina.

Los oligosacáridos unidos al N amídico de la asparagina tienen una estructura común que consiste en tres *manosas* y dos restos *Nacglucosamina*. Existen dos tipos estructurales según que tengan restos manosas añadidos (oligosacáridos con elevado contenido en manosa), como se ve en la figura 1, o que tengan restos de Nacglucosamina, galactosa, fucosa y ácido siálico (oligosacáridos complejos) como se muestra en la figura 2. Los oligosacáridos contienen siete clases diferentes de restos azucarados: glucosa, galactosa, Nacglucosamina, Nacgalactosamina,

manosa, fucosa y ácido siálico, unidos por enlaces glicosídicos de clases muy variadas, lo que les da una gran diversidad. Esta diversidad se refleja en sus múltiples funciones entre las que hay que incluir a los grupos sanguíneos y al reconocimiento intercelular.

Las lectinas, proteínas de origen vegetal o animal, con una especificidad selectiva por estos restos carbohidratados de la superficie celular, se usan para el análisis de estos componentes de membrana.

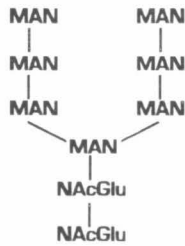


Figura 1

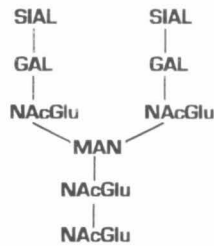


Figura 2

Las figuras 1 y 2, representan dos posibilidades de constitución química de carbohidratos de membrana.

Bibliografia

KJELLEN, L., LINDAHL, U. *Proteoglycans: structures and interactions*. Ann. Rev. Biochem. 60: 443-475, 1991.

KORNFELD, R., KORNFELD, S. *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Ann. Rev. Biochem. 54: 631-664, 1985.

STRYER, L. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Co., New York, 1988.

MEYER, K. *Biochemistry and Biology of the mucopolysaccharides*. Am. J. Med. 47: 664-672, 1969.

Tema 7. Métodos histoquímicos para carbohidratos

Introducción

En nuestra brevísima incursión por la Bioquímica de los carbohidratos, hemos tomado contacto con las entidades cuya presencia en los tejidos se quiere demostrar. Hemos de decir, sin embargo, que no contamos con métodos que nos permitan asegurar la presencia en ellos de las entidades bioquímicas como tales. Casi todos los métodos de que disponemos lo son para demostrar restos o grupos funcionales que, indirectamente, nos hablan de la presencia de las entidades que los poseen. Sin embargo, puesto que los grupos funcionales pueden encontrarse, a veces, en entidades químicas muy distintas, un resultado positivo nos plantea nuevas interrogantes. Tenemos necesidad, entonces, de otros métodos auxiliares que nos descarten algunas entidades a favor de otras. En suma se trata de un análisis similar al que realiza el químico con una muestra determinada.

Una vez convencidos de los límites dentro de los cuales nos movemos, pasamos a analizar los métodos que se pueden emplear en el área de los carbohidratos. En las hexosas y pentosas encontramos grupos glicoles, que pueden ser oxidados a aldehidos, grupos carboxilos, en los ácidos hexurónicos o en los ácidos siálicos, grupos sulfatos en los dímeros de los glicosaminoglicanos, etc. Contamos con un método para la demostración de aldehidos procedentes de la oxidación de alcoholes, el PAS, y métodos para la demostración de restos ácidos o aniónicos, los colorantes catiónicos.

Muy recientemente se han aplicado una serie de reactivos para el estudio de carbohidratos que tienen una gran especificidad por determinados monosacáridos, es decir, por unas determinadas conformaciones estéricas, las lectinas.

Finalmente, como técnicas auxiliares para completar el estudio analítico del contenido carbohidratado de un tejido, disponemos de dos grupos de ellas: (a) los bloqueos de grupos funcionales en cuestión y (b) los tratamientos enzimáticos específicos. Resumiendo:

1. Demostración de grupos glicoles, hidroxiaminos, hidroxialquilamino e hidroxiceto vecinales (técnica del PAS).
2. Demostración de grupos aniónicos (colorantes básicos).
3. Demostración de conformaciones monosacáridas específicas (lectinas).
4. Bloqueos de grupos funcionales (acetilación, metilación).
5. Tratamientos enzimáticos (amilasa, neuraminidasa, hialuronidasa).

Estos cinco puntos con sus técnicas correspondientes se desarrollan en este y en *temas* sucesivos.

Reacción de PAS (*Periodic Acid-Schiff*)

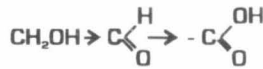
Una de las reacciones químicas para carbohidratos, más conocidas, es la oxidación de glicoles, usada en química por Malaprade (1928), para la valoración de dichos glicoles, y por Nicolet y Shinn (1935) para la estimación de aminoalcoholes.

La introducción de esta reacción en histoquímica se debe a Mac Manus (1946) y su inmediato desarrollo a Lillie (1949) y Hotchkiss (1948). En resumen, la reacción consiste en una oxidación con ácido peryódico, seguida de la aplicación del reactivo de Schiff, ideado por este químico en 1866. Este reactivo sirve para demostrar la presencia de aldehidos en una muestra tisular y posee una alta sensibilidad. A continuación analizaremos, los dos pasos de la técnica, con algún detalle.

La oxidación se realiza, como acabamos de decir, con ácido peryódico,

en concentraciones que pueden variar entre el 0,5 al 1,0% en agua destilada, durante 10 minutos a temperatura ambiente.

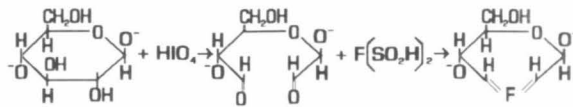
La oxidación de alcoholes procede normalmente hasta la formación de ácidos, a través de la función aldehído.



Oxidación de alcoholes

El grado de oxidación, equivalente en este caso al grado de oxigenación, es mayor de izquierda a derecha. Sin embargo, usando un oxidante suave a concentración, tiempo y temperatura adecuados, podemos quedarnos en el punto medio y esto es lo que ocurre cuando se oxida con ácido peryódico en las condiciones adecuadas.

El mecanismo de reacción, tal como se da en los polisacáridos, es como sigue:



Oxidación de la hexosa para obtener grupos aldehídos en los C 2 y 3. La F representa al reactivo Schiff.

La oxidación tiene lugar, pues, en los carbonos 2 y 3, en sus restos alcohólicos vecinales o vic-glicoles y el reactivo Schiff básica se añade, como se indica en el esquema, entre los carbonos 2 y 3.

El reactivo de Schiff

Este reactivo fue diseñado por Schiff en 1866, para demostrar la presencia de grupos aldehídos en solución y su sensibilidad es, como hemos dicho, muy elevada.

El mecanismo de la reacción, en el caso de la demostración de grupos aldehídos, obtenidos por oxidación con ácido peryódico y aplicación subsiguiente del reactivo de Schiff no se conoce aún con certeza. Aceptamos, pues, la formulación simplificada que da Pearse (1972) para los

aldehidos producidos por oxidación, como se ha dado más arriba. El color que da esta reacción suele designarse como rojo magenta.

Preparación del reactivo de Schiff

Aunque el reactivo de Schiff puede obtenerse en el comercio, y el de la casa Merck es especialmente recomendable, este reactivo se puede y se debe saber preparar en el laboratorio. Existen diversas formas de prepararlo, pero nosotros hemos seguido siempre la de Lillie (1965), a la que suele llamarse "preparación en frío", la cual es fácil y cómoda de realizar.

La preparación del reactivo en frío, según Lillie (1965), es como sigue:

1. Pesar 1 g de Fuchsina básica y 1,9 g de metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), y disolver en 100 ml de HCl 0,15 N.
2. Agitar a intervalos o en un agitador mecánico durante 2 horas. La solución se aclara en ese tiempo y toma un color marrón pálido.
3. Añadir 500 mg de carbón activo fresco y agitar durante unos 2 minutos.
4. Filtrar en una probeta graduada, lavando lo que quede en el papel de filtro con un poco de agua destilada para restaurar el volumen original de los 100 ml. Guardar en refrigeración.

Para otras formas de preparación, véanse los textos de Lillie (1965) o de Pearse (1972).

Procedimiento para realizar la reacción del PAS

1. Desparafinar los cortes en xileno, hidratar en etanoles de graduación descendente y pasar al agua destilada.
2. Cubrir los cortes con una solución de ácido peryódico al 0,5-1%, durante 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar bien con agua destilada.
4. Cubrir de 10 a 15 minutos con el reactivo de Schiff, que se habrá

sacado previamente del refrigerador para que alcance la temperatura ambiente.

NOTA: Hay que guardar ciertas precauciones en el manejo de este reactivo debido a las manchas de color rojo que dejan allí en donde cae. Para ello debe usarse pipeta Pasteur desechable, cada vez que se saca una porción del reactivo, para cubrir él o los cortes que se van a usar

5. Los cortes deben lavarse abundante y rápidamente con agua destilada y luego con agua de la llave. Algunos autores usan un primer lavado con agua sulfurosa, es decir, solución de metabisulfito sódico en HCl 0,15 N, aunque esto no es absolutamente imprescindible según otros. Si se usa la solución sulfurosa hay que tener cuidado de no aspirarla directamente por la fuerte acción pungente que posee.

6. Finalmente, los cortes son deshidratados, aclarados en xileno y cubiertos con una resina sintética (Permont, DPX o cualquier otra).

RESULTADOS: Los lugares positivos adquieren un color rojo magenta de variable intensidad según el contenido en aldehídos creados por el peryódico.

Bloqueos de grupos alcoholes y aldehídos

Los dos testigos que podemos llevar paralelamente a la reacción del PAS son: (1) cortes en los que se hayan bloqueado los grupos alcoholes, con lo cual la reacción subsiguiente del ácido peryódico-Schiff debe ser negativa, o bien, (2) cortes en los que se hayan bloqueado los grupos aldehídos obtenidos por la oxidación con el ácido peryódico, tras lo cual la aplicación del reactivo de Schiff no deberá dar ninguna reacción.

Bloqueos de grupos -OH

En este caso se ha usado tradicionalmente la acetilación, que esterifica los grupos -OH, pero que lo hace también con los grupos -NH₂.

Este tipo de bloqueo se puede realizar como sigue:

Anhidrido acético	16 ml
Piridina	24 ml

Los cortes se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora, aunque se han recomendado períodos más largos, hasta de 24 horas, para el glucógeno y el cartilago. Nosotros hemos obtenido buenos resultados incluso con 30 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Bloqueos de aldehidos -COH

Para el bloqueo de estos grupos existe una larga lista de procedimientos que usan la semicarbazida, fenilhidrazina, dimedona, hidroxilamina, anilina o el m-aminofenol.

El tratamiento con clorhidrato de fenilhidrazina al 5% bloquea los grupos aldehidos en 30 minutos. Pearse (1972) aconseja 10 g de clorhidrato de hidroxilamina y 20 g de acetato sódico en 40 ml de agua destilada, de 1 a 3 horas a temperatura ambiente.

De todas formas estos bloqueos tienen más bien un valor académico para la demostración de que los resultados se deben a la presencia de grupos alcoholes en un caso o aldehidos en el otro.

Método del peryodato-borohidruro-saponificación-PAS

Hale demostró, en 1953, que ciertos tejidos fijados e incluidos en parafina, que eran débilmente positivos a la reacción del PAS, se teñían más intensamente después de tratarlos con una solución de hidróxido sódico. Este incremento en la PAS-positividad se atribuyó a un aumento en la cantidad de los grupos glicoles y de los aminoalcoholes cuya reactividad podía abolirse con una acetilación y restaurarse con una desacetilación. La explicación dada por Hale a este hecho fue que la fijación con formaldehido disminuía la positividad al PAS y que el posterior tratamiento con hidróxido sódico restauraba la normal positividad al PAS de estos tejidos, concluyendo en definitiva que todo era debido a la acción del fijador.

Lev y Spicer (1965), en un estudio de mucinas epiteliales en controles normales y en pacientes con fibrosis quística, demostraron que la saponificación causaba un incremento en la PAS-positividad de mucinas colónicas, tanto en material fijado en formaldehido, como en tejidos fijados en Carnoy.

Asimismo, Culling, Reid y Dunn (1971), en un estudio sobre nuevos métodos histoquímicos para el estudio de carbohidratos, observaron este fenómeno en ciertas mucinas del tracto gastrointestinal y llegaron a la conclusión de que el incremento de la positividad al PAS era independiente de la fijación y se debía a un incremento de grupos glicoles, puestos de manifiesto por la acción del hidróxido sódico.

Posteriormente, estos mismos autores, idearon un nuevo método histoquímico para poner de manifiesto el incremento de la positividad al PAS debido a la saponificación, llamado efecto KOH-PAS.

Con este método se podía valorar el efecto KOH-PAS aisladamente, es decir, sin la PAS-positividad previa a la saponificación, que existe en ciertas mucinas, mediante la destrucción de dicha PAS-positividad pre-existente; para ello después de la oxidación con ácido peryódico, se hace una reducción con borohidruro sódico y posterior demostración aislada del efecto KOH-PAS. Este método es el que se ha dado en llamar *periodato-borohidruro-saponificación-PAS* o, abreviadamente, PB-KOH-PAS. La positividad al PAS obtenida con este método se ha demostrado que se debe a la presencia de O-acil ésteres en la cadena polihidroxilada del ácido siálico, ya que es en esta cadena donde existen grupos glicoles que quedan enmascarados por los restos acilos y que pueden ser puestos de manifiesto con la saponificación.

Los estudios realizados por todos estos investigadores, así como por Spicer (1985), Culling y cols., (1971, 1974) y por Reid y cols., (1984), han establecido las bases para el análisis histoquímico diferencial entre mucinas neutras y ácidas y, entre estas últimas, aquellas cuya acidez se debe a la presencia de grupos sulfatos de aquellas que contienen restos de ácidos siálicos. No es este el lugar para hacer una descripción detallada de las investigaciones que han llevado a estos hallazgos; aquí vamos a dar tan sólo algunas de las técnicas que son de importancia capital para la realización de este análisis.

(1) Bloqueo de aldehidos con clorhidrato de fenilhidracina

Tratar los cortes llevados al agua destilada, después de la oxidación con

ácido peryódico, con una solución acuosa de clorhidrato de fenilhidrazina al 0.5 % (como recomiendan Culling y cols., 1974), durante dos horas a temperatura ambiente. Lavar bien con agua destilada y seguir con el reactivo de Schiff.

(2) Metilación (Fisher y Lillie, 1954)

Tratar los cortes, llevados al etanol absoluto, con HCl 0.1 N en metanol a 80°C, durante 4 horas; hidratar en etanoles descendentes, lavar con agua destilada y proceder con el método de elección.

(3) Saponificación

Tratar los corte, llevados al etanol de 70 %, con hidróxido potásico (KOH) al 0.5 % en etanol al 70 %, 15 minutos a temperatura ambiente. Hidratar y proceder con la técnica de elección.

(4) Reducción con borohidruro sódico (Lillie y Pizzolato, 1972)

Tratar con NaBH_4 al 1 % en Na_2HPO_4 al 1 %, recién preparado, durante 1 minuto, después de oxidar con ácido peryódico y lavar abundantemente con agua destilada. La aplicación posterior del reactivo de Schiff da resultados negativos.

(5) Extracción de ácidos siálicos (Culling y cols., 1974)

Calentar los cortes saponificados, según el proceder (3), con ácido sulfúrico 0.1 N a 80°C durante una hora.

Bibliografía

- CULLING, C.F.A., REID, P.E., DUNN, W.L. *The effect of saponification upon certain histochemical reactions of the epithelial mucins of the gastrointestinal tract.* J. Histochem. Cytochem. 19: 654-662, 1971.
- CULLING, C.F.A., REID, P.E., CLAY, M.G., DUNN, W.L. *The histochemical demonstration of O-acylated sialic acid in gastrointestinal mucins. Their association with the potassium hydroxide-periodic acid-Schiff effect.* J. Histochem. Cytochem. 22: 826-831, 1974.
- FISHER, E.R., LILLIE, R.D. *The effect of methylation upon basophilia.* J. Histochem. Cytochem. 2: 81-87, 1954.
- HALE, A. J. *Observations on substances that react weakly to the periodic acid Schiff test.* Quart. J. Micr. Sci. 94: 303-314, 1953
- HOTCHKISS, R. D. *A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparation.* Arch. Biochem. 16: 131-141, 1948.
- LEV, R., SPICER, S. S. *A histochemical comparison of human epithelial mucins in normal and hypersecretory states including pancreatic cystic fibrosis.* Am. J. Path. 46: 23-45, 1965.
- LILLIE, R. D. *Studies on the histochemistry of normal and pathological mucins in man and in laboratory animals.* Bull. Int. Assoc. Med. Mus. 29: 1-53, 1949.
- LILLIE, R. D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* Tercera edición. The Blakinston Division. McGraw-Hill Book Co., New York, 1965.
- LILLIE, R.D., PIZZOLATO, P. *Histochemical use of borohydrides as aldehyde blocking reagents.* Stain Technol. 47: 13-16, 1972.
- MacMANUS, C. W. *Histochemical demonstration of mucin after periodic acid.* Nature (London), 158: 202, 1946.
- MALAPRADE, L. *Action de l'acide periodique sur les polyalcohols. Application analytique.* Bull. Soc. Chim. Francaise. Series 4, 43: 383-396, 1928.
- NICOLET, B. H., SHINN, L.A. *The action of periodic acid on alpha-amino alcohols.* J. Amer. Chem. Soc. 61: 1615-1622, 1935.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied.* Vol. 1. Tercera edición. J.& A. Churchill Ltd., 1968. London.
- SCHIFF, H. *Eine neue Reihe organischer Diamine.* Justus Liebigs Ann. Chem. 140: 92-137, 1866.

Tema 8. Colorantes catiónicos. Azul Alciano; Metacromasia; Método de la diamina de Spicer; Método del Hierro coloidal de Hale; Tratamientos enzimáticos en la Histoquímica de carbohidratos.

Introducción

Los abundantes lugares aniónicos existentes en los diferentes polisacáridos, son en última instancia de dos clases, *carboxilos* y *sulfatos*, y, en su conjunto, proporcionan a los sustratos tisulares donde se encuentran la apetencia que estos manifiestan por fijar colorantes catiónicos. La propiedad de ciertos sustratos tisulares de teñirse con colorantes catiónicos se llama *basofilia*, concepto introducido por Lison (1953), según el cual, cualquier colorante con predominancia de cargas positivas se unirá a dichos sustratos por enlaces electrovalentes.

En realidad, no son sólo estos tipos de enlaces los que actúan en dicha unión, sino que hay otros tipos de uniones que colaboran también, sin embargo, para simplificar no vamos a considerar aquí más que los enlaces electrovalentes. Al lector que quiera profundizar en el conocimiento del mecanismo de unión colorante-sustrato, le recomendamos el artículo de Zanker (1981).

Somos de la opinión que la exposición más clara de la basofilia se encuentra en el libro de Lison (1953), cuya lectura recomendamos, a pesar de los años transcurridos desde que se escribió. En sus conclusiones dice Lison: "La basofilia está condicionada primariamente por la presencia de grupos electronegativos ionizados, en la estructura que se es

tudia...” y “la basofilia mide la diferencia entre las afinidades respectivas del catión del colorante y los cationes presentes en la estructura en el momento de la coloración, por los lugares portadores de cargas electronegativas”.

Nosotros hemos seleccionado, para la demostración de la basofilia, un grupo de técnicas, que han demostrado ser útiles en el diagnóstico histopatológico, así como en investigación, tras una larga experiencia en este campo. Las técnicas seleccionadas son:

- (1) Azul Alciano al 0.5 % en ácido acético al 3 %,
- (2) Metacromasia con colorantes tiazínicos,
- (3) Métodos de la diaminas de Spicer, y
- (4) Método del hierro coloidal de Hale.

Finalmente, se dan los tratamientos enzimáticos más importantes para comprobar la especificidad de las anteriores reacciones.

Azul Alciano

Este colorante es una ftalocianina de cobre con 3 grupos S-metilente-trametilisotiuronio por molécula. Steedman (1950) fue el primero en aplicarlo a la tinción histológica. Basado en las estructuras que teñía, se usó al principio para demostrar carbohidratos ácidos, en combinación con el método del PAS, que se suponía que demostraba carbohidratos neutros. No es un colorante metacromático y la presencia de cobre en su molécula le confiere utilidad en la “tinción” de los tejidos para la microscopía electrónica, debido a la electrón-densidad del metal.

Steedman (1950) usaba una solución de Azul Alciano 8GX al 1% en ácido acético al 3%, recién filtrada, durante 10 a 30 minutos. Nosotros usamos una concentración menor (Azul Alciano al 0.5%), ya que al 1% queda siempre una cantidad del colorante sin disolver, que nosotros hemos determinado en 0.4 gramos aproximadamente.

En la forma de preparación acabada de dar, el pH es de 2,5 aproximadamente, y cuando se tiñen cortes de tejido fijado en formaldehído, observamos que a ese pH se tiñen la práctica totalidad de los sustratos. Esto

quiere decir que a ese pH se tiñen los carboxilos y, por supuesto, los fosfóricos y los sulfatos. Se puede usar a la misma concentración en un amortiguador a pH aproximado de 1.5 con lo cual solo teñiremos restos fosfóricos y sulfatos y, si lo hacemos a pH 0.5, solo se teñirán aquellas áreas tisulares que contengan grupos sulfatos.

Método de la concentración electrolítica crítica

Scott y Dorling introdujeron en 1965 un método en el que la tinción se realizaba con Azul Alciano 8GX al 0.1% en amortiguador acetato 0.05 M a pH 5.7. A alícuotas de esta solución les añadian cloruro magnésico para obtener una serie de molaridades ascendentes, según la serie siguiente: 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.45, 0.65, 0.8 y 1.0 y teñían cortes seriados con una y cada una de estas soluciones. Los autores observaron que los núcleos se hacían negativos para una concentración molar 0.2 M de cloruro magnésico, mientras que la mucina del íleon de la rata se hacía negativa para una molaridad de 0.5 y el reborde estriado del epitelio lo hacía para una molaridad de 0.8. La base racional de este procedimiento está en la competición activa, por el sustrato electronegativo en cuestión, que se establece entre el colorante catiónico y el catión magnesio, presente en las alícuotas. Dependiendo de la cantidad y calidad de cargas negativas del polianión, la tinción con el Azul Alciano se hará negativa a una concentración determinada del cloruro magnésico. La molaridad del cloruro magnésico viene así a constituir una marca de identidad del sustrato polianiónico que se estudie.

A este método, que acabamos de describir, le llamaron sus autores, método de la Concentración Electrolítica Crítica (CEC). De sus observaciones se deduce que no todos los polianiones con grupos carboxilos tienen la misma CEC y lo mismo ocurre con los polianiones sulfatos. Los polifosfatos tienen valores intermedios, por lo general. La variabilidad debe depender de la densidad de cargas y, probablemente, de otros factores.

Metacromasia

Los adjetivos metacromático y metacromatismo fueron introducidos por primera vez por Ackroyd en 1876 (citado por Baker, 1963), refiriéndose al cambio de color que sufren ciertas sustancias cuando se calientan, pero en Biología tiene un significado diferente muy especial, usándose actualmente el nombre de metacromasia y el adjetivo metacromático (Baker, 1963) para designar el fenómeno mediante el cual el color con el cual se tiñe un determinado componente tisular difiere suficientemente del color original del colorante y de su tinción ortocromática ordinaria como para dar un marcado contraste de color.

Si teñimos un corte de tejido con Azul de Toluidina o, mejor aún, con Azur A, colorantes tiazínicos de carácter básico, algunos componentes del corte se teñirán de azul, pero otros como el cartílago, por ejemplo, se teñirán de púrpura o rojo. Se podría pensar que el colorante contiene otro derivado de color rojo, pero esto no es así. El colorante, aún con un grado de pureza suficiente, da colores diferentes en diferentes áreas del tejido, que dependen de la densidad de grupos aniónicos presentes en el mismo. Hay colorantes metacromáticos tanto en el grupo de los colorantes básicos como en el grupo de los ácidos pero, mientras los primeros han tenido mucha importancia en microtécnica, los segundos no han tenido tanta y han sido menos estudiados.

Los sustratos tisulares que producen este fenómeno del desplazamiento del color, se vio que eran fuertemente ácidos. A estos sustratos capaces de dar ese viraje al color del colorante, se les llama *cromotropos*. Los sustratos cromotrópicos más conocidos son la matriz del cartílago, que ya hemos mencionado, los gránulos de las células cebadas, y las secreciones de algunas glándulas mucosas. Los responsables de la metacromasia en los sustratos basófilos son los ésteres sulfúricos, los fosfóricos y los carboxílicos.

El mecanismo de la reacción metacromática

Uno de los criterios para poder hablar de metacromasia, siempre refi-

riéndonos a los colorantes tiazínicos, es que haya un desplazamiento del punto de absorción máximo del colorante hacia longitudes de onda más cortas.

Los trabajos de muchos autores nos han llevado al conocimiento de que este fenómeno se debe a la existencia de tres bandas en el espectro del Azul de Toluidina: la *banda monomérica a* que es azul, la *dimérica b* que es violeta y la *polimérica g* que es roja. La aparición en los tejidos de estos colores denota la presencia de una u otra de estas formas del colorante. La metacromasia se refiere a la aparición del color rojo y a ella, pues, se le llama g-metacromasia. Se ha interpretado esto como el ordenamiento de las moléculas planares del colorante en forma compacta y ordenada debido a su unión con grupos aniónicos de las moléculas existentes en el tejido, con una separación entre sí de 4 angstroms o menos. Conforme la separación aumenta, el color se desplaza hacia el violeta y el azul.

Métodos para la demostración de la metacromasia

Existen muchos métodos para la demostración de la metacromasia y diversas opiniones sobre la fijación que se debe usar; nosotros damos un par de procedimientos y aconsejamos la consulta del texto de Pearse (1968) para otras posibilidades.

Método estándar del Azul de Toluidina.

- 1.- Llevar las secciones al agua.
- 2.- Teñir con una sol. de Azul de Toluidina al 0.5% de 4 a 6 horas.
- 3.- Lavar bien con agua destilada.
- 4.- Con fines histoquímicos examinar inmediatamente sin deshidratar.
- 5.- Montar con gelatina-glicerina.

Método de Kramer y Windrum.

- 1.- Llevar las secciones al agua.
- 2.- Teñir con A.T. al 0.1% en etanol al 30% durante 5 a 20 minutos.
- 3.- Lavar con etanol al 95%.

4.- Deshidratar en etanol absoluto.

5.- Aclarar en xileno y montar en resina sintética.

Resultados: la g-metacromasia, roja o rosa; la b-metacromasia, púrpura.

Método de las diaminas de Spicer

El método que vamos a considerar aquí fue el que desarrolló Spicer en 1965 a partir de estudios anteriores (Spicer y Jarrels, 1961). En estos nuevos estudios observó que una mezcla de los isómeros meta- y para- de la N-N'-dimetilfenilendiamina, más un agente oxidante, el cloruro férrico, era útil para la tinción de los sustratos aniónicos. Este autor describió dos variantes: una con elevado contenido y otra con bajo contenido en hierro. La primera tiñe solo mucosustancias sulfatadas y es el que daremos a continuación ya que, combinado con el Azul Alciano, es muy útil para distinguir mucosustancias neutras de mucosustancias ácidas. Su utilidad la hemos apreciado en el estudio de mucosustancias en el adenocarcinoma de estómago (Montero y Segura, 1980).

Preparación del reactivo:

N-N'-dimetil-m-fenilendiamina	120 mg
N-N'-dimetil-p-fenilendiamina	20 mg
Agua destilada	50 ml

Verter, una vez disueltos los reactivos, en un Coplin, en el que se ha puesto 1.4 ml de una solución de cloruro férrico al 10%.

Proceder de tinción:

1. Llevar los cortes al agua destilada.
2. Teñir 24 horas, en el Coplin con la solución anterior.
3. Lavar con agua destilada.
4. Teñir con Azul Alciano al 0.5% en ácido acético al 3%, 10 a 15 min.
5. Lavar en ácido acético al 3% acuoso y después en agua destilada.
6. Deshidratar y montar con DPX o Permount.

Resultados: Las mucosustancias sulfatadas se tiñen de color purpúreo, casi negro; las restantes mucosustancias se tiñen de azul.

El método del hierro coloidal de Hale

Este método ha sido objeto de múltiples estudios y su especificidad ha sido muy discutida. Se supone que los grupos ácidos libres, del tejido, son los responsables de la fijación del ión férrico, en forma coloidal a pH2, el cual se demuestra posteriormente por la reacción Azul de Prusia. En nuestra experiencia, estamos de acuerdo con Pearse (1972), en que la reacción ha sido útil en Histoquímica aplicada, por ejemplo, en el estudio de las lesiones cerebrales, donde el acúmulo de polisacáridos ácidos puede demostrarse con nitidez, dada la ausencia de otros sustratos positivos en este tejido.

Preparación del hierro coloidal:

1. Hervir 250 ml de agua destilada.
2. Añadir 4.4 ml de solución de cloruro férrico al 58% (pesar 2.7g y disolver en 5 ml de agua destilada).
3. Mantener hirviendo durante la adición y hasta que la solución tome un color rojo oscuro.
4. Enfriar y dializar para extraer los ácidos libres y las sales de hierro no hidrolizadas.

La diálisis se hace como sigue: Transferir la solución roja, una vez fría, a tubos de diálisis de 41 mm cada uno, con un peso en el fondo para que se mantengan verticales (se puede usar una piedra de cristal). Se añaden en porciones de 25 ml a cada tubo.

Los tubos se introducen en un recipiente que contenga agua destilada suficiente para cubrir los tubos de diálisis por fuera. Dializar durante 24 horas, cambiando el agua un par de veces durante el periodo de diálisis.

5. Filtrar el contenido de los tubos a través de papel Whatman No. 50 o similar para retirar el óxido de hierro. Este filtrado es la solución stock de hierro coloidal y se puede mantener a temperatura ambiente.

Solución de trabajo:

Agua destilada	18 ml
Ácido acético glacial	12 ml
Solución stock de hierro coloidal	10 ml

Se debe preparar fresca cada vez que se va a proceder a la tinción.

Procedimiento de tinción:

1. Sumergir los cortes en la solución de trabajo recién preparada durante 2 horas.
2. Lavar 30 minutos en ácido acético al 30%, usando 3 cambios de 10 minutos cada uno.
3. Lavar 5 minutos en agua corriente, seguido por un lavado con agua destilada.
4. Sumergir durante 20 minutos en una mezcla recién preparada de 20 ml de HCl 0.15 N y 20 ml de ferrocianuro potásico al 2%.
5. Lavar 5 minutos en agua corriente y después con agua destilada.

Este proceder puede ser combinado con la reacción del PAS en la forma acostumbrada o simplemente deshidratando, aclarando y cubriendo con los montantes usuales (Lillie, 1965).

Tratamientos Enzimáticos

En cuanto a los tratamientos enzimáticos previos para la comprobación de la especificidad de la reacción, vamos a considerar los tres siguientes: (1) amilasa, (2) hialuronidasa y (3) neuraminidasa.

Amilasas

Estas enzimas existen en las formas *a* y *b* y catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos del glucógeno y del almidón. La forma *a* cataliza la hidrólisis de los enlaces glucosídicos 1→4, separando unidades de glucosa. La forma *b*, sin embargo, separa unidades de maltosa sucesivas. Según Kiernan (1981), la enzima usada en histoquímica es la forma *b* y según Lillie (1965) la forma *b* ataca a los polisacáridos no ramificados,

pero a los ramificados, como el glucógeno, lo hace débilmente; la forma α , sin embargo, ataca ambos tipos de polisacáridos con rapidez. Takeuchi (1958) usaba estas enzimas al 05% en amortiguador de acetato 4 mm, a pH 5.5 a 6.0 para la α -amilasa y a pH 4.0 a 5.7 para la forma β . Los tiempos ensayados por este autor fueron de 30 minutos a 10 horas a 37°. Cualquiera de estas modalidades de tratamiento hace negativa la reacción subsiguiente del PAS con el glucógeno.

Hialuronidasas

Existen dos formas de hialuronidasa (Dixon-Webb, 1971), una obtenida del testículo o del veneno de serpiente y la otra de la sanguijuela. La primera hidroliza el enlace 2-acetilamino-2-deoxi-D-glucosa y un resto glucuronato del ácido hialurónico y la otra lo hace en el enlace β -1,3, entre el D-glucuronato y el 2-acetilamino-2-deoxi-D-glucosa. También fueron obtenidas de filtrados bacterianos (estreptococos, estafilococos, pneumococos). Los efectos observados por diversos autores fueron también diversos y, en algunos casos, las especificidades fueron relativas. Según Pearse (1972), los cortes llevados al agua se tratan con una solución de hialuronidasa (1 mg/ml) en cloruro sódico 0.85%, durante 3 horas a 37°, se lavan en agua destilada y se tiñen con el método elegido, por ejemplo, Azul de Toluidina acuosa al 0,5% durante 20 minutos.

Neuraminidasa

La enzima obtenida del *Vibrio cholera* es la generalmente usada para extraer el ácido neuramínico que suele ocupar el lugar terminal en las cadenas glicoproteicas. Sin embargo, no es posible quitar todos los restos de dicho ácido presentes en el tejido, por lo que, a veces, debe usarse un método auxiliar, la saponificación.

Los cortes llevados al agua destilada, son incubados, según Kiernan (1981), toda la noche, a 37°, en 100 unidades de neuraminidasa, disueltas en 1 ml de amortiguador acetato 0.1 M a pH 5.5 al que se añade 1 mg de cloruro sódico.

Bibliografía

- BAKER, J.R. *Principles of Biological Microtechnique. A study of fixation and dyeing.* Methuen Co., Ltd. London. 1963.
- KIERNAN, J.A. *Histological and Histochemical Methods. Theory and Practice.* Pergamon Press. London. 1981.
- LILLIE, R.D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* 3rd Edition. McGraw-Hill Book Co. New York. 1965.
- LISON, L. *Histochemie et Cytochemie Animales. Principes et Methodes.* Gauthier-Villars, Paris, 1953.
- MONTERO, C., SEGURA, D.I. *Retrospective histochemical study of mucosubstances in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract.* *Histopathology*, 4: 281-291, 1980.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied.* Churchill-Livingstone. Edinburgh & London, 1972.
- SCOTT, J.E., DORLING, J. *Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian Blue in salt solutions.* *Histochemie*, 5: 221-233, 1965.
- SPICER, S. S. *Diamine methods for differentiating mucosubstances histochemically.* *J. Histochem. Cytochem.* 13: 211-234, 1965.
- SPICER, S.S., JARRELLS, M.H. *Histochemical reaction of an aromatic diamine with acid groups and periodate engendered aldehydes in mucopolysaccharides.* *J. Histochem. Cytochem.* 9: 368-379, 1961.
- STEEDMAN, H.F. *Alcian Blue 8GS. A new stain for mucin.* *Quart. J. micr. Sci.* 91: 477-479, 1950.
- TAKEUCHI, T. *Histochemical demonstration of branching enzyme amylo-1:4-1:6-transglucosydase in animal tissue.* *J. Histochem. Cytochem.* 6: 208, 1958.
- ZANKER, von V. *Grundlagen der Farbstoff-Substrat Beziehungen in der Histochemie.* *Acta Histochem. Suppl.* XXIV, pp. 151-168, 1981.

Tema 9. Marcadores de unidades sacáridas. Las lectinas

Introducción

En la histoquímica de los carbohidratos disponíamos tan solo de métodos para la demostración de grupos funcionales, presentes en las distintas clases de estos principios inmediatos, que permitían aceptar, indirectamente, la presencia de tales macromoléculas. Algunos de esos grupos, sin embargo, son compartidos con macromoléculas de otros principios inmediatos (proteínas, lípidos) lo que les resta indudablemente especificidad.

Con la introducción de las proteínas, llamadas actualmente lectinas (las antiguas fitohemaglutininas) se pudo dar un paso adelante en la identificación de unidades monosacáridas bien individualizadas, lo que significó un gran avance, por la gran afinidad de estas sustancias por moléculas concretas de la serie de azúcares, componentes de los polisacáridos. Como hemos dicho, estas proteínas, aisladas al principio solamente de sustancias vegetales, por Stillmark (1888), demostraron ser muy útiles en la identificación de los grupos sanguíneos. Posteriormente al encontrarse proteínas de origen animal con propiedades aglutinantes, similares a las obtenidas de las plantas, no pudo seguir manteniéndose el nombre de fitohemaglutininas, por lo que éstas reciben ahora el nombre de lectinas (del latín *legere*, escoger).

Las lectinas son proteínas multiméricas compuestas por subunidades unidas covalentemente. Se ha dicho que esta estructura multimérica es la que le da a las lectinas la capacidad de aglutinar células mediante

uniones similares a las que unen el antígeno con el anticuerpo, pero no siempre tienen estas proteínas la capacidad de aglutinar células. Los pesos moleculares de las lectinas van desde 11.000 daltones para la lectina específica del grupo sanguíneo beta hasta 335.000 daltones para la lectina del *Limulus polyphemus*.

La especificidad de cada lectina se orienta hacia una conformación mono o disacárida determinada, aunque existen lectinas distintas con la misma o similar especificidad. Las lectinas con una especificidad hacia un monosacárido determinado pueden diferir en su afinidad hacia disacáridos, oligosacáridos o glicoproteínas que contengan dicho monosacárido. La mayoría de las lectinas reaccionan con más de un monosacárido; por ejemplo, la concanavalina A tiene especificidad por glucosa, pero la tiene también por manosa y, en menor extensión, por N-acetil-D-glucosamina. Finalmente, las lectinas pueden ser específicas para la conformación de una unidad monosacárida y su enlace glicosídico hasta la conformación de un tetrasacárido.

Las lectinas se pueden usar en histoquímica, para la demostración de carbohidratos, usando distintos tipos de marcaje, como indicamos a continuación: reactivos fluorescentes, enzimas como la peroxidasa y sustancias electrón-densas, para su uso en microscopía electrónica.

La utilidad del uso de las lectinas en la investigación y en el diagnóstico se refleja en la bibliografía que va desde la identificación de tipos celulares en histología hasta el estudio del curso clínico de los carcinomas de vejiga, la distinción entre tipos de carcinomas de mama y la identificación de tipos de células hematopoyéticas.

A continuación citamos algunas de las lectinas, más usadas en histoquímica de carbohidratos, con sus especificidades características.

Concanavalina A (*Canavalia ensiformis*)

Esta lectina es un tetrámero de protómeros idénticos, con afinidad por glucosa y manosa, necesita que exista en el oligosacárido que se estudia, la configuración D-manopiranosido o D-glucopiranosido, con gru-

pos hidroxilos sin alterar en C3, C4 y C6. Para su acción necesita la presencia de iones Mg, Mn y, sobre todo, Ca.

Dolichos biflorus

Es una glicoproteína de peso molecular 120,000 daltones formada por cuatro subunidades de tamaño aproximadamente igual. Tiene afinidad por restos alfa-D-N-acetilgalactosamina (abreviadamente D-GalNAc) terminales, no reductores. Solo el grupo C2 acetamido de la molécula está en contacto en el lugar de unión de la lectina.

Triticum vulgare

Esta lectina que se extrae del germen de trigo, está constituida por dos unidades y tiene un peso molecular de 36.000 daltones. Aunque se acepta, en general, que la unión se realiza con la D-N-Acetil glucosamina (D-GluNAc), sin embargo, se ha demostrado que también puede unirse al ácido N-acetilneuramínico, por ello es preferible usar la lectina succinilada, que no se une al ácido neuramínico o siálico, pero retiene su especificidad por la N-acetilglucosamina.

Ricinus communis

Fue la primera fitohemaglutinina extraída del ricino por Stillmark en 1888, planta que es muy venenosa. Existen dos formas, la *R. communis I* que tiene una especial afinidad por D-galactosa, pero puede también unirse a N-acetil-galactosamina y es moderadamente tóxica y la *R. communis II*, que es muy tóxica, y se une a las superficies celulares por medio de la galactosa o N-acetil-galactosamina de dicha localización. Esta última está compuesta por dos cadenas, A y B, de 28.000 daltones y 32.000 daltones, respectivamente. La cadena A tiene actividad enzimática que puede bloquear la síntesis de proteínas, de tal manera que una única molécula de la cadena A puede matar a una sola célula, sin embargo, no puede entrar en la célula si no va unida a la cadena B.

Ulex europaeus I y II

El *Ulex europaeus I* es una glicoproteína con PM de 63,000 daltones,

compuesta por dos subunidades. Se une a glicoproteínas y glicolípidos que contienen restos fucosos. Se ha demostrado que es un excelente marcador de células endoteliales.

El *Ulex europaeus II* está compuesto por cuatro subunidades de 24,000 daltones; aunque se une a N-acetil-glucosamina, es más potencialmente inhibido por restos fucosilos.

Metodología de la aplicación histoquímica de las lectinas

Las lectinas han sido utilizadas repetidamente para el estudio de los componentes glucídicos en una gran variedad de tejidos y especies, incluyendo la humana, desde que Sharon y Lis (1972) describieron las especificidades de dichas lectinas hacia sus respectivos azúcares. Hay que citar también la contribución al estudio de las lectinas de Goldstein y Hayes (1978).

Las primeras investigaciones fueron realizadas por Katsuyama y Spicer en 1978 empleando la Concanavalina, que se une a los receptores glucídicos del tejido, por su afinidad por manosa. En un segundo paso se añade peroxidasa, que es una enzima rica en manosa y que, por tanto, se acoplará a la Concanavalina unida al tejido. Finalmente, se revela la actividad de la peroxidasa con diaminobenzidina y, el precipitado resultante, de color pardo-dorado, revela los lugares donde existen receptores glucídicos que contienen manosa. Como fácilmente se puede comprender el método acabado de describir sólo sirve para la Concanavalina A, específica para manosa, pero no para otras lectinas que no poseen esa especificidad.

Se ha aplicado también la técnica del PAP de Sternberger y cols. (1970); para ello, después de aplicar la lectina, se usa un anticuerpo primario contra la lectina en cuestión, obtenido en conejo, seguido por un anticuerpo secundario contra inmunoglobulina de conejo, obtenido en otra especie animal y, finalmente, el complejo PAP. Algunos autores no recomiendan este método y prefieren el método indirecto fluorescente o recomiendan el método ABC, que aprovecha la gran afinidad de la avidina

por la biotina (iniciales del método), ideado por Hsu y cols. (1981). En este método se emplean lectinas marcadas con biotina y en un segundo paso se pone un complejo avidina-peroxidasa. En general, las lectinas biotiniladas se usan a una concentración de 1 a 10 microgramos por mililitro en amortiguador fosfato o TRIS salino y, posteriormente, se añade el complejo avidina-peroxidasa a una concentración variable entre 5 y 20 microgramos por mililitro.

Aunque este método de marcaje resulta ser muy sensible y específico para la demostración tisular, se han ensayado también marcajes con oro coloidal, ferritina, otras enzimas y con sustancias fluorescentes. Marcando las lectinas directamente con peroxidasa se puede revelar en un segundo paso la actividad de esta enzima con diaminobencidina y éste sería uno de los procedimientos más sencillos.

Para poder comparar cada uno de los métodos mencionados y obtener algunas conclusiones, debemos valorar una serie de requisitos que debe cumplir cualquier reacción histoquímica, tales como sensibilidad, exactitud y ausencia de fondo inespecífico. De acuerdo con nuestros propios resultados, a pesar de estar de acuerdo con Hsu y cols. (1981), sobre la mayor sensibilidad que muestra el método del ABC de estos autores, sobre el método directo usando el marcaje con peroxidasa, no hemos encontrado reacción de fondo con este último, a las diferentes diluciones que hemos empleado y además su realización es sencilla y cómoda. Cuando tenemos que valorar los resultados obtenidos en una reacción histoquímica entre las lectinas y los receptores glucídicos, no solo hemos de tener en cuenta el método empleado, sino también el grado de conservación de los azúcares afines. Para ello, las condiciones de fijación, así como las características del procesado, son datos muy importantes que hay que tener en cuenta para no obtener falsos negativos (Schulte y Spicer, 1983). En nuestra experiencia hemos comprobado la gran importancia del tiempo de acción de los fijadores, de tal manera que

hemos obtenido los mejores resultados con aquellos tejidos fijados en cortos períodos de tiempo, variable de 1 a 3 horas.

Aplicaciones

Las lectinas han sido extensamente utilizadas para localizar restos glucídicos, en una gran variedad de tejidos, con el fin de detectar a nivel tisular los glucoconjugados individuales, no demostrables con la mayoría de las técnicas empleadas hasta ahora.

Además de esta aportación en el campo de la Histología, el uso de las lectinas ha contribuido extensamente como elemento diagnóstico en el campo de la Biología Celular y la Patología, ya que permiten estudiar las alteraciones en las glicoproteínas celulares, preferentemente durante la transformación maligna, tal como indicamos al principio de esta exposición. Podemos señalar dentro del campo de la Patología, algunos casos más concretos tales como: haber servido de instrumento pronóstico en los carcinomas de células transicionales de vejiga, de elemento de distinción entre carcinomas de mama sensibles o no a los efectos hormonales, para facilitar el diagnóstico de las enfermedades por almacenamiento de glicoproteínas o glucolípidos y en otros muchos procesos. En resumen, al utilizar las lectinas como instrumento histoquímico, se ha ampliado nuestro conocimiento sobre los restos glucídicos específicos de la superficie celular a lo largo de la maduración normal así como en la diferenciación y transformación patológica, al mismo tiempo, que se ha contribuido a la comprensión de la patogénesis de determinadas enfermedades y se ha suministrado un nuevo criterio diagnóstico y pronóstico en la clínica diaria.

Nota: Una mayor comprensión de este capítulo se podrá obtener con la lectura de nuestro "Manual de Técnicas Inmunohistoquímicas" de próxima aparición.

Bibliografía

GOLDSTEIN, I.J., HAYES, C.E. *The Lectins: Carbohydrate-binding proteins of plant and animals*. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 35: 127-340, 1978.

HSU, S.M., RAINE, L., FANGER, H. *Use of avidin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures*. J. Histochem. Cytochem. 29: 1349-1353, 1981.

KATSUYAMA, T., SPICER, S.S. *Histochemical differentiation of complex carbohydrates with variants of the concanavalin A-horseradish peroxidase method*. J. Histochem. Cytochem. 26: 233-250, 1978.

SCHULTE, B.A., SPICER, S.S. *Light microscopic detection of sugar residues in glycoconjugates of salivary glands and the pancreas with lectin-horseradish peroxidase conjugates*. I. Mouse. Histochemical J. 15: 1217- 1238, 1983.

SHARON, N., LIS, H. *Lectin-agglutinin and sugar specific proteins*. Science, 177: 949-959, 1972.

STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H. Jr., CUCULIS, J.J., MEYER, H.G. *The unlabeled antibody-enzyme method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradishperoxidase) and its use in identification of Spirochetes*. J. Histochem. Cytochem. 18: 315-333, 1970.

STILLMARK, H. *Über Rizin, ein giftiges ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen*. Inaug. Dis. Dorport., 1888.

Tema 10. Introducción a la histoquímica de proteínas

Como venimos diciendo en los anteriores apartados, nos parece necesario dar aquí un breve repaso a la bioquímica de las proteínas, previo al estudio de los métodos de que disponemos para la demostración de algunos grupos funcionales de proteínas.

Definición. Las proteínas son compuestos de C, H, O, N y S, organizados en unidades, que son los aminoácidos, los cuales se unen entre sí mediante enlaces llamados peptídicos, en largas cadenas, que pueden alcanzar hasta un par de millares.

La palabra proteína fue acuñada por Jöns J. Berzelius en 1838, y deriva del griego *proteios* que significa "de primer orden".

Consideraremos primero, siguiendo el razonamiento de Stryer (1988), los aminoácidos *glicina*, *alanina*, *valina*, *leucina* e *isoleucina*, los cuales tienen cadenas laterales alifáticas; las cadenas laterales de los tres últimos poseen 3 y 4 átomos de carbono respectivamente y son fuertemente hidrófobos, con rechazo del agua y, por su tendencia a agruparse, ayudan a mantener la estructura tridimensional de las proteínas.

Hay un aminoácido, la *prolina* que, por su estructura particular se sitúa en los lugares donde la proteína tiene que acodarse, influenciando así la arquitectura proteica. De los tres aminoácidos con cadenas laterales aromáticas, *-fenilalanina*, *tirosina* y *triptófano-*, el primero y el tercero son muy hidrófobos, pero el segundo, la *tirosina*, lo es menos debido al hidroxilo que posee en su anillo indólico.

Los aminoácidos sulfurados, *cisteina* y *metionina*, son hidrófobos, y la

cisteína juega un papel muy importante en el mantenimiento de la estructura proteica mediante la formación de puentes disulfuros entre dos restos cisteína situados en lugares alejados de la cadena aminoacídica. Los aminoácidos *serina* y *treonina* contienen grupos hidroxilos alifáticos y pueden ser considerados como las versiones hidroxiladas de la *alanina* y *valina*, respectivamente.

Los aminoácidos *lisina* y *arginina* son muy hidrófilos y están cargados positivamente a pH neutro. La *histidina* puede estar cargada positivamente o carecer de carga, dependiendo de su ambiente local. Existen dos aminoácidos, el *ácido aspártico* y el *ácido glutámico*, con restos laterales cargados negativamente y que tienen derivados sin carga, la *asparagina* y la *glutamina*.

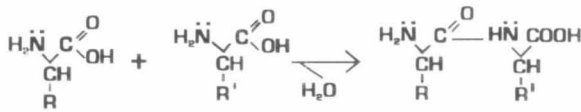
Los aminoácidos se abrevian según dos nomenclaturas de tres y una letra respectivamente que damos a continuación:

Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Acido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Acido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T

Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Enlaces Peptídicos

La unión de un aminoácido con el siguiente se hace mediante un enlace peptídico, como se indica a continuación:



Niveles de organización de las proteínas

La unión sucesiva con otros aminoácidos formará, al final, una larga cadena con un grupo amino en un extremo y un carboxilo en el otro y, a todo lo largo de la cadena, cada aminoácido tendrá un resto (R) que es el que le caracteriza. Esto es lo que constituye la estructura primaria de una proteína, *primer nivel* de organización.

El *segundo nivel* de organización estructural lo constituye la estructura descubierta por Pauling y Corey (1930). Dos cadenas aminoacídicas van normalmente enrolladas entre sí formando lo que dichos autores denominaron *alfa-hélice*.

El *tercer nivel* de organización está constituido por el plegamiento sobre sí misma de dicha alfa-hélice, hasta formar una estructura en forma de ovillo, cuando se trata de proteínas globulares o de alineación de una cadena de alfa-hélice a lo largo y paralelamente con otra, para formar estructuras más complejas, en el caso de las proteínas fibrilares.

Las proteínas globulares pueden agruparse en 4 u 8 unidades, formando complejos macromoleculares, lo que puede considerarse como un cuarto nivel de organización.

Tipos de proteínas

Entre las proteínas globulares encontramos moléculas con actividad

enzimática, las enzimas, con tamaños que oscilan entre los 20 y los 80 kilodaltones (el dalton es una unidad de masa aproximadamente igual a la del hidrógeno) y otras, aún mayores, los anticuerpos, con pesos moleculares de aproximadamente 200 kilodaltones (Kd) y hasta cinco veces este peso molecular; también existen péptidos hormonales, pequeñas moléculas que pueden tener tan solo 32 aminoácidos aproximadamente, como la calcitonina, con pesos moleculares alrededor de 30 a 40 Kd. Finalmente, las proteínas fibrilares están constituidas por cadenas polipeptídicas enrolladas entre sí, de tres en tres, que miden unos 300 nm de largo y 1,4 nm de ancho, y se disponen en cadenas escalonadas. Un ejemplo de proteína fibrilar muy importante es el colágeno.

Demostración histoquímica de grupos funcionales de proteínas

Disponemos de métodos para demostrar grupos carboxilos y aminos, tanto terminales como laterales, y de grupos sulfhidrilos y disulfuros, pero también existen métodos para la demostración de los grupos laterales (R) de las cadenas proteicas. En efecto, existen métodos para la demostración de tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina y arginina, aprovechando las reacciones químicas específicas de sus grupos funcionales. Hemos escogido para ilustrar algunas de estas posibilidades, el método de demostración del triptófano, la demostración del grupo guanidino de la arginina, y la demostración de grupos disulfuros, que damos en el siguiente capítulo.

Bibliografía

PAULING, L., COREY, R.B. *Configurations of polypeptide chains with favored orientations around single bonds of the polypeptide chain.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA 37: 729-740, 1951.

STRYER, L. *Biochemistry.* W.H. Freeman & Co. New York. 1988.

Tema 11. La demostración histoquímica de algunos grupos funcionales de proteínas

Aunque existen una serie de técnicas histoquímicas para la demostración general de proteínas, bien en función de sus grupos aminos terminales y laterales, bien mediante la demostración de sus grupos carboxilos terminales y laterales, no vamos a tratar aquí de dichas técnicas. En último término, la simple tinción con hematoxilina-eosina nos demuestra la presencia de proteínas por el color rosa-anaranjado que da la eosina al unirse preferentemente a los grupos aminos de las mismas.

Hemos elegido la demostración histoquímica del grupo indol del triptófano, del grupo guanidilo de la arginina y de los grupos sulfhidrilos y disulfuros, cuyos métodos se dan a continuación.

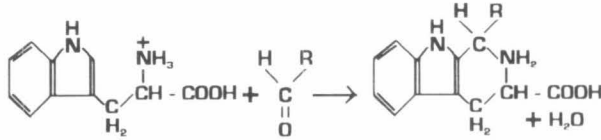
1. Triptófano

Método del dimetilaminobenzaldehído (DMAB)-nitrito de Adams.

Glennner y Lillie introdujeron en 1957 un método que usaba DMAB al 2,5% en una mezcla de ácido clorhídrico y ácido acético en la proporción 1:3. El método era muy poco sensible en material fijado en formaldehído, a menos que hubiera grandes cantidades de triptófano.

En la modificación de Adams (1957), quien introdujo como agente oxidante el nitrito sódico, para desarrollar el color del producto final, se obtiene un intenso color azul en los componentes con elevado contenido de triptófano (gránulos de las células de Paneth, gránulos de zimógeno, gránulos de las células principales del estómago).

Adams (1957) sugirió el siguiente mecanismo para explicar la reacción



El pigmento azul (azul de carbolina) se deriva de la beta-carbolina por oxidación con el nitrito sódico, pero su estructura química parece ser que se desconoce.

Procedimiento:

1. Llevar las secciones al etanol absoluto y secar al aire.
2. Sumergirlas en DMAB al 5% en HCl concentrado (PE 1,18), un minuto y sin lavar.
3. Transferir a NaNO_2 al 1% en HCl concentrado, un minuto.
4. Lavar 30 segundos en agua corriente.
5. Lavar en ácido clorhídrico al 1% en etanol.
6. Deshidratar, aclarar y cubrir.

Resultados: Los tejidos que contienen triptófano se tiñen de color azul.

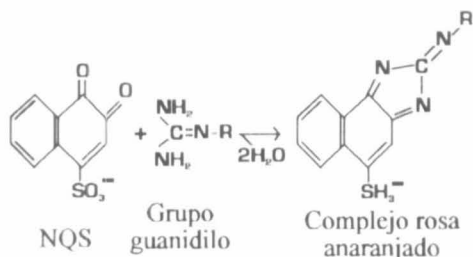
Nota: La solución de nitrito sódico en ácido clorhídrico produce vapores muy irritantes, por lo que se debe mantener el frasco de Coplin tapado y, una vez terminada la reacción, lavar con agua abundante de la llave.

2. Arginina

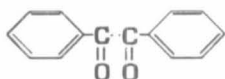
Métodos para la demostración de arginina.

El método clásico para la demostración de este aminoácido es el de Sakaguchi (1925), de difícil realización técnica y que, posteriormente, ha sido desplazado por una modificación introducida por Lillie (1971). El reactivo usado por este autor, para la demostración del grupo guanidilo de la arginina, es el 1,2-naftoquinona-4-sulfonato sódico (abreviadamente

NQS), el cual reaccionaría con el grupo guanidilo, según Lillie (1971) así:



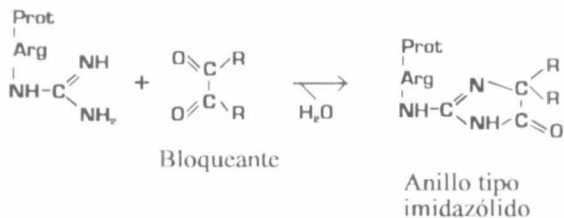
El grupo guanidilo de la arginina es el responsable de la reacción con los grupos cetónicos del reactivo NQS. Como testigo de la reacción se usa un corte previamente tratado con BENZIL (difenil etanodiona).



Difenil Etanodiona

El Benzil reaccionaría de forma similar al NQS impidiendo, pues, la reacción subsiguiente de este último reactivo. La diferencia entre la acción del benzil y la del NQS es que, mientras el NQS da una coloración roja con los restos guanidinos, el producto de reacción con el Benzil es incoloro.

Según Gutiérrez (1991), la reacción con el Benzil procedería como sigue:



Como el pH a que se realiza esta reacción es, generalmente, mayor de

10, al que los restos guanidilos no están protonizados, se formará un complejo con un anillo de tipo imidazólico.

Método de Lillie (1971) para la demostración del grupo guanidilo de la arginina.

Preparación de los reactivos

NQS 100.0 mg
 Hidróxido bórico 0.7 g Mezclar y usar inmediatamente.
 Agua destilada 40.0 ml

- (A). Benzil 100 mg
 Etanol caliente 20 ml
 (B). Hidróxido bórico 0.7 g
 Agua destilada 20.0 ml

Mezclar (A) y (B) una vez disuelto el benzil (el hidróxido bórico no se disuelve totalmente) y usar inmediatamente.

NOTA: La fórmula original da para el hidróxido bórico 1,5 g, pero nosotros preferimos usar 0,7 g, que todavía es una solución saturada, con buenos resultados.

Procedimiento:

1. Llevar dos cortes al agua, después de desparafinar e hidratar.
2. Introducir uno de los cortes en la solución del benzil 1 hora a temperatura ambiente.
3. Lavar en acetato sódico al 1%, durante 30 segundos y después en agua destilada.
4. Introducir los dos cortes, el tratado con benzil y el no tratado, en el reactivo NQS recién preparado, y dejar 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.
5. Lavar en acetato sódico al 1% durante 30 segundos y en agua destilada a continuación. Deshidratar y montar.

NOTA: El reactivo NQS se prepara cuando los cortes están en agua

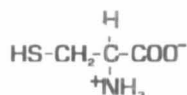
destilada, listos para pasar a este reactivo, ya que la solución de NQS se deteriora rápidamente.

Resultados.

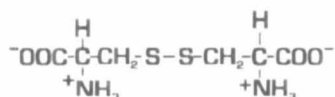
Los lugares ricos en arginina se tiñen de color rojo, de intensidad que depende de la riqueza en este aminoácido. El corte tratado con benzil debe ser totalmente negativo. Las proteínas básicas nucleares (histonas), así como otras muchas proteínas básicas, que deben esta basicidad a la arginina, dan una reacción positiva, así como los gránulos de las células de Paneth, células somatotropas de la hipófisis, etc.

3. Demostración de grupos sulfhidrilos y disulfuros

Los grupos sulfhidrilos forman parte de los restos laterales de las proteínas, como componentes del aminoácido cisteína.



Por otra parte, como la estructura terciaria de las proteínas se mantiene mediante la formación de puentes disulfuros (-S-S-), entre dos restos cisteína cercanos, con la creación de un complejo que se llama cistina.



es por ello que se habla en Histoquímica de la demostración de sulfhidrilos y disulfuros conjuntamente. Los puentes disulfuros pueden transformarse en sulfhidrilos mediante reducción y éstos en disulfuros por oxidación. Para la demostración de grupos sulfhidrilos se conocen hasta un total de 7 u 8 métodos, entre los que cabe mencionar los siguientes: (1) método de Bennett (1948), que emplea el Anaranjado de Mercurio, (2) método del ferricianuro de Chevremont y Frederic (1943), (3) los métodos de oxidación con ácido perfórmico (Pearse, 1951; Adams y Sloper, 1955), (4) el método del DDD (dihidroxi-dinaftil-disulfuro) de Barnett y

Seligman (1952) y, finalmente, los métodos de las maleimidias, entre los cuales, el mejor es el de Sippel (1973).

En realidad todos estos métodos se pueden reunir en una serie de grupos atendiendo al mecanismo básico a que responden:

1. Métodos que emplean mercuriales orgánicos (método de Bennett).
2. Métodos que emplean la oxidación seguida de colorantes catiónicos (método de Pearse y Adams y Sloper).
3. Métodos basados en el par de óxido-reducción -sulfhidrilo- disulfuro- (métodos de Barnett y Seligman y de Chevremont y Frederic).
4. Métodos que usan maleimidias (método de Sippel).

Los métodos que usan mercuriales orgánicos, como el Anaranjado de Mercurio, se basan en la conocida apetencia de los sulfhidrilos por el mercurio, que dio origen a la denominación de mercaptanes (*mercurium captans*) a los grupos -SH.

Cuando se oxidan los grupos -SH con oxidantes enérgicos como el ácido perfórmico o el peracético, estos grupos pasan a sulfónicos a través de una serie de formas intermedias (sulfínicos, sulfénicos), por lo que, si usamos ahora un colorante catiónico, como el Azul Alciano, a pH ácido (0,5 a 1,0), sólo se teñirán aquellas estructuras donde antes existían grupos -SH.

Los métodos que emplean maleimidias se basan en la afinidad de los grupos -SH por las amidas del ácido maleico; como hemos dicho con anterioridad y, el que ha dado mejores resultados, es el método de Sippel (1973).

Finalmente, de los pares de óxido-reducción, ninguno más específico para los grupos sulfhidrilos que un reactivo que contenga puentes disulfuros. Para ello se ha usado el dihidroxi-dinaftil-disulfuro (abreviadamente DDD), según el método introducido por Barnett

y Seligman (1952). Puestos los grupos -SH del tejido en presencia del reactivo se establecerá un equilibrio, en el que se formarán de nuevo enlaces disulfuros, esta vez entre grupos sulfhidrilos del tejido y la mitad molecular del reactivo reducido, posibilitando la demostración posterior de los -SH tisulares, mediante la formación de un compuesto coloreado.

Un método muy ingenioso es el de Chevremont y Frederic (1943). En este método lo que se aprovecha en realidad es la capacidad reductora de los grupos sulfhidrilos. El reactivo contiene ferricianuro potásico y cloruro férrico, los cuales no pueden reaccionar entre sí, sin embargo, tan pronto como uno de ellos se reduce, el ión férrico pasa a ferroso y reaccionará con el ferricianuro potásico dando un producto de color azul intenso, llamado Azul de Turnbull, que delata la presencia de grupos -SH. Esta técnica, lo que demuestra en realidad es la presencia de grupos reductores, por lo que hacen falta nuevos controles para asegurarse de que se trata de grupos sulfhidrilos.

Método del ácido perfórmico-azul alciano para grupos S-S. (Adams y Sloper, 1956).

Para cortes fijados en formalina e incluidos en parafina.

Preparación de los reactivos.

Preparación del ácido perfórmico.

Acido fórmico al 98%.....	40.0 ml
Agua oxigenada al 30% (110 vols).....	4.0 ml
Acido sulfúrico concentrado.....	0.5 ml

Dejar reposar al menos 1 hora antes de usar y usarla dentro de las 24 horas siguientes.

Preparación del azul alciano.

Azul alciano.....	3 g.
Acido sulfúrico 2N.....	c.s.p. 100 ml de solución.

Disolver calentando hasta 70°C y filtrar cuando esté frío. El pH final de la solución debe ser entre 0.2 a 0.3.

Realización del método

- 1.- Llevar los cortes al agua destilada.
- 2.- Quitar el exceso de agua con papel de filtro.
- 3.- Sumergir los cortes en el ácido per fórmico durante 5 minutos, después de haber agitado enérgicamente para extraer el gas disuelto.
- 4.- Lavar suavemente con agua de la llave durante 10 minutos.
- 5.- Enjuagar en etanol al 70% y después en etanol absoluto, secando con papel de filtro para aplanar las arrugas; después enjuagar con agua de la llave.
- 6.- Calentar a 50 o 60°C hasta que los cortes estén secos.
- 7.- Enjuagar de nuevo en etanol absoluto y después en agua de la llave un minuto.
- 8.- Teñir con la solución de Azul Alciano durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 9.- Lavar 5 minutos en agua de la llave.
- 10.- En este momento se puede contrateñir si se desea.
- 11.- Deshidratar, aclarar y montar en cualquier montante sintético.

Resultados: Las estructuras que contengan 4% o más de cistina se tiñen de color azul de mayor o menor intensidad, dependiendo del contenido en cistina.

Método del ferricianuro férrico para grupos SH (Chevremont y Frederic, 1943).

Los autores recomiendan fijaciones cortas en formalina, sin sobrepasar las 24 horas.

Reactivos:

- Sulfato férrico al 1% 30 ml
- Ferricianuro potásico 0,1%. 10 ml
- El pH debe ser 2.4.

Método

- 1.- Llevar los cortes al agua destilada.
- 2.- Sumergir los cortes en tres baños del reactivo por un total de 20-25 minutos.
- 3.- Lavar abundantemente en agua destilada.
- 4.- Contrateñir los núcleos con algún colorante rojo (Rojo Nuclear); opcional.
- 5.- Deshidratar, aclarar y cubrir con un montante sintético.

Resultados: Los lugares que contengan sulfhidrilos se tiñen en azul y los núcleos en rojo.

Bloqueo de grupos sulfhidrilos

Si queremos asegurarnos de un resultado positivo, con uno cualquiera de los métodos que se acaban de mencionar, como atribuible a la presencia de grupos sulfhidrilos, debemos usar el bloqueo de estos grupos con mercuriales orgánicos, por ejemplo, que no den reacciones coloreadas. Un resultado negativo después de este tipo de bloqueo es demostrativo de la presencia de grupos sulfhidrilos.

Reducción de grupos disulfuros

Para la reducción de grupos disulfuros se han empleado una serie de métodos, entre los que mencionaremos el ácido tioglicólico y el tioglicolato sódico y, mejor aún, el dithiothreitol o el dithioeritritol. Una reacción para sulfhidrilos después de la reducción demuestra los sulfhidrilos preexistentes más los derivados de la reducción de los disulfuros.

Bibliografía

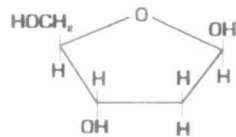
- ADAMS, C.W.M. *A p-dimethylaminobenzaldehyde-nitrite method for the histochemical demonstration of tryptophan and related compounds.* J. Clin. Path. 10: 56-57, 1957.
- ADAMS, C.W.M., SLOPER, J.C. *The hypothalamic elaboration of posterior pituitary principles in man, the rat and dog. Histochemical evidence derived from a performic acid-alcian blue reaction for cystine.* J. Endocrin. 13: 221-228, 1956.
- BARNETT, R.J., SELIGMAN, A.M. *Demonstration of protein-bound sulphhydryl and disulfide groups by two new histochemical methods.* J Nat Cancer Inst 13: 215-216, 1952.
- BARNETT, R. J., SELIGMAN, A. M. *Histochemical demonstration of protein-bound sulphhydryl groups.* Science 116: 323-327, 1952.
- BENNETT, H. S. *The demonstration of thiol groups in certain tissues by means of a new colored sulphhydryl reagent.* Anat. Rec. 110: 231-247, 1951.
- CHEVREMONT, M., FREDERIC, J. *Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydryle. Application à l'épiderme, au poil et à la levure.* Arch Biol 54: 589-605, 1943.
- GLENNER, G.G., LILLIE, R.D. *The histochemical demonstration of indole derivatives by the post-coupled p-dimethylaminobenzylidene reaction.* J. Histochem. Cytochem. 5: 279-295, 1957.
- GUTIERREZ, M. *Temas de citohistoquímica. II. Reacción química del bloqueo del grupo guanidilo de la arginina.* An. R. Acad. Cir., Cádiz (Spain). XXVII, 1-2: 143-147, 1991.
- LILLIE, R.D. PIZZOLATO, P, DESSAUER, H.C, DONALDSON, P.T. *Histochemical reactions of tissue arginine sites with alkaline solutions of beta-naphthoquinone-4-sodium sulphionate and other O-quinones and oxidized O-diphenols. A possible mechanism of the Sakaguchi reaction.* J. Histochem. Cytochem. 19: 487-497, 1971.
- PEARSE, A.G.E. *The histochemical demonstration of keratin by methods involving selective oxidation.* Quart J Microsc Sci 92:343, 1951
- SAKAGUCHI, S. *Über eine neue Farbenreaktion von Protein und Arginin.* J. Biochem. (Japan) 5: 25-31, 1925.
- SIPPEL, T. O. *The histochemistry of thiols and disulphides. I. The use of N-(4-aminophenyl) maleimide for demonstrating thiol groups.* Histochem. J. 5: 413-423, 1973.

Tema 12. estructura química de los ácidos nucleicos

El ácido desoxirribonucleico

El ADN (ácido desoxirribonucleico), cuya estructura fue dilucidada por Watson y Crick en 1953, está compuesto por tres elementos: un azúcar, la desoxirribosa, cuatro bases, dos púricas (adenina y guanina) y dos pirimidínicas (timina y citosina) y el ácido fosfórico. En el ARN el uracilo, base pirimidínica, sustituye a la timina.

El azúcar en cuestión, la desoxirribosa, tiene la estructura siguiente:



Beta-D-desoxirribosa

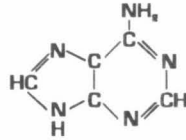
Este azúcar, que resulta de la sustitución del grupo -OH del carbono 2 de la ribosa por un H, se une con otra unidad de desoxirribosa mediante el ácido fosfórico.



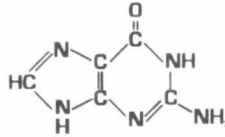
Acido fosfórico

Este ácido establece puentes entre el carbono 5 de una molécula de desoxirribosa y el carbono 3 de la siguiente.

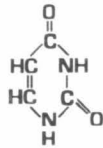
Finalmente, las bases púricas y las pirimidínicas tienen las estructuras siguientes:



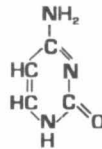
Adenina



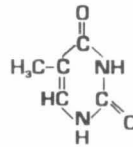
Guanina



Uracilo

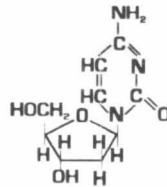


Citosina



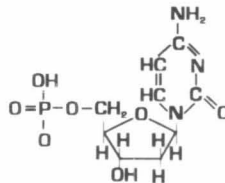
Timina

Una cualquiera de estas bases se une al carbono 1 del azúcar por el N 1 de las pirimidinas o por el N 9, en el caso de las púricas, como se indica a continuación, formando lo que se llama un nucleósido.



Nucleósido

Cuando el carbono 5 del azúcar es portador además, de un resto fosfórico, recibe el nombre de nucleótido,



Nucleótido

Insistimos en esta estructura con el esquema siguiente:

BASE + AZUCAR = NUCLEOSIDO

BASE + AZUCAR + AC. FOSFORICO = NUCLEOTIDO

Como decíamos anteriormente, los azúcares se unen mediante los restos fosfóricos, entre el C5 de un azúcar y el C3 del azúcar siguiente. Las bases se disponen hacia el lado opuesto al de los restos fosfóricos. El ADN total es un polímero de nucleótidos, pero su constitución completa es bicatenaria, es decir, que contienen dos de estos polímeros, enrollados uno alrededor del otro, de manera que las bases quedan hacia el eje longitudinal de esta espiral. Las bases se enfrentan siempre, una púrica a una pirimidínica: para ser más exacto, a la adenina se opone siempre la timina, y a la guanina se opone la citosina en el ADN. Las uniones entre estos dos grupos de bases se establecen por medio de enlaces de hidrógeno.

Chargaff (1950, 1951) había descubierto que (a) la suma de los nucleótidos purínicos es igual a la suma de los pirimidínicos, (b) la relación molar de la adenina a la timina era igual a 1, y (c) la relación molar de la guanina a la citosina era también igual a 1. Con estos y otros datos pudieron Watson y Crick obtener en 1953 el modelo del ADN que les valió el premio Nobel. Este descubrimiento puso alerta inmediatamente a los investigadores en este campo, sobre la posibilidad de la existencia de un código que enlazara las cuatro bases en sus posibles combinaciones, con los 20 aminoácidos que deberían estar codificadas por el ADN.

Según datos obtenidos en el texto de Alberts y cols. (1983) y considerando que una cadena de ADN que contenga n nucleótidos puede presentar 4^n secuencias diferentes posibles, el ADN de un animal encierra una información genética equivalente a un libro de 500,000 páginas.

El ARN tiene una estructura similar el ADN pero se diferencia en una serie de puntos: (a) el azúcar es la ribosa y no la desoxirribosa; (b) el uracilo sustituye a la timina; (c) el ARN tiene una sola hebra aunque en algunas zonas puede establecerse el emparejamiento entre dos secuencias complementarias al azar.

Bibliografía

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York-London. 1994.

CHARGAFF, E. *Chemical specificity of nucleic acid and mechanism of their enzymatic degradation*. *Experientia* 6: 201-209, 1950.

WATSON, J.D., CRICK, F.H.C. *Molecular structure of nucleic acid. A structure for deoxyribose nucleic acid*. *Nature* 171: 737-738, 1953.

Tema 13. Histoquímica de los ácidos nucleicos

Introducción

Existe un amplio repertorio de técnicas histoquímicas para la demostración de los diferentes componentes de los ácidos nucleicos, pero nosotros no vamos a referirnos aquí más que a dos de ellas: la técnica de Feulgen-Rosenbeck (1924) y la técnica del verde de metilo-pironina de Kurnick (1955).

Técnica de Feulgen-Rosenbeck

Esta técnica introducida en 1924 por los mencionados autores aprovecha la creación de grupos aldehídos, obtenidos mediante hidrólisis ácida de las ribosas del ácido desoxirribonucleico, para demostrarlos después con el reactivo de Schiff, el mismo que se usa en la reacción del PAS.

El método es muy específico, hasta el punto de que usándolo, una serie de autores han podido demostrar las variaciones cuantitativas que sufre el ADN en los diferentes estadios normales y patológicos.

Su realización es sencilla pero requiere de cuidadosa programación.

Procedimiento:

1. Llevar los cortes al agua en la forma acostumbrada.
2. Previamente se han colocado en la estufa a 60°C, dos frascos de Coplin, uno conteniendo una solución de HCl 0,1 N y el otro simplemente agua destilada. Una vez asegurados de que, tanto la solución de HCl, como la del agua destilada, están a 60°C,
3. Se introducen los cortes en el agua destilada una media hora, tras

lo cual,

4. Se ponen en el HCl 0,1 N donde se tienen 8 minutos exactamente.
5. Pasado el tiempo que se indica, se sacan los cortes y se lavan abundantemente en agua corriente y luego en agua destilada.
6. Se cubren con el reactivo de Schiff, en un puente de tinción, durante 10 minutos,.
7. Finalmente, se lavan abundantemente al chorro del agua corriente durante otros diez minutos y posteriormente en agua destilada.
8. Se deshidratan, se aclaran y se cubren.

Resultados:

La cromatina se tiñe de color rojo magenta. El tiempo de hidrólisis depende de la fijación pero para el material de rutina, fijado en formaldehído, 8 minutos es el indicado.

Técnica del verde de metilo-pironina

Esta técnica, introducida por Kurnick (1955), es de gran utilidad para estudiar el contenido de ARN citoplasmático y junto con tratamiento previo con ARNasa, que hace negativa la coloración de la pironina, constituye el test de Brachet(1940), lo que le dio a la técnica un valor histoquímico.

El verde de metilo es un colorante del grupo del trifenilmetano que va siempre contaminado con un derivado de oxidación, el violeta de metilo. Aunque algunos autores, como Lillie (1965), no dan importancia a este hecho, otros preconizan la extracción del violeta de metilo con cloroformo, mediante un embudo de separación. Nosotros lo hacemos normalmente así, con muy buenos resultados.

La solución de verde de metilo al 2%, se agita repetidas veces en un embudo de separación, con cloroformo hasta que éste toma un intenso color violeta. Descartado el cloroformo, se repite la operación tantas veces como sea necesario hasta que el cloroformo salga incoloro. La solución de verde de metilo se guarda en frasco color topacio, sobre

cloroformo, recién tomado de la botella original, y se etiqueta convenientemente.

La pironina es un derivado del xanteno, que también conviene purificar en forma similar a como lo hacemos con el verde de metilo, a partir, en este caso, de su solución al cinco por ciento.

El método de tinción es como sigue, según Pearse (1972).

Solución A	Pironina acuosa extraída	17,5 ml
	Verde de metilo extraído	10,0 ml
	Agua destilada.....	250,0 ml

Solución B Amortiguador acetato 0,2 M pH 4,8

En el momento de usar se mezclan a partes iguales las soluciones A y B. La solución dura una semana y no debe usarse más tiempo.

Procedimiento:

1. Llevar los cortes al agua.
2. Teñir con la mezcla anterior 10 minutos a 24 horas.
3. Lavar muy brevemente con agua destilada.
4. Secar los cortes con papel filtro.
5. Deshidratar rápidamente en acetona, acetona-xileno a partes iguales, acetona-xileno al 10%, dos cambios de xilenos y montaje con DPX.

Resultados:

La cromatina se tiñe en un color verde, o verde azulado y el ARN en rojo. Si los cortes se tratan previamente con ARNasa el color rojo de la pironina desaparece.

Modificación de Kurnick al verde metilo-pironina

La modificación de Kurnick (1955), que se da a continuación, no usa el amortiguador acetato, por lo que el procedimiento es más simple.

Procedimiento de Kurnick:

1. Llevar los cortes al agua.
2. Teñir 6 minutos en 12,5 ml de la solución de pironina, más 7,5 ml de la solución de verde de metilo más 30 ml de agua destilada.
3. Secar con papel filtro.
4. Deshidratar con dos cambios de butanol normal de 5 minutos cada uno (no usar butanol terciario).
5. Sumergir en xileno 5 minutos.
6. Sumergir en aceite de cedro 5 minutos.
7. Montar con Permout.

Finalmente diremos que nosotros teñimos con la solución de cada uno de los colorantes por separado, durante 10 minutos cada uno, con lavados intercalados con agua destilada y deshidratamos como habitualmente, pero en forma rápida e iniciando con alcohol de 96 por ciento.

Bibliografía

BRACHET, J. *The use of basic dyes and ribonuclease for the cytological detection of ribonucleic acid.* Quart. J. Micr. Sci. 94: 1-10, 1953.

FEULGEN, R. ROSENBECK, H. *Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nukleinsäure von Typus der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende elective Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.* Z. Phys. Chem. 135: 203-248, 1924.

KURNICK, N.B. *Pyronin Y in the methyl green-pyronin histological stain.* Stain Technol. 30: 213-230, 1955.

LILLIE, R.D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry.* Tercera edición. The Blakinston Division. McGraw-Hill Book Co., New York, 1965.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied.* Tercera edición. Churchill- Livingstone. London. 1972.

Tema 14. Introducción a la bioquímica de los lípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas, insolubles en el agua, que se pueden extraer de las células con solventes apolares, como el éter, cloroformo o benceno. Hay varias clases y subclases de lípidos, que sirven a cuatro funciones diferentes:

- (1) componentes de membranas,
- (2) almacenaje intracelular de combustibles metabólicos,
- (3) transporte de combustible y
- (4) componentes de la superficie celular que desempeñan funciones importantes de reconocimiento, especificidad e inmunidad tisular.

Entre las sustancias clasificadas como lípidos se encuentran algunas vitaminas y hormonas.

Clasificación de los lípidos

Los lípidos se pueden clasificar muy adecuadamente por la estructura de su molécula en (1) lípidos complejos o saponificables y (2) lípidos sencillos o no saponificables. Los primeros que contienen ácidos grasos como componentes de su molécula, incluyen a los acilglicéridos, los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y las ceras. Las ceras no nos interesan desde el punto de vista de la biología celular. Los sencillos no contienen ácidos grasos en su molécula y no son por tanto saponificables. La saponificación es la propiedad de producir jabones con los álcalis.

Los ácidos grasos, componentes importantes de los lípidos complejos, están constituidos por una cadena hidrocarbonada larga con un carboxilo terminal. La cadena puede ser saturada o tener uno o más enlaces dobles. Los más frecuentemente encontrados en el reino animal son de número par de átomos de carbono, principalmente, entre 16 y 20 átomos de carbono; por ejemplo, el ácido palmítico con 16 y el oleico con 18 átomos de carbono. Los mamíferos pueden sintetizar todos los ácidos grasos menos el linoleico y el gamma-linolénico, que se consideran esenciales en la dieta, y se obtienen de los vegetales. Ambos tienen 18 átomos de carbono pero, mientras el linoleico tiene 2 dobles enlaces el linolénico tiene 3. Estos dos ácidos grasos esenciales son precursores de las prostaglandinas que son fundamentales para ciertas funciones fisiológicas importantes.

Acilglicéridos

Son ésteres de ácidos grasos y de la glicerina. Cuando los tres hidroxilos de la glicerina están esterificados con ácidos grasos, se les llama triacilglicéridos, que son los principales componentes de los lípidos de depósito de la célula animal y vegetal.

Fosfoglicéridos

A esta clase de lípidos complejos se le ha llamado también glicerilfosfátidos. Son los principales componentes de las membranas celulares. En estos compuestos uno de los grupos hidroxilos primarios de la glicerina se halla esterificado por el ácido fosfórico y los demás lo están por ácidos grasos. Como estos compuestos tienen una cabeza polar, -el ácido fosfórico- y dos cabezas apolares, -los ácidos grasos-, se llaman anfipáticos.

Unidas al ácido fosfórico puede ir la etanolamina o la colina, y tendremos entonces los fosfoglicéridos de etanolamina y los fosfoglicéridos de colina, que antiguamente se llamaban cefalina y lecitina respectivamente.

Esfingolípidos y Glicolípidos

Son lípidos complejos que están compuestos por

- (1) esfingosina,
- (2) una o dos cadenas de ácidos grasos y
- (3) una cabeza polar.

Los más abundantes son las esfingomielinas cuya cabeza polar está compuesta por fosforil-etanolamina o fosforil-colina. La esfingosina se halla unida mediante su grupo amino a un ácido graso insaturado constituyendo una estructura que recibe el nombre de ceramida y es el compuesto básico de todos los esfingolípidos.

Hay un grupo de esfingolípidos con restos azucarados como cabezas polares y que por ello reciben el nombre de glucoesfingolípidos.

Entre estos tenemos los cerebrósidos que contienen galactosa y los sulfátidos que contienen galactosa sulfatada.

Finalmente, sólo vamos a mencionar un grupo muy importante de glucoesfingolípidos, los gangliósidos, que contienen uno o más restos de ácido siálico, lo que le da un carácter ácido a la cabeza polar. Estos compuestos van unidos a la ceramida mediante restos glucosa, pero pueden además contener restos galactosa y N-acetilgalactosamina, aparte de los restos ácidos siálicos y parecen participar en la transmisión de la información a través de la membrana (Fishman y Brady, 1976).

Monocapas, Bicapas y Micelas Lipídicas

En sistemas acuosos, los lípidos, principalmente, los fosfolípidos, que poseen una "cola" apolar y una "cabeza" polar, se disponen con sus colas apolares hidrófobas en dirección opuesta a la superficie del agua y sus cabezas polares dirigidas precisamente en esa dirección. Esta disposición lleva, cuando éstas moléculas están en un medio acuoso, a la formación de micelas.

La importancia de esta observación es porque permite el estudio de las propiedades físicas de estos modelos tan similares a las membranas ce-

lulares. Son permeables al agua, pero relativamente impermeables a los cationes (Na, K) y aniones (Cl). Tienen una gran capacitancia y resistencia eléctrica ya que la capa hidrocarbonada continua tiene una baja constante dieléctrica y es un conductor muy pobre. Estas y otras muchas observaciones han llevado al conocimiento actual de las membranas biológicas, cuyo estudio no podemos abordar aquí.

Bibliografía

FISHMAN, P.H., BRADY, R.O. *Biosynthesis and function of gangliosides*. Science 194: 906-915, 1976.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. *Principles of Biochemistry*. 2nd ed., Worth, New York, 1993.

STRYER, L. *Biochemistry*. W.H. Freeman & Co., New York, 1988.

Tema 15. Métodos histoquímicos e histofísicos para la demostración de lípidos.

Introducción

Como dice ADAMS, en su libro *Neurohistochemistry* (1959), quizás el mejor sobre la materia, "los métodos histoquímicos dan información más útil y segura sobre la naturaleza de los lípidos, en cortes histológicos, que los métodos histofísicos".

Sin embargo, los métodos histofísicos tienen su utilidad en un examen preliminar y, siempre según el autor citado, el Negro Sudán es el más informativo de todos. Los métodos histoquímicos dan una información detallada de la naturaleza química de los lípidos tisulares.

Existen dos problemas, sin embargo, en el estudio de los lípidos: (1) cuando se van a demostrar fosfolípidos hidrófilos con métodos histoquímicos, la localización de aquellos, en el seno de lípidos hidrófobos, puede hacer inaccesible a los reactivos acuosos, su llegada a ellos y, por tanto, su demostración y (2) los métodos de extracción de lípidos, preconizados como testigos negativos de éstas reacciones, carecen de sentido, según Adams, ya que normalmente están unidos a proteínas o polisacáridos, de tal manera, que es imposible su extracción. Por supuesto, la extracción de las grasas neutras de depósito es, por el contrario, muy fácil.

Método del tetróxido de osmio-alfa naftilamina para fosfolípidos, ésteres del colesterol y ésteres de los triglicéridos (Adams, 1959)

1. Fijar los cortes en formaldehído-calcio (acetato de calcio al 1% en formalina al 10% o cloruro cálcico al 1% en formalina al 10%, mantenida sobre exceso de carbonato cálcico). Aunque los autores no especifican tiempo ni temperatura, 24 horas a temperatura ambiente puede ser adecuado.

2. Hacer cortes en el microtomo de congelación de 10 a 15 micras.

3. Tratar los cortes flotantes durante 18 horas, en una mezcla de 1 parte de tetróxido de osmio al 1% y tres partes de $KClO_3$ al 1%, contenidos en un recipiente herméticamente sellado y en campana de extracción.

4. Lavar los cortes en agua destilada 10 minutos y montarlos en portas.

5. Tratar los cortes con una solución acuosa saturada de alfa-naftilamina en una incubadora a 37°, de 10 a 15 minutos. La solución saturada de alfa-naftilamina se prepara añadiendo este reactivo al agua destilada, previamente calentada a 40° y filtrando después.

NOTA: Hay que tener la precaución de que la alfa-naftilamina sea purísima, pues, si no lo es, puede ir contaminada con la forma beta que es un carcinógeno.

6. Lavar los cortes con agua destilada durante 5 minutos.

7. Contrateñir con Azul Alciano al 0,5% en ácido acético al 3%.

8. Montar en gelatina-glicerina.

Resultados:

Los fosfolípidos se tiñen de rojo-anaranjado, mientras que el colesterol y ésteres de los triglicéridos se tiñen de negro.

Método de la NaOH-OTAN para esfingomielina (Adams y Bayliss, 1963)

Entre los pasos 1 y 2 del método anterior hay que insertar lo que sigue:

1a. Hidrolizar cortes flotantes en NaOH 2N a 37°C durante 1 hora.

1b. Lavar suavemente en agua, enjuagar en ácido acético al 1% durante 1 minuto y lavar de nuevo en agua.

Resultados:

La esfingomiélin y otros fosfolípidos álcali resistentes se tiñen de rojo anaranjado. Los fosfoglicéridos álcali lábiles, son destruidos por la hidrólisis. Los ésteres del colesterol y de los triglicéridos se tiñen de negro.

Método del cobre-ácido rubeánico para los ácidos grasos (Holczinger, 1959).

1. Cortar tejido sin fijar en el criomicrotomo.
2. Secar al aire las secciones, montadas en portas.
3. Tratar con acetato cúprico acuoso al 0,005% de tres a cinco horas.
4. Lavar dos veces, 10 segundos cada vez, en EDTA disódica al 0,1% a pH
5. Lavar 10 minutos en agua destilada.
6. Sumergir los cortes en ácido rubeánico al 0,1% en etanol de 70%, durante tres minutos. Disolver el ácido rubeánico en etanol absoluto, calentar ligeramente y añadir agua para que quede al 70%.
7. Lavar algunos minutos en etanol al 70% y después en agua destilada.
8. Deshidratar, aclarar y montar.

NOTA: Se pueden emplear también cortes fijados en formalina y cortados en el microtomo de congelación.

Resultados:

Los ácidos grasos se tiñen en color verde negruzco.

Métodos que usan colorantes solubles en las grasas

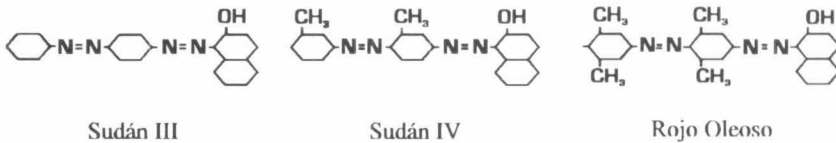
Las técnicas usuales para la demostración de grasas neutras, esto es, de aquellas que se encuentran en el interior de las células, en forma de depósito o almacenamiento, son técnicas con un fundamento físico y no químico; esto es, no se trata de técnicas de coloración sino de solubilización.

El principio físico en que se basan es el del producto de solubilidad. En efecto, si el colorante es más soluble en los componentes grasos de tejidos y células, que en el líquido en el que van disueltos, cuando la

solución del colorante se ponga en contacto con el tejido habrá una transferencia de la sustancia colorante, desde la solución hacia los componentes grasos del tejido.

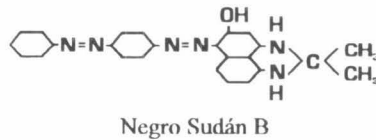
Los colorantes bisazo. Los sudanes

Para este propósito de la coloración de componentes grasos, se han usado tradicionalmente, desde 1896, los Sudanes, especialmente el Sudán III y el Sudán IV, el Negro Sudán y, más recientemente, el Rojo Oleoso O.



Cuando el mismo esqueleto lleva cuatro grupos metilos se trata del Rojo Oleoso O, el cual por tener más grupos CH₃ que los anteriores, es considerado como el mejor "colorante" de grasas hasta ahora conocido (Lillie, 1944).

Finalmente hay que mencionar el Negro Sudán B,



Este colorante, sin embargo, debido a los dos grupos aminos secundarios que posee, puede reaccionar químicamente con componentes tisulares. La sudanofilia estable de los leucocitos (Lillie y Burtner, 1953) es de esta naturaleza. Esto se puede evitar acetilando el colorante, pero esto introduce una complicación que lo hace menos útil para la rutina del laboratorio.

Métodos para la tinción de grasas neutras con rojo Oleoso O, según Lillie (1944).

El método para la tinción de grasas neutras con Rojo Oleoso O (en

inglés, *Oil Red O*) es como se da a continuación: Se puede usar material fijado en formalina de rutina, cortados en el microtomo de congelación con CO₂ o en material sin fijar, congelado con isopentano a -160° y cortado en el criomicrotomo. Nosotros hemos usado este último procedimiento durante muchos años con buenos resultados.

La solución madre de Rojo Oleoso O se prepara como sigue:

Sol. A.- Rojo Oleoso O 0.5g
Isopropanol al 98% 100.0 ml

En el momento de usar se prepara una dilución a partir de ésta, como sigue:

Sol B.- Solución madre 6 ml
Agua destilada 4 ml

La solución así preparada, a la que llamaremos solución de trabajo, se deja estar unos 10 a 15 minutos y luego se filtra, según Lillie (1944): El procedimiento de tinción es el que se da a continuación:

- 1.- Cubrir los cortes obtenidos en el criomicrotomo y dejados secar al aire unos 10 minutos con la solución B filtrada sobre el corte.
- 2.- Lavar con agua destilada
- 3.- Teñir con hematoxilina de Harris acetificada durante 30 segundos.
- 4.- Virar la hematoxilina al chorro del agua de la llave unos 10 minutos.
- 5.- Montar en gelatina-glicerina.

Resultados .- Las grasas neutras se tiñen de rojo y los núcleos en color azul.

Bibliografía

ADAMS, C.W.M. Ed. *Neurohistochemistry*. Elsevier Publishing Co., New York, 1965.

ADAMS, C.W.M, BAYLISS, O.B. *Histochemical observations on the localization and origin of sphingomyelin, cerebroside and cholesterol in the normal and atherosclerotic human artery*. J. Path. Bact. 85: 113-149, 1963.

HOLCZINGER, L. *Histochemischer Nachweis freier Fettsäuren*. Acta histochem. 8: 167-175, 1959.

LILLIE, R.D. *Various oil soluble dyes as fat stains in supersaturated isopropanol technic*. Stain Technol. 19: 55-58, 1944.

LILLIE, R.D, BURTNER, H.J. *Stable sudanophilia of human neutrophil leukocytes in relation to peroxidase and oxidase*. J. Histochem. Cytochem. 1: 8-26, 1953

Tema 16. Introducción a la histoquímica de las enzimas

Definición

Las enzimas son proteínas cuya acción biológica consiste en la catálisis de las reacciones del metabolismo, las cuales transcurrirían muy lentamente sin su intervención. El concepto de catálisis implica la influencia del catalizador en la reacción acelerándola, sin consumirse en dicho proceso. El proceso de la catálisis enzimática es más complejo de lo que esta definición puede implicar, pero no podemos profundizar aquí en el mismo. Ahora sólo daremos algunas notas útiles para la realización de las técnicas histoquímicas que demuestran actividades enzimáticas. Insistimos aquí en que lo que se demuestra con los métodos histoquímicos para enzimas no es la proteína en sí, sino sólo su actividad enzimática.

Preparación del tejido ¿Fijar o no Fijar?

Hay varias formas de preparar el tejido para la demostración de actividades enzimáticas y la elección de una u otra depende de la enzima de que se trate. Enzimas diferentes resisten de forma diferente la acción del fijador y no todos los fijadores actúan de la misma manera. Hablando de una forma general, todos los fijadores poseen un efecto deletéreo sobre las actividades enzimáticas y es necesario asegurarse, en un caso determinado, cual de varios fijadores tiene un efecto menos nocivo, a una determinada temperatura y en un período de tiempo dado. Consecuentemente, la decisión última en esta elección es un compromiso entre el efecto menos nocivo para la actividad enzimática, la cantidad máxima de ésta que se conserva y la mejor morfología posible. Independiente-

mente de cuán grande sea la pérdida de actividad aún es posible demostrar la actividad restante, siempre que el método histoquímico sea lo suficientemente sensible.

Entre las varias posibilidades existentes, los tejidos pueden ser:

- (1) congelados sin fijar,
- (2) congelados después de la fijación,
- (3) congelados primero y después fijados y,
- (4) fijados e incluidos en parafina o en plásticos.

La mayor pérdida de actividad enzimática la sufre el tejido después del cuarto procedimiento. Una de las primeras enzimas en ser demostrada en tejidos con métodos histoquímicos fue la fosfatasa alcalina y se empleó la fijación en acetona y la inclusión en parafina. A pesar de esto, la impresión general de los histoquímicos ha sido, durante un cierto período de tiempo, que la fijación perjudicaba seriamente la demostración de la actividad enzimática.

Congelación sin postfijación

El criterio más importante para saber que una muestra de tejido ha sido bien congelada es cuando el tamaño de los cristales de agua son tan pequeños que no se pueden ver al microscopio óptico. Este sería un buen criterio para trabajar a nivel de microscopía de luz, es decir, cuanto más pequeños sean los cristales mejor será el resultado. Para obtener este objetivo, la caída de temperatura debe ser tan rápida como sea posible. Cuando se sumerge un trozo de tejido en un líquido congelante (nitrógeno líquido, metilbutano, etc.) la caída de temperatura no es homogénea en toda la pieza sino que lleva un tiempo, que se puede medir, por corto que sea; esto es, alcanzar la misma temperatura en el centro de la pieza, que la que se alcanza, en el acto, en la periferia, lleva un tiempo que se puede medir (Moline y Glenner, 1964). Cuanto mayor sea ese tiempo, mayor el tamaño de los cristales de agua y mayores los artefactos de congelación.

El nitrógeno líquido (-190°C; 85°K) produce mucho artefacto, por la ebullición que rodea a la pieza cuando se introduce en él; para evitar esto Moline y Glenner (1964) aconsejaron espolvorear la pieza con polvo de talco de buena calidad. Nosotros usamos este método durante algún tiempo pero pronto empezamos a congelar las piezas con isopentano (metilbutano), como se especificó en el Tema 2.

A pesar de todo, los cortes de material congelado, obtenidos en la mejor forma posible, en un criomicrotomo, pueden perder la enzima por solubilización en el medio de incubación, si se introducen en un medio de incubación para la demostración de una actividad enzimática determinada. Sin embargo, esto no ocurre con frecuencia, y ello depende, en gran medida, de la localización celular de la enzima. Si la enzima está fija en una membrana celular, plasmática o interna, o en algún organito celular, es menos probable que se disuelva en el medio de incubación, que cuando forma parte del citosol.

Como ejemplo de lo que acabamos de decir, mencionaremos el caso de la enzima *succinodehidrogenasa* y de las diaforasas, que deben demostrarse en cortes de material congelado, sin fijar, obtenidos en el criomicrotomo, secadas al aire, e incubadas 30 minutos a 37°C, en el medio de incubación correspondiente. Sin embargo, la actividad de enzimas, como la acetilcolinesterasa y la glucosa-6-fosfatasa se demuestra preferentemente en cortes obtenidos en el criomicrotomo y fijados en formaldehído, antes de la incubación en el medio adecuado. Con esto hemos cubierto la posibilidad (3).

Fijación antes de congelar

En nuestra experiencia es muy difícil obtener buenos cortes en el criomicrotomo, de material fijado en formalina y congelado después en el mismo criomicrotomo. Nuestra mejor alternativa para la demostración de actividades enzimáticas (fosfatasa alcalinas y ácidas, esterasas, y otras) es usar el método de Holts, *et al.* (1960).

Estos autores fijaban el material en formaldehído-sucrosa, toda la no-

che, en el refrigerador y después transferían a sucrosa-goma acacia o arábica, toda la noche también, a la temperatura del refrigerador. El material tratado de esta forma puede cortarse fácilmente en el criomicrotomo y obtener magníficas secciones con buena conservación de la morfología.

El proceder de estos autores (Holts, *et al*, 1960), según Pearse (1972, pág. 602), es como sigue:

(a) Formaldehído amortiguado:

Formaldehído al 40%	10.0 ml
Amortiguador fosfatos 0.067 M, pH 7,2	50.0 ml
Sucrosa	7.5 g

Disolver la sucrosa y completar hasta un litro con el amortiguador.

(b) Sucrosa-goma arábica o de acacia:

Mezclar en el estado seco, 30 gramos de sucrosa y 1 gramo de goma acacia. Este paso dispersa la goma y evita los grumos durante la solución. Añadir agua destilada hasta completar 100 ml. Almacenar en el refrigerador o añadir un cristal de timol.

Procedimiento:

- (1) Fijar en (a) de 12 a 24 horas, a 0-4°C, trozos delgados de 1 a 2 mm de espesor.
- (2) Lavar brevemente en agua destilada.
- (3) Transferir a (b) de 12 a 24 horas, o más tiempo, a 0-4°C.

Fijación e inclusión en parafina o plásticos

Puesto que Gomori (1939) adaptó su primer método para la demostración de fosfatasa alcalina a material que había sido fijado en acetona e incluido en parafina y puesto que siempre ha habido el deseo y la necesidad de demostrar actividades enzimáticas a nivel de microscopía electrónica, donde la posibilidad de utilizar material congelado era remota

al principio y difícil en la actualidad, los esfuerzos de muchos autores se dirigieron a la demostración de dichas actividades enzimáticas en material fijado preferencialmente en glutaraldehído, que es el fijador más usado en microscopía electrónica. Existe una extensa literatura sobre el tema que habla de los éxitos obtenidos en este campo.

Composición del medio de incubación para la demostración de actividades enzimáticas

Cualquiera que sea la preparación del tejido, los cortes obtenidos pasan en primer lugar al baño de incubación para la demostración de la actividad enzimática correspondiente.

La demostración histoquímica de una actividad enzimática cualquiera consiste básicamente en los siguientes pasos: (1) incubación del tejido, donde se supone que se localiza la enzima, en una solución que contiene el sustrato de la enzima, el cual puede ser el sustrato natural o uno artificial; en este paso esperamos obtener el precipitado de un compuesto químico, en el lugar donde se localiza la enzima, que puede ser coloreado o incoloro; (2) cuando es incoloro hay que convertirlo, en otro coloreado, que revele la localización de la enzima a nivel de microscopía óptica.

Este esquema general, que acabamos de dar, puede ser un poco más complicado, es decir en tres pasos, en lugar de los dos que hemos descrito o como es más frecuente, más simple, al realizar simultáneamente los dos pasos en una sola operación.

Un ejemplo del proceder en dos pasos, es el método de Gomori (1939) para la demostración de la actividad fosfatásica ácida. En el primer paso las secciones que contienen fosfatasa ácida se incuban en un medio que contiene el sustrato, alfa glicerofosfato de sodio, el cual es escindido por la acción de la enzima, liberando el ión fosfato. Como el medio contiene también una sal de plomo en un medio ácido, se precipita un fosfato de plomo en el lugar de localización de la enzima. En un segundo paso, el fosfato de plomo es convertido en sulfuro de plomo de color

negro, mediante el tratamiento de los cortes con sulfuro de amonio. El método original de Gomori (1939) para la demostración de fosfatasa alcalina es un ejemplo de un "método un poco más complicado", ya que el primer precipitado, resultante de la acción de la enzima sobre el sustrato, el glicerofosfato de sodio, es fosfato de calcio (los iones fosfato reaccionan con los iones calcio también presentes en el medio). Este fosfato cálcico es convertido en un segundo paso, en fosfato de cobalto, que es color rosa pálido, pero aún poco coloreado para que se le pueda ver en el microscopio óptico. En un tercer paso el fosfato cálcico se transforma en sulfuro de cobalto de color negro con sulfuro de amonio, con contraste suficiente para revelar la localización de la enzima a nivel de microscopía óptica.

En los dos casos, acabados de explicar, la captura del ión fosfato por los iones plúmbicos o cálcicos, presentes en el medio de incubación, es simultáneo con su liberación por la acción de la enzima, pero el color del precipitado no es suficientemente fuerte para producir un buen contraste al microscopio óptico, por lo tanto su conversión en un precipitado fuertemente coloreado es absolutamente necesario.

Otras alternativas

Hay otras alternativas como, por ejemplo, el uso del alfa-naftol fosfato como sustrato de la fosfatasa alcalina. Cuando este sustrato es escindido por la acción de la enzima, la molécula que queda libre, se unirá a una sal de diazonio, presente en el medio de incubación, para dar un precipitado rojo, que puede verse fácilmente a nivel de microscopía óptica, sin mayor elaboración. Este método se da con detalle en el tema siguiente. Todos los ejemplos dados hasta aquí, se llaman de "captura simultánea", aún cuando en algunos casos el precipitado es incoloro y se necesita de un segundo paso para producir un precipitado coloreado. Una literatura abundante sobre ellos es prueba de que son los más empleados hoy en día. Un principio diferente, llamado en general, técnicas de "copulación post-incubación", se ha usado en la demostración de las siguientes enzimas:

fosfatasa ácida, arilsulfatasas, glucoronidasa y galactosidasa. En este caso, el primer producto de la acción de la enzima es un precipitado lo suficientemente insoluble y no difusible como para permanecer en el lugar donde se localiza la enzima, hasta que se convierta en un colorante de intenso color por copulación con una sal de diazonio.

Bibliografía

GOMORI, G. *Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42: 23-26, 1939.

HOLT, S.J., HOBBIKER, E.L., PAWAN, G.L.S. *Preservation of integrity of rat tissues for cytochemical staining purposes*. J. Biophys. Biochem. Cytol. 7: 383, 1960.

MOLINE, S.W., GLENNER, G.G. *Ultrarapid tissue freezing in liquid nitrogen*. J. Histochem. Cytochem. 12: 777-783, 1964

Tema 17. Histoquímica de las hidrolasas

Definición.- Las hidrolasas constituyen un grupo de enzimas cuya acción consiste en transferir el grupo escindido del sustrato al hidroxilo del agua, de ahí su nombre. En este grupo se incluyen las esterasas, tiolesterasas, fosfatasas, glicosidasas, peptidasas y pirofosfatasas (Dixon y Webb, 1971).

Nosotros vamos a considerar aquí, como ejemplo de lo que se puede obtener en este campo de la histoquímica de las hidrolasas, solamente a las fosfatasas, las cuales históricamente fueron las primeras que hicieron su aparición en la histoquímica enzimática.

Fosfatasa Alcalina

El primer método histoquímico para la demostración de actividades enzimáticas fue introducido en 1939, simultáneamente por Gomori en Chicago y por Takamatsu en Japón, para la demostración de actividad fosfatásica alcalina, aunque Takamatsu lo había publicado previamente en japonés sin gran difusión por los problemas idiomáticos.

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de fosfatos orgánicos.

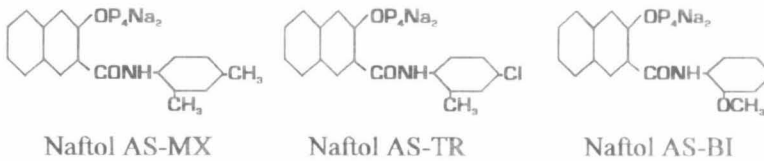


Métodos que usan el resto fosfato

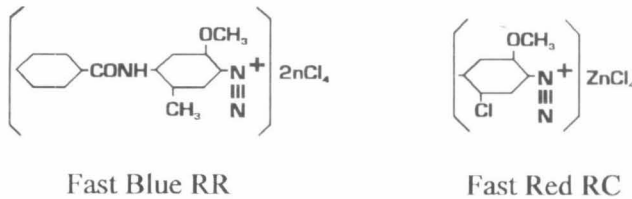
En el método de Takamatsu-Gomori se emplea como sustrato un fosfato orgánico y el grupo fosfato liberado por la acción de la enzima se aprovecha para producir un precipitado con los iones calcio presentes en el medio de incubación, en forma de fosfato cálcico ionizado. En el segundo paso, el calcio del fosfato cálcico precipitado, se hace reaccionar con un nitrato de cobalto, que desplaza al calcio y es sustituido por el cobalto, formándose un precipitado de fosfato de cobalto, de color rosa, pero aún no visible. Este fosfato de cobalto es transformado ahora en sulfuro de cobalto negro, mediante su reacción con sulfuro de amonio.

Métodos que usan el componente alcohólico del sustrato

Posteriormente aparecieron otros métodos, pero el que nos interesa ahora es el método de copulación simultánea con colorantes diazoicos, usando naftoles sustituidos. Burstone (1963) introdujo los ésteres sustituidos siguientes:



Los ésteres fosfatos de estos naftoles sustituidos se usan en solución saturada en dimetilformamida al 2% en amortiguador a pH 8,3., durante 15 a 30 minutos a temperatura ambiente, copulándose posteriormente con algunos de los diazoicos siguientes:



Método para la demostración de actividad fosfatásica alcalina usando los ésteres sustituidos que acabamos de mencionar (Pearse,1972).

La muestra de tejido puede fijarse en formaldehído amortiguado-sucrosa, según Holt, *et al* (1960), y se almacena en sucrosa-goma acacia o arábica hasta el momento en que se va a iniciar la técnica.

Procedimiento:

1. Obtener cortes en el criomicrotomo y secar al aire durante 5 o 6 minutos.
2. Incubar en el medio recién preparado, durante 5 minutos:

Preparación del medio de incubación

Fosfato de naftol AS-BI.....	5.00 mg
Dimetilformamida (DMF).....	0.25 ml
Amortiguador TRIS pH 8,7.....	25.00 ml
Agua destilada.....	25.00 ml
Fast Red Violet LB.....	30.00 mg

Disolver el Naftol AS-BI en la dimetilformamida. Añadir el resto de los componentes en el orden en que se dan, agitar y filtrar antes de usar.

3. Lavar en agua corriente y después en agua destilada.
4. Contrateñir con Hematoxilina de Harris acetificada 30 segundos.
5. Virar la hematoxilina con agua alcalina.
6. Lavar en agua destilada y cubrir con gelatina-glicerina.

Preparación del Amortiguador TRIS pH 8.7

TRIS-HCl.....	0.15 g
Trizma base.....	0.49 g
Agua destilada.....	100.00 ml

Resultados:

Los lugares donde se encuentra la enzima se tiñen intensamente de rojo o de azul según la sal de diazonio usada.

Bibliografía

BURSTONE, M.S. *Enzyme histochemistry and its application in the study of neoplasm*. Academic Press, New York, 1962.

DIXON, M. WEBB, E.C. *Enzymes*. Longman, London, 1971.

GOMORI, G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 42: 23-26, 1939.

GUTIERREZ, M., MONTERO, C. *Citoquímica Sanguínea. Adaptación fácil de la técnica de TAKAMATSU-GOMORI para fosfatasa alcalina y actividad porcentual en el normal*. Laboratorio, sept:214-218,1961

HOLT, S.J. HOBBIER, E.L. PAWAN, G.L.S. *Preservation of integrity of rat tissues for cytochemical staining purposes*. *J Biophys Biochem Cytol.* 7: 383, 1960.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Vol 1, 3rd edition. J & A. Churchill Ltd. London, 1968.

TAKAMATSU, H. *Histologische und biochemische Studien über die Phosphatase. I. Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben*. *Trans Soc Path Jap* 29: 492, 1939.

Tema 18. Histoquímica de las oxidoreductasas

Definición

Las oxidoreductasas son enzimas implicadas en las oxidaciones y reducciones biológicas y, por tanto, en los procesos de respiración celular. Desde este punto de vista el grupo incluye una serie de enzimas que no vamos a considerar ahora; aquí nos ocuparemos tan solo de las deshidrogenasas y diaforasas y, concretamente, de la succinodihidrogenasa y de la NADH-diaforasa. Las deshidrogenasas constituyen el primer miembro de una cadena de enzimas que transfieren electrones desde el sustrato al oxígeno molecular, a lo largo de la cadena respiratoria.

Factores diferenciales con la histoquímica de las hidrolasas

Hay una serie de factores diferenciales entre la histoquímica de las enzimas hidrolíticas y la de las deshidrogenasas. La más importante es el uso del sustrato natural para las oxidoreductasas contra el uso generalizado del sustrato artificial en el caso de las hidrolasas. Aparte del sustrato y del pH, pues no siempre es posible usar el óptimo de la enzima, hay que considerar la necesidad del empleo de cofactores y coenzimas y el uso de las sales de tetrazolio. La fijación fue desterrada del campo de la histoquímica de las deshidrogenasas, al principio, aunque posteriormente se vio que una fijación mínima podría ser útil para algunas enzimas de este grupo. Sin embargo, el componente nuevo en estos medios de incubación es la sal de tetrazolio, que consideramos a continuación con algún detalle.

Sales de tetrazolio

La primera sal de tetrazolio, el cloruro de trifenil tetrazolio, fue preparada por von Pechmann y Runge en 1894. La gran difusión del colorante no reducido hizo imposible su uso. Esto llevó a la búsqueda de otros tetrazolios y así se prepararon el neotetrazolio (NT), el azul de tetrazolio (BT) y una sal de monotetrazolio (INT). Finalmente, se sintetizaron el (NITRO-BT) y el TETRANITRO-BT y Pearse (1957) preparó un nuevo tetrazolio, al que llamó abreviadamente MTT.

El carácter más valioso para que estas sales se usen en estos métodos histoquímicos es la propiedad que tienen de ser solubles e incoloras en estado oxidado e insolubles y coloreadas en estado reducido, recibiendo entonces el nombre de formazanes. Cuando están presentes en el medio de incubación, los hidrógenos desprendidos por la acción de las deshidrogenasas son recogidos por la sal de tetrazolio presente en el medio de incubación, reduciéndose a un formazán coloreado e insoluble, como acabamos de decir.

Los formazanes son capaces de formar quelatos con el Cu, Ni, Co y Ag. Aprovechando esta propiedad, Pearse (1957) introdujo su método con el MTT en presencia de Co, que no produce cristalización y evita la difusión. En mi experiencia, este método, produce unos resultados de gran contraste, pero hay que fotografiarlos pronto porque en el transcurso del tiempo se producen grandes artefactos de difusión y cristalización en el medio de montaje acuoso con el que hay que cubrir los cortes. La gran ventaja de otras sales como el Nitro-BT y el Tetranitro-BT es que los cortes se pueden deshidratar y aclarar, pero el color que dan no es muy intenso.

A continuación damos el procedimiento para la demostración de la NADH-diaforasa y de la succino-dehidrogenasa (abreviadamente SDH). De la NADH-diaforasa diremos que se trata de enzimas que catalizan la oxidación de las coenzimas NADH y NADPH; reciben también el nombre de tetrazolio-reductasas. La localización es mitocondrial pero se han descrito localizaciones extra- mitocondriales. La SDH interviene en

el ciclo de Krebs en el paso del succinato a fumarato.

Técnica para la demostración histoquímica de NADH-DIAFORASA (Pearse, 1972).

1. Obtener secciones en el criomicrotomo de 6 a 8 micras, de material sin fijar.
2. Secar brevemente al aire e incubar en el medio que se da a continuación, 30 minutos a 37°C.

Solución madre

MTT tetrazolio (1 mg/ml)	2.5 ml
TRIS 0.1 M pH 7.4	2.5 ml
Cloruro de cobalto 0.05 M (11.9%)	0.5 ml
Agua destilada	3.5 ml

Ajustar el pH a 7 y almacenar a -20°C.

Medio de incubación

NADH	2.0 mg
Solución madre	1.0 ml

Esta solución se prepara justo antes de usar.

3. Escurrir la solución de incubación y colocar los cortes en formol salino, 15 minutos.
4. Lavar abundantemente con agua destilada.
5. Contrateñir con verde de metilo (opcional).
6. Lavar con agua destilada y montar con gelatina-glicerina.

Resultados:

Los lugares de actividad enzimática se ven de color negro intenso (mitocondrias).

Demostración de actividad succino-dehidrogenásica (Pearse, 1972).

(A) Solución madre

Se usa la misma que se ha dado con anterioridad.

(B) Solución madre del sustrato

Succinato sódico	0.972g si es anhi - dro (1.896 g si es hexahidrato)
Agua destilada	0.8 ml
HCl 1N	0.05 ml

Ajustar el pH a 7 y el volumen a 10 ml y almacenar a -25°C.

Medio de incubación

(A)	0.9 ml
(B)	0.1 ml

Procedimiento:

1. Obtener secciones en el criomicrotomo.
2. Secar brevemente al aire e incubar 45 a 60 minutos a 37°C.
3. Drenar y fijar en formol-salino 15 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar y contrateñir, si se desea, con verde de metilo.
5. Lavar y cubrir con gelatina-glicerina.

Resultados:

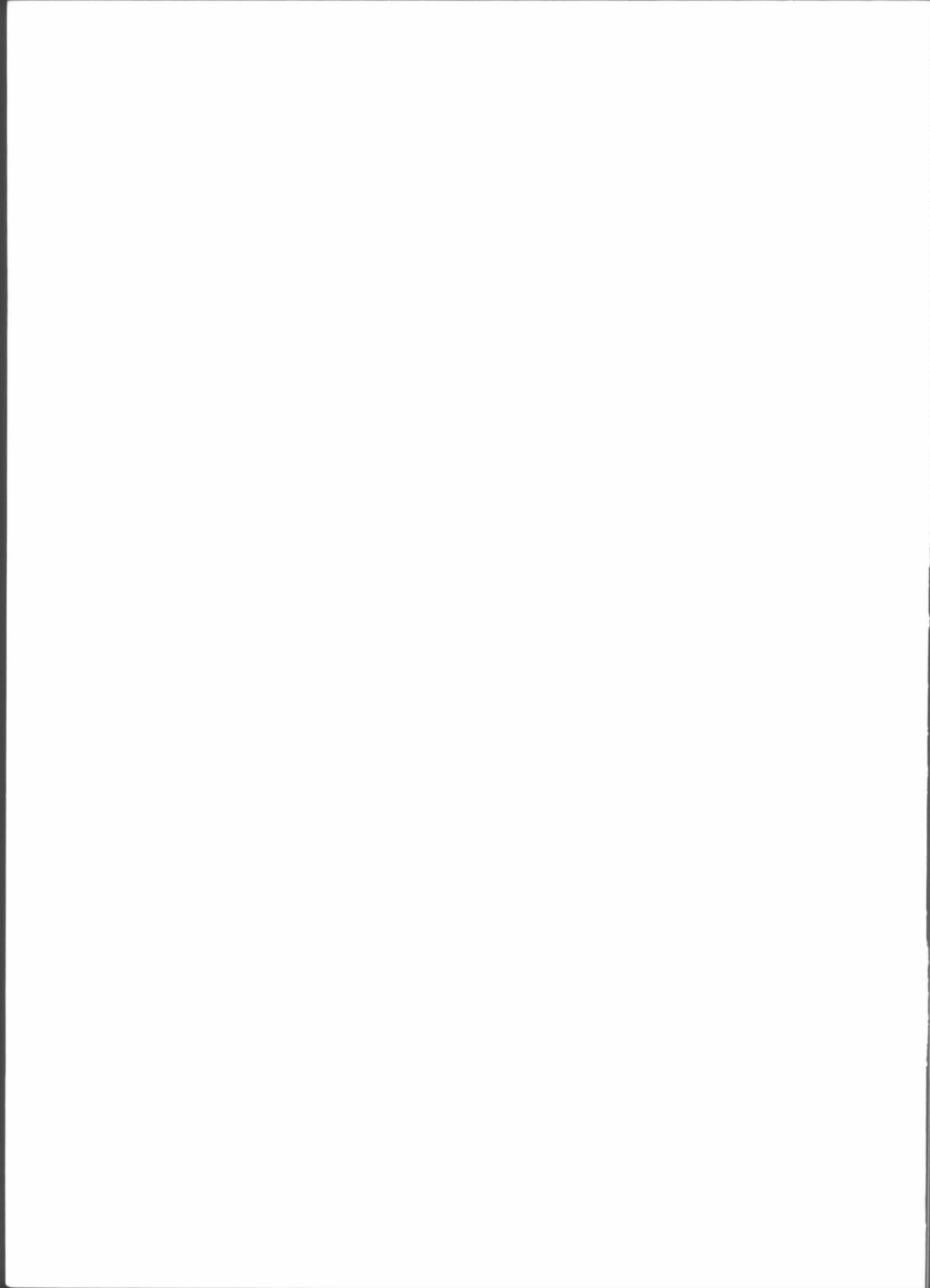
Los lugares de actividad enzimática se ven en negro y se localizan en las mitocondrias.

Bibliografía

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. Volume 2. 3rd edition. J.& A. Churchill Ltd. London, VOL- II, 1972.

PECHMANN, H. von, RUNGE, P. *Berichte deutsche chemische Gesselschaft*. 27: 2920, 1894, citado por PEARSE, 1972).

El Sr. Ing. Jaime Valle Méndez Rector de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, dispuso la impresión de este libro en los Talleres Gráficos de la Editorial Universitaria Potosina. La edición estuvo al cuidado del autor y de José de Jesús Rivera Espinosa. Fue concluida el 11 de diciembre de 1997 y consta de 1000 ejemplares.





*Editorial
Universitaria
Potosina*