

Investigación Clínica. N° 17. Págs. 23-31. Mayo 1966.

HISTOQUIMICA.

Su aplicación en Medicina y Biología.

— **Dra. Haydée Viloría de Castejón.**

Jefe de la Sección de Histoquímica.
Instituto de Investigación Clínica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.

Conferencia

Gomori define la histoquímica como la ciencia que trata de identificar y localizar sustancias químicas en los tejidos a nivel celular. Una definición más completa sería: el conjunto de técnicas, directas y no destructivas, que ayudan a la localización microscópica de compuestos químicos dentro de la célula y los tejidos. La histoquímica realmente es una ciencia intermedia entre la histología, la química analítica, la bioquímica y la biofísica.

En su origen, 1830-1855, fue de interés botánico y practicada por botánicos; la mayoría franceses. Su fundador fue Francois Vincent Raspail con su libro "Essai de Chimie Microscopique Appliquée a la Physiologie" aparecido en 1830. Los primeros ensayos sobre tejido animal se iniciaron a partir de 1856; pero la mayoría de estos primeros métodos traían consigo la destrucción del tejido. En el período 1899-1929, empiezan a usarse los colorantes de anilina como reactivos histoquímicos. Al mismo tiempo se ha iniciado el estudio de la histopatología descriptiva y los histólogos y patólogos desvían su atención hacia la morfología más que a la histoquímica; aunque ésta sigue progresando muy lentamente. No es sino en el período 1930-1944 cuando la histoquímica renace vigorosamente; siendo Lison con su libro "Histochemie Animale" (1936), el encargado de perfeccionar la histoquímica con procedimientos que no producen destrucción tisular. De 1945 en adelante, la histoquímica ha tomado gran impulso, apareciendo textos de estudio y revistas periódicas que publican los últimos adelantos en técnicas y conocimientos sobre esta ciencia; tomando auge actualmente la histoquímica enzimática y la histoquímica aplicada al microscopio electrónico.

La histoquímica se vale de métodos químicos y físicos que permiten obtener, bajo el microscopio, una visualización directa o

indirecta de las distintas sustancias de la célula. Casi todos son de orden cualitativo; pero algunos, particularmente los basados sobre principios físicos (fluorescencia, absorción de rayos X, espectrografía, autorradiografía, etc.), pueden usarse cuantitativamente. Un análisis bioquímico tiene como punto de partida la destrucción de toda la estructura celular. Los tejidos son triturados, extraídos con solventes diversos, digeridos hasta llegar a separar y obtener, en estado puro, sus componentes fundamentales. En bioquímica, se determina cualitativa y cuantitativamente una sustancia en un tejido sin poder relacionarla con una estructura morfológica. Sin embargo, puede demostrar mayor cantidad de sustancias que la histoquímica, debido a que ésta tiene condiciones propias que la limitan:

- 1.—Las reacciones enzimáticas han de ser *in situ*.
- 2.—Deben de preservarse las estructuras, limitando el empleo de sustancias capaces de destruir el tejido (álcalis o ácidos fuertes).
- 3.—El compuesto final que se observe después de una reacción histoquímica debe ser estable coloreado e insoluble.
- 4.—Cuando la reacción final produce precipitados cristalinos, estos han de ser lo suficientemente pequeños para permitir su localización citológica.
- 5.—La reacción histoquímica debe ser lo suficientemente específica y sensible para demostrar un solo compuesto químico, o grupo químico, en cantidades tan pequeñas, que se encuentran dentro de la célula.

La mayoría de estas condiciones son relativamente fáciles de cumplir con los componentes poco difusibles (ciertas proteínas, nucleoproteínas y lípidos), pero son más difíciles de obtener con sustancias difusibles como carbohidratos, iones, etc.; siendo necesario tomar en consideración una serie de factores en la preparación del material biológico para obtener la mayor estabilidad posible. Como primer factor se encuentra la **fijación del material**. Entiéndese por fijación, el método de preservación de la morfología y la composición química de la célula, provocando la muerte de ella de tal manera que la estructura que tenía estando viva, se conserve sin mayores alteraciones; tratando siempre de mantener la misma integridad en su compo-

ción química. Generalmente se utilizan fijadores de tipo químico, acuosos o alcohólicos, pero estos alteran en mayor o menor grado la composición química de la célula. Son más efectivos los métodos físicos, de los cuales los más importantes son:

Fijación por congelación y desecación: Consiste esencialmente en congelar el tejido lo más rápidamente posible, sumergiéndolo en un medio a temperaturas muy bajas (nitrógeno líquido -195°C , isopentano -165°C), para evitar la formación de cristales de hielo y luego deshidratar los tejidos al vacío usando temperaturas también bajas (entre -35°C y -70°C), por un tiempo variable según el tejido procesado. De esta manera se preserva la estructura celular, no hay extracción de sustancias solubles y la constitución química se mantiene prácticamente sin modificaciones.

Fijación por congelación y sustitución: Consiste en congelar el tejido de igual manera que en el método anterior y luego deshidratarlo a baja temperatura (-35°C a -60°C), sin usar el vacío; utilizando agentes deshidratantes como metanol, propilenglicol, acetona.

Fijación por congelación en criostato: Es el método más utilizado y accesible en cualquier laboratorio de histoquímica. Consiste en congelar el tejido, generalmente con nieve carbónica y mantener durante el proceso del corte, el ambiente, el microtomo, la cuchilla y el tejido, a una misma baja temperatura (0°C a -20°C). A los cortes así obtenidos, se les hace la reacción histoquímica de inmediato o se someten a una breve fijación de tipo químico antes de proceder.

Otro de los factores, el más importante, para el cumplimiento de estas condiciones indispensables, es la **reacción histoquímica en sí**. La identificación histoquímica puede hacerse a) mediante reacciones químicas similares a las utilizadas en química analítica y bioquímica, pero adaptadas a los tejidos; b) mediante reacciones que son específicas para grupos químicos contenidos en determinados compuestos. Por ejemplo, los diferentes aminoácidos (tirosina, triptofano, histidina) presentan grupos químicos específicos (fenilo, indol, imidazol) que reaccionan, dando productos coloreados, al ponerlos en contacto con sus respectivos reactivos; c) por métodos físicos: espectrografía, fluorescencia.

En la reacción histoquímica aparecen las mayores limitaciones; a veces por la poca especificidad de algunas reacciones: el ácido sulfhídrico produce precipitados negros muy visibles, al reaccionar con metales pesados como plomo, níquel, mercurio; por lo tanto, esta reacción sólo nos indica la presencia de un metal pesado, sin precisar cual. Otras veces la limitación deriva de la falta de sensibilidad del método, o porque la concentración de un componente celular es tan mínima que cae por debajo de la sensibilidad del método. En otras ocasiones, las sustancias están tan estrechamente ligadas unas a otras, que se interfieren en sus reacciones: los lípidos se amparan generalmente con las proteínas y los polisacáridos, siendo en muchos casos difícil su identificación e interpretación. Sin embargo, los progresos diarios de las técnicas histoquímicas van subsanando estos inconvenientes. Siendo la histoquímica una ciencia relativamente nueva, lucha cada día para obtener la mayor especificidad en sus métodos.

Tomemos como ejemplo práctico de un análisis histoquímico, el estudio del paracoccidioides brasiliensis, hongo patógeno para el hombre y los animales.

Hay compuestos (glicógeno, mucopolisacáridos, mucoproteínas, glicoproteínas, glicolípidos, esfingolípidos y proteínas) que contienen grupos capaces de originar dialdehídos al ponerse en contacto con un oxidante fuerte. La reacción de PAS (ácido periódico, oxidante fuerte, más reactivo de Schiff, colorante), actuando sobre los compuestos ya mencionados (glicógeno, etc.), los colorea de rojo púrpura. El proceso ocurre así: el oxidante fuerte libera los grupos dialdehído y el reactivo de Schiff forma con ellos compuestos coloreados.

Al colocar el hongo bajo los efectos de esta coloración, hay una fuerte reacción PAS en su contenido intracitoplasmático, lo que indica que dicho hongo contiene una o varias de las sustancias antedichas. Se inició el estudio del glicógeno, efectuando las coloraciones específicas para tal elemento: reacción de Bauer, carmín de Best, iodo, Grocott, dando todas éstas una reacción positiva. Al efectuar la digestión del glicógeno con alfa amilasa y diastasa, antes de realizar las coloraciones indicadas; se observó que las reacciones de Bauer, Grocott y del iodo, fueron negativas; lo que indicaba que en el hongo había glicógeno y éste había sido digerido por la amilasa. Sin embargo

el PAS seguía siendo positivo; sugiriendo que además del glicógeno, había otras sustancias de las anteriormente mencionadas. El estudio se encaminó entonces a la búsqueda y demostración de esta otra sustancia PAS positiva. Se realizaron múltiples coloraciones específicas para cada una de las sustancias restantes (azul de toluidina, azure II, alcian blue, hierro coloidal, reacciones de bloqueo de aldehidos, acetilación, metilación, digestiones enzimáticas con lisozima, hialuronidas, etc.), las que llevaron a la conclusión de que la otra sustancia encontrada era también un polisacárido del tipo mucopolisacárido ácido; y que tanto el glicógeno como este mucopolisacárido, estaban ligados a una proteína. Fue de esta manera como se orientó el estudio de los polisacáridos intracitoplasmáticos en dicho hongo. Relacionando diferentes coloraciones específicas a sustancias o grupos químicos, se llega a una conclusión para la identificación histoquímica de un compuesto.

Importancia de la histoquímica en medicina. La histoquímica es un baluarte en todos los campos de la medicina, porque proporciona a ésta informaciones valiosas para la patología, diagnóstico, evolución y tratamiento de las diferentes enfermedades. Algunos ejemplos nos darán cierta idea de este aporte. Coons, utilizando anticuerpos marcados con sustancias fluorescentes, localiza los antígenos en los tejidos. Este método ha sido ampliamente utilizado para la localización de virus y antígenos bacterianos, de anticuerpos en el sitio de su formación dentro de las células plasmáticas, etc. En enfermedades degenerativas como la glicogenosis, lipoidosis, amiloidosis, etc., la histoquímica nos da información precisa para el diagnóstico y la evolución. Es en el campo neoplásico, donde esta rama de la ciencia, dará mayores aportes; ya que se hace el estudio químico de la célula cancerosa en sí, su evolución y comportamiento ante un citostático, etc. Ciertos tipos de tumores contienen un gran número de enzimas (el carcinoma prostático y sus metástasis contienen gran cantidad de fosfatasa ácida). Al iniciarse el tratamiento médico, si es efectivo, la enzima va decreciendo paulatinamente. Podemos, de esta manera, ir controlando la evolución de la enfermedad (producción de metástasis, etc.). Otra enzima, la fosfatasa alcalina, aparece aumentada en los leucocitos en ciertas enfermedades hematológicas como policitemia vera y enfermedad de Hodgkin; mientras que

en la leucemia mieloide crónica está muy disminuida. La determinación de esta enzima ayuda a realizar el diagnóstico preciso de estos tres tipos de enfermedad.

Importancia de la histoquímica en biología. En el campo biológico la histoquímica ha aportado conocimientos de vital importancia; especialmente a nivel celular. Ha explicado algunos fenómenos de respiración celular; ha dilucidado la composición química de las diversas estructuras celulares, etc. Esterasas, colinesterasas y colesterasas se encuentran en los microsomas (pequeñas estructuras celulares sólo observables bajo microscopio electrónico); y probablemente desempeñan importante papel en la síntesis y metabolismo de los lípidos. El alto contenido de ácido ribonucleico en los microsomas, indica la participación de éstos en la síntesis de las proteínas. Otro elemento estructural muy importante, especialmente en células nerviosas y secretoras, es el complejo de Golgi; el cual ha sido ampliamente estudiado en relación con el mecanismo de la secreción de catecolaminas en la médula suprarrenal. Esta se forma dentro de pequeñas vesículas de la sustancia de Golgi, situadas cerca del núcleo. Luego las gotas de secreción aumentan y se dispersan hacia la periferia de la célula; de donde son excretadas a través de un sistema de membranas. Este proceso se puede seguir específicamente en todas sus etapas, por la contribución de la histoquímica aplicada al microscopio electrónico.

Nos encontramos actualmente en el comienzo de la era submicroscópica de la biología. Es decir, en el estudio de la forma, agregación y orientación de las moléculas y micelas que componen las diferentes fases de los sistemas protoplasmáticos. El descubrimiento de este mundo submicroscópico es de importancia capital. Entre las micelas y moléculas que lo componen y las enzimas y hormonas y metabolitos que en él se distribuyen, se producen todas las transformaciones químicas y energéticas que caracterizan a los fenómenos vitales. Es importante para la **fisiología**, porque el conocimiento de la estructura química celular y tisular, es fundamental para poder describir los mecanismos en que se basan las funciones de las células y tejidos. Es importante para la **embriología**, porque muchos fenómenos morfogénéticos pueden tener como substrato, modificaciones químicas y ultraestructurales; y para la **genética**, ya que nos puede explicar el mecanismo de la división cromosómica y hallar la estructura molecular del cromosoma y genes.

En la Sección de Histoquímica del Instituto de Investigación Clínica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, se iniciarán varios trabajos experimentales de investigación: el estudio de los ciclos metabólicos relacionados con la formación del glicógeno y la glucosa en el sistema nervioso central normal (glicogénesis, glicogenólisis y el ciclo de las pentosas); y el mismo estudio, en encefalitis equina venezolana experimental. Luego, se hará el estudio de las alteraciones químicas producidas en las células sanguíneas en las virosis. Estos trabajos están en fase de preparación.

La histoquímica es una ciencia muy promisoría en el campo de la investigación científica. Podemos realizar estudios de calidad en esta rama, gracias al enfoque nuevo que se le está dando a la investigación científica en nuestra Universidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) BARKA, T. and ANDERSON, P. J.: "Histochemistry. Theory, Practice, and Bibliography". Hocker Medical Division, Harper and Row, Publishers Incorporated. New York, 1963.
 - 2) CARBONELL, L. M.: "Histoquímica, ciencia promisoría". *Acta Científica Venezolana*, 6: 49. 1955.
 - 3) CARBONELL, L. M.; CASTEJON, H. V. and POLLAK, L. D.: "Cytochemistry of paracoccidioides brasiliensis. I. Cytochemistry of cytoplasmic polysaccharides in yeast form cultures with light microscope". *J. Histochem. Cytochem.*, 12: 413. 1964.
 - 4) DE ROBERTIS, E. D. P.; NOWINSKI, W. W. and SAEZ, F. A.: "Citología General". 5a. ed. Librería "El Ateneo". Edit. Buenos Aires. 1963.
 - 5) DI PRISCO, J.: "Estudio histoquímico de ocho casos de amiloidosis cutánea poco frecuentes". *Dermatología Venezolana*, 3: 147.
 - 6) PEARSE, A. G. E.: "Histochemistry, Theoretical and Applied". 2nd. ed. J. and A. Churchill Ltd. London. 1960.
 - 7) TODERAN, M. G.: "The alkaline phosphatase activity of white blood cells". *Canad. J. Med. Technol.*, 26: 81-87. 1964.
-

RENATO TEOFILO JACINTO LAENNEC
(1781 - 1826)

Eminente clínico francés, inventor del estetoscopio con el cual enseñó cómo aprender a reconocer las alteraciones de los órganos por los cambios de los ruidos auscultatorios. Tenía un conocimiento profundo de la anatomía humana y aparte de sus análisis sobre los signos de la tuberculosis y de las enfermedades del corazón, describió magistralmente la cirrosis atrófica del hígado que lleva su nombre.