

DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO
EN ALGUNAS REGIONES DE LA PIEL HUMANA
POR TINCION A pH CONTROLADO.
INFLUENCIA DE DIFERENTES FIJADORES QUIMICOS

Tesis de grado

— **Tecn. Méd. Cecilia Alliende G.**

Profesora de Histoquímica.
Escuela de Tecnología Médica.
Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.

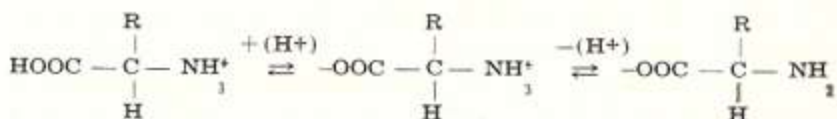
El presente trabajo de investigación fue realizado por la Srta. Cecilia Alliende bajo la dirección del Dr. Rodolfo Vallejos E., en el año 1966, cuando éste era profesor de la cátedra de Histología Normal de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, y profesor de Histoquímica de la Escuela de Tecnología Médica. Actualmente el Dr. R. Vallejo es Profesor de Embriología, Histología e Histoquímica en la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia.

INTRODUCCION

La capacidad que poseen las sustancias proteicas y otras macromoléculas de las células y tejidos, de unirse a los colorantes ácidos y básicos a distintos rangos de pH, es una resultante de las características electroquímicas que poseen.

Las proteínas en solución son anfóteras, o sea, tienen a la vez grupos ácidos y básicos, provenientes de los grupos libres de ciertos aminoácidos. Son especialmente importantes los grupos carboxilos y aminos terminales de la cadena proteica, grupos alcohólicos y sulfhidrilos de las cadenas laterales y otras sustancias que se pueden conjugar con la proteína. En soluciones ácidas ricas en protones (H⁺), el número de cargas positivas de las proteínas aumenta, pues los radicales ácidos tienden a reconstituirse a la forma no disociada, predominando la carga positiva del radical amonio cuaternario sustituido. En medios muy ácidos, la proteína posee sólo cargas positivas. En soluciones alcalinas se produce la disociación del grupo amonio sustituido cargado positivamente, predominando entonces la carga negativa del grupo COO⁻. A un cierto pH el número de cargas positivas es igual al número de cargas negativas. En ese momento, la proteína está eléctricamente neutra y recibe el nombre de "zwitterion": colocada en el campo eléctrico no emigra hacia el cátodo ni hacia el ánodo; ahí se encuentra el punto isoeléctrico.

La respuesta de la proteína a los cambios de pH puede ser representada de acuerdo a las siguientes fórmulas:



De acuerdo a las fórmulas precedentes, podemos establecer que las proteínas se comportan como aniones a un pH por encima de su punto isoeléctrico y como cationes, a un pH por debajo de su punto isoeléctrico. Por consiguiente, las sustancias proteicas en soluciones debajo de su punto isoeléctrico, se tiñen con colorantes ácidos (aniónicos) y por encima de su punto isoeléctrico, con colorantes básicos (catiónicos). Los métodos para determinar, mediante tinción con colorantes ácidos y básicos a pH controlado, el punto isoeléctrico de los componentes tisulares, se basan en este supuesto.

Pischinger¹⁹ estudió la influencia del pH en la unión de colorantes ácidos (cristal Ponceau y Cianol) y básicos (azul de toluidina) con diversas proteínas *in vitro* (gelatina, clara de huevo) y con cortes histológicos de timo y cartilago fijados en alcohol. Constató que la tinción con colorantes ácidos o básicos tiende a extinguirse a un pH específico para los diferentes coloides y tejidos estudiados; pH que él consideró como el del punto isoeléctrico. Zeiger¹⁴ continuó el trabajo de Pischinger e investigó el efecto de diversos fijadores químicos sobre el punto isoeléctrico, determinado mediante tinción a pH controlado. Sostuvo que el alcohol es el fijador que produce menos cambios en el punto isoeléctrico de los tejidos proteicos. Yasazumi y Seki²⁸ estudiaron el efecto del alcohol y otros fijadores químicos en la determinación del punto isoeléctrico de los glóbulos rojos. Levine¹⁹ demostró que el método de Pischinger no revelaba el verdadero punto isoeléctrico, pues al cambiar el colorante, la concentración de la solución colorante, el buffer, la concentración del buffer y la temperatura de reacción, se modificaban también los puntos isoeléctricos resultantes. Levine introdujo una técnica en la que todos los factores variables se reducían al mínimo. El efecto de la velocidad de coloración fue eliminado empleando soluciones diluidas de colorante (M/2000) en buffer (M/10) y tiñendo hasta que se alcanzara un equilibrio (24 horas). Para evitar la pérdida de colorante básico (azul de metileno) en el proceso de deshidratación en alcohol etílico, Levine¹³ introdujo el empleo de alcohol butílico terciario, con el cual la pérdida de colorante es mínima. Dempsey y Singer⁶ utilizaron el método de tinción a pH controlado para determinar el grado de basofilia de diversos tejidos. De los resultados obtenidos concluyeron, que la capacidad de un tejido para unir colorante básico a un pH bajo, depende de la existencia de grupos fuertemente ácidos, tales como el éster sulfúrico, el éster

fosfórico y los grupos carboxilos. Singer y Morrison²³ estudiaron películas de fibrina sin modificar y modificada por calentamiento y fijación en formaldehído. Demostraron que la fijación influye en la afinidad por los colorantes ácidos y básicos y en la determinación del punto isoeléctrico, bajo condiciones controladas de pH. Observaron que la fibrina sin fijar presenta una pequeña afinidad por los colorantes ácidos y básicos, mientras que la fijación por calor favorece la acción de ambos colorantes, y la fijación por formaldehído, la afinidad por los colorantes básicos. Asimismo determinaron, que el punto isoeléctrico obtenido por el método de coloración, no concuerda con el determinado por electroforesis (en la fijación con formaldehído, obtuvieron una variación de 0,8 unidades de pH hacia el lado ácido). Spicer^{26, 27} empleó un colorante ácido (Biebrich Scarlet) a pH controlado en el rango alcalino para diferenciar proteínas básicas, considerando sus diferentes valores de extinción.

El método de tinción a pH controlado ha sido estudiado además por Dempsey y col.^{7, 8, 9}; Singer y Wislocki²²; Pearse^{18, 19}; Sokoloff²⁵; Lenox, Bracen y Malinski¹²; Peterson y Weiss²⁰; y Weiss²⁸.

Utilizando la experiencia adquirida a través de los trabajos citados hemos intentado determinar el punto isoeléctrico aparente de diferentes regiones de la piel. El método empleado corresponde al usado en la generalidad de las investigaciones de este tipo⁶. La variable que estudiamos es la influencia de diferentes mezclas de fijadores químicos. Estos modifican en distinto grado la ubicación del punto isoeléctrico aparente determinado por este método.

Observando la acción de los fijadores en la ubicación del punto isoeléctrico y en la acidofilia y basofilia del material teñido, puede obtenerse una indicación aproximada al valor real del punto isoeléctrico. Como el punto isoeléctrico es una constante importante, característica para cada proteína y que depende de su composición en los distintos aminoácidos, nos parece de interés la determinación de estos valores en piel humana normal.

MATERIAL Y METODO

Las investigaciones se hicieron sobre varias muestras de piel humana normal obtenida por biopsia. Se fijó en: 1.— Formol

neuro al 10%. 2.— Zenker sin ácido acético. 3.— Alcohol absoluto. 4.— Picro-formol-alcohol (5°C)¹⁰. 5.— Formol-acetato de sodio. Tiempo de fijación: 24 horas. La inclusión se hizo en parafina por los métodos comunes. Se obtuvieron cortes de 6μ .

El método de tinción comprendió el empleo de un colorante ácido, Fast Green FCF, y de uno básico, azul de metileno, en soluciones separadas a pH controlado. La concentración del colorante fue de 5×10^{-4} M en solución buffer de veronal-acetato de Michaelis a un pH entre 2,7 - 9; y otro, compuesto por glicina NaCl-NaOH 0,1 M, pH 9 - 10,8. Se escogieron estas condiciones basándose en los estudios sobre el particular de Dempsey y Singer⁶, Pearse^{18, 19} y Peterson y Weiss²⁰.

Los cortes montados en portaobjetos fueron teñidos a temperatura ambiente por 24 horas. Se deshidrataron en alcohol butílico terciario, se diafanizaron en xilol y se montaron en Permount.

Se estudiaron las diferentes regiones epiteliales de la piel, exceptuando el estrato lúcido y el germinativo. El primero, porque encontramos problemas técnicos en la delimitación de la capa, y el segundo, por la interferencia que producía la melamina y las nucleoproteínas.

En la célula, nos limitamos a la región citoplasmática. No se hicieron determinaciones en el núcleo. En el dermis, revisamos las estructuras papilar y reticular, teniendo cuidado en esta última de observar las gruesas fibras colágenas solamente.

Para conocer el grado relativo de unión de estas diversas estructuras proteicas con el colorante, se midió la densidad óptica de las diferentes regiones de los cortes de piel. Para ello utilizamos el histofotómetro de Lison con un filtro de un espectro de absorción de 500-580-780 $m\mu$ ^{3, 14}, con iluminación Koeller estabilizada, microscopio con un objetivo 45, na 60, ocular de aumento 10 X y con un condensador Zeiss aplanático y acromática na 1. En este histofotómetro, la imagen del corte es proyectada sobre una pantalla en cuya parte central se encuentra una célula fotoeléctrica. Se ajusta la luz transmitida a cien por ciento, haciéndola pasar a través del porta y cubreobjetos en lugares vecinos al corte de tejido. Posteriormente, se seleccionan los puntos que se quieren medir, haciendo caer las imágenes en el diafragma de la pantalla, detrás del cual se encuentra el dispo-

sitivo fotoeléctrico. El porcentaje de luz absorbida se calcula como logaritmo negativo de la razón entre la luz incidente o inicial (I_0) y la transmitida o final (I_t). Este cociente es el porcentaje de transmisión, el cual se lee directamente en el galvanómetro que posee el circuito fotoeléctrico. El valor de la absorción, en porcentaje, calculado para cada preparación, se inscribió en un gráfico relacionándolo con el pH de tinción. Las curvas dibujadas dan indicaciones sobre la afinidad de las proteínas del tejido por estos colorantes.

RESULTADOS

Hemos confeccionado curvas en que se compara la densidad óptica con el pH. Haremos una descripción detallada de estos gráficos para cada estrato de la piel, en el orden que fueron investigados.

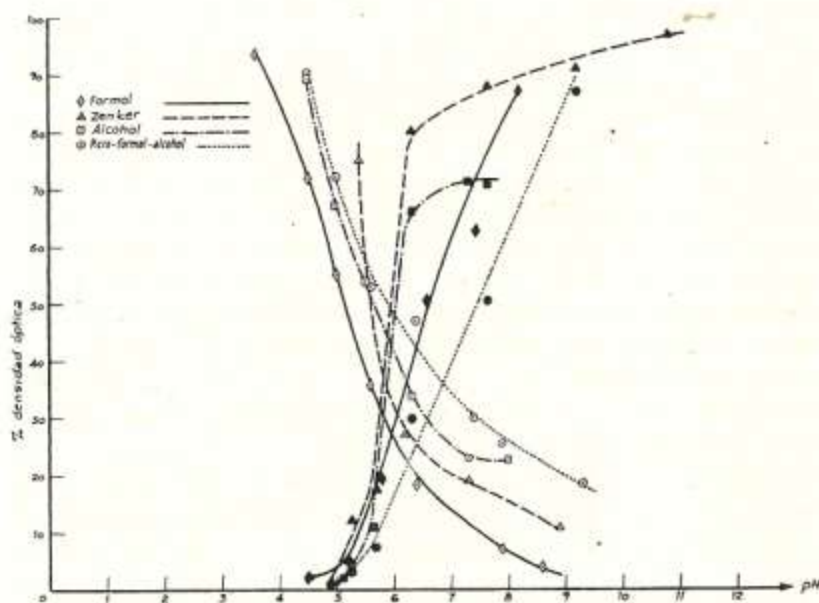
Estrato Córneo.— La disposición general de las diferentes curvas en los gráficos 1 y 6 sugiere que esta zona de la epidermis tiene bastante afinidad por ambos colorantes, ácido y básico. Sin embargo, con el colorante básico no hay un descenso regularmente sostenido, como con el colorante ácido. Comparando los diferentes fijadores, observamos que hay una disminución relativa de la acidofilia en el siguiente orden: formol neutro, Zenker, alcohol y picro-formol-alcohol. En cuanto a la afinidad por el colorante azul de metileno, el fijador que produce la mayor basofilia es el Zenker. La basofilia decrece con el alcohol, formol neutro y picro-formol-alcohol (Gráfico 1). En el gráfico 6 se observa que el formol-acetato de sodio aumenta la basofilia en relación con el formol neutro, mientras que la acidofilia permanece igual. Esto desplaza el punto isoeléctrico de la proteína hacia una zona más ácida de pH (Tabla 1). Este fenómeno se repite regularmente para las otras partes de la piel estudiadas (Gráficos 7, 8, 9 y 10) y que no mencionaremos más en este capítulo, sino que será analizado en la discusión. Los cambios en la afinidad de la proteína por el Fast Green a distintos pH se traducen en relación con el azul de metileno en un ascenso más gradual de la curva. Con el azul de metileno observamos bruscos ascensos para los diferentes fijadores entre los pH 5,7 - 6,3, siendo la subida más pronunciada para los fijadores Zenker y alcohol. Si tomamos los casos extremos, vemos que Zenker tiene, a un pH 5,7 un porcentaje de absorción de 17,5 y, a pH 6,3 uno de 80; lo que da una diferencia de

Tabla I

	FORMOL	ZENKER	ALCOHOL	PICNO FORMOL ALCOHOL	FORMOL ACETATO
ESTRATO CORNEO	6,0	5,8	6,0	6,9	5,6
ESTRATO GRANULOSO	5,7	5,9	6,3	6,8	5,6
ESTRATO POLIGONAL	5,5	5,6	5,9	6,0	5,3
DERMIS PAPILAR	6,1	6,2	6,8	8,5	5,8
DERMIS RETICULAR	6,9	7,1	7,1	8,8	6,3

Valores de los puntos isoelectricos aparentes de las distintas zonas de la piel, según el fijador empleado.

Gráfico I

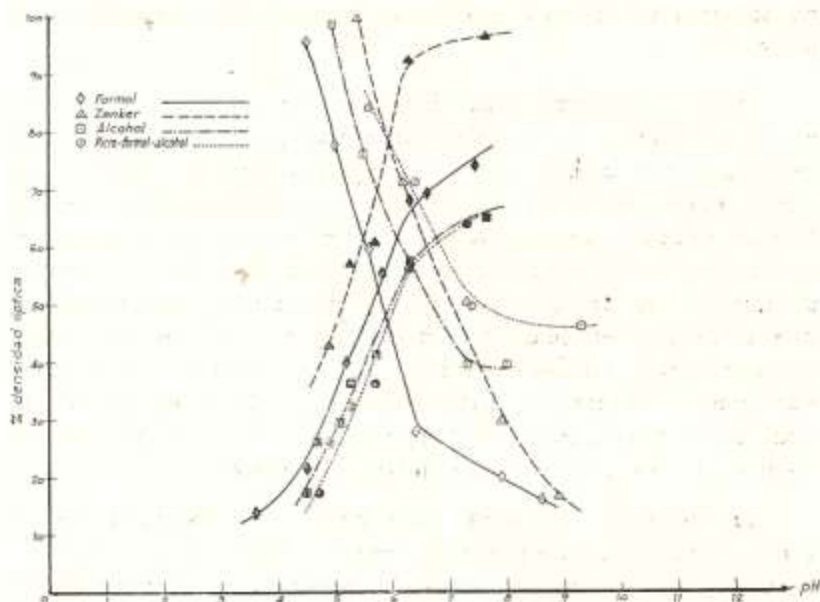


Influencia de distintos fijadores en la determinación del punto isoelectrico aparente en el estrato córneo de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

62,5; esta misma diferencia es de 22,5 para el fijador picroformol-alcohol. Se deduce que material fijado en Zenker tiene mayor capacidad para teñirse con el colorante básico. La extinción con azul de metileno se produce a pH. 4,5 para la formalina neutra y entre pH 4,9 - 5,1, para los demás fijadores.

La ubicación del punto isoeléctrico aparente está en el entrecruzamiento de las curvas del colorante ácido y básico y se dispersa, para los diferentes fijadores, en una magnitud de 1,3 unidades de pH (Tabla I). Hay una diferencia poco apreciable en los valores de densidad óptica que se obtienen en esta confluencia. Ellos van de 27 para el formol neutro hasta 42,5 como máximo para el alcohol.

Gráfico 2



Influencia de distintos fijadores en la determinación del punto isoeléctrico aparente en el estrato granuloso de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Estrato Granuloso.—El aspecto general de las curvas en los gráficos 2 y 7, indica una afinidad regular de la proteína, en los niveles de mayor absorción, por el colorante ácido; no así por el colorante básico. Se aprecia que la acción de los distintos

fijadores químicos puede disminuir la acidofilia relativa. El formol la disminuye en mayor grado y el alcohol, Zenker y picro-formol-alcohol, producen una mayor afinidad por el colorante ácido. La basofilia relativa aumenta más por la fijación con Zenker; lo siguen el formol neutro, alcohol y picro-formol-alcohol. Los cambios de afinidad para ambos colorantes a distintos pH se producen en forma bastante gradual, lo que se expresa en la regularidad de la inclinación de las curvas.

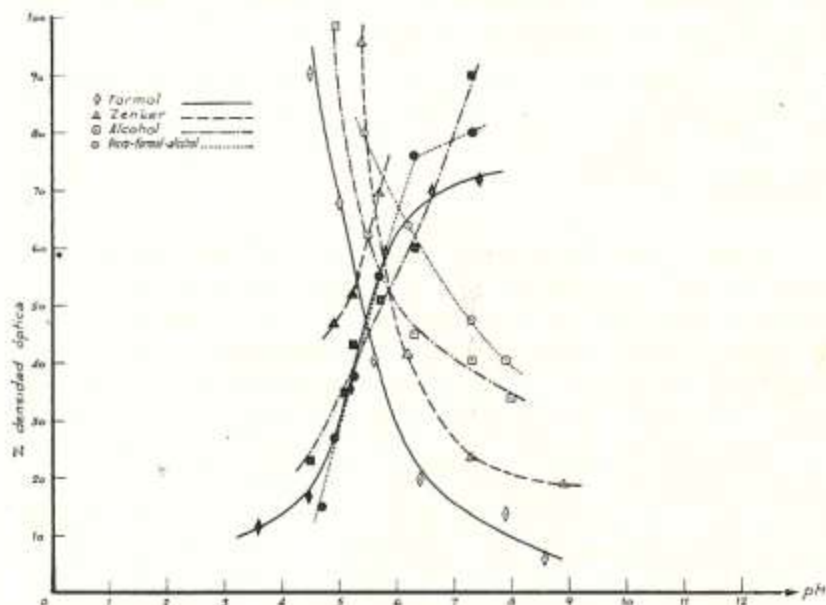
La ubicación del punto isoelectrico para los distintos fijadores se distribuye en 1,2 unidades de pH (Tabla I). En los puntos de cruzamiento de ambas curvas, la densidad óptica para el fijador Zenker y formol-acetato es alta; 75,5 y 72,5 respectivamente. Para el resto de los fijadores varía entre 53 y 60. La extinción con azul de metileno no se estudió completamente, no obstante se observó que tiende a producirse por debajo del pH 4.

Estrato Poligonal. — La disposición general de las curvas en los gráficos 3 y 8 señala una afinidad similar de esta zona de la piel por ambos colorantes, ácido y básico. Además, podemos observar que la fijación con formol disminuye la acidofilia en relación con el resto de los fijadores, y que el picro-formol-alcohol es el fijador que la aumenta más. En lo referente al aumento de afinidad por el colorante básico, podemos decir que el Zenker, en relación con los demás fijadores, es el que provoca mayor basofilia (Gráfico 3). Los cambios de afinidad por ambos colorantes a distintos pH se producen en forma gradual, sobre todo para el azul de metileno. La extinción con azul de metileno se encuentra por debajo del pH 4.

La ubicación del punto isoelectrico aparente para los diversos fijadores se desplaza en una magnitud de 0,7 unidades de pH (Tabla I). En los puntos de entrecruzamiento para ambas curvas, la densidad óptica para la fijación con Zenker es de 67,5; con picro-formol-alcohol, 66,5; formol acetato, 55; alcohol, 52,5 y formol neutro, 46,5.

Dermis Papilar. — De la imagen de las curvas de los gráficos 4 y 9, se desprende que esta región de la piel presenta una mayor afinidad por el colorante ácido. La fijación con formol neutro, alcohol y Zenker, disminuyen mucho la acidofilia en relación con el picro-formol-alcohol. La acción del fijador Zenker

Gráfico 3



Influencia de distintos fijadores en la determinación del punto isoeléctrico aparente en el estrato poligonal de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

aumenta la basofilia en relación con los demás fijadores; ésta decrece por la fijación con formol neutro, alcohol y picro-formol-alcohol. En relación con el resto de los fijadores, la basofilia disminuye bastante por la acción del picro-formol-alcohol. El punto de extinción del azul de metileno es muy constante para los distintos fijadores: se produce entre los pH 4,9 - 5,2.

La ubicación del punto isoeléctrico aparente se dispersa, para los distintos fijadores, en una magnitud de 2,7 unidades de pH.

Dermis Reticular.— La observación global de las diferentes curvas en los gráficos 5 y 10, nos señala que la dermis reticular presenta mayor afinidad por el colorante ácido. En relación con los demás fijadores, el formol neutro es el que más disminuye la afinidad por los colorantes ácidos; lo siguen el alcohol, picro-formol-alcohol y Zenker. La basofilia se observa notablemente disminuida por la acción del fijador picro-formol-alcohol en re-

lación con el resto de los fijadores. El punto de extinción con azul de metileno es semejante para los diversos fijadores y se produce entre los valores de pH 4,9 - 5,2.

La ubicación del punto isoelectrico aparente se desplaza en una magnitud de 2,5 unidades de pH (Tabla I).

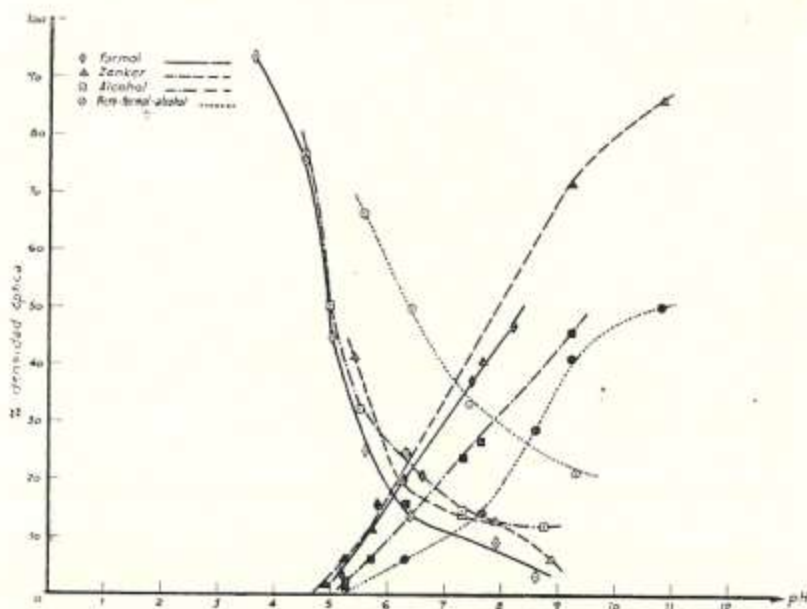
DISCUSION

Se han hecho pocos estudios sobre la afinidad de las distintas regiones de piel por los colorantes ácidos y básicos^{1, 24}. Las informaciones de orden histoquímico que se pueden lograr por estos procedimientos técnicos, son variadas y han sido aceptadas en su mayor parte y en menor grado controvertidas^{14, 19, 24, 28}. Uno de los datos más importantes que se obtienen mediante la tinción con colorantes ácidos y básicos a pH controlado, es el punto isoelectrico aproximado o aparente^{14, 19, 28}. Este se encuentra en el punto de intersección de las curvas de tinción con ambos colorantes, lo que significa que a ese pH el tejido posee igual afinidad por ellos. Para el caso de las proteínas, encontramos allí un valor equivalente de las cargas positivas y negativas, de los grupos básicos y ácidos (grupos NH_3^+ y COO^-). Esto se debe a la disociación característica de las proteínas^{17, 29}. En su estado nativo las proteínas presentan poca o ninguna afinidad por los colorantes ácidos y básicos²³; es decir, son muy poco acidófilas o basófilas. Estudiando la migración de las proteínas en un campo eléctrico, es como se puede determinar el punto isoelectrico y también el punto isoiónico: la mínima movilidad, a determinado pH, es el punto mencionado. Por otra parte, cualquier modificación físico-química que se introduzca en la estructura de estas sustancias va a producir una alteración del punto isoelectrico; lo cual altera el grado de acidofilia o basofilia. Una de las alteraciones más importantes que se llevan a cabo en el estudio de los tejidos, es la fijación química. A ella dirigimos nuestra atención especialmente.

El proceso de la fijación, generalmente, aumenta la capacidad de unión del tejido con los colorantes. Hay un incremento equivalente o desigual en las cargas eléctricas de la proteína. Es lo que expresamos clásicamente como aumento o variaciones en la basofilia y acidofilia, según que la afinidad sea por el

colorante básico o ácido. Algunas de las conclusiones establecidas sobre la acción del fijador en la capacidad de colorabilidad del tejido fueron reunidas por Baker¹. Se ha visto que la formalina causa una disminución de la acidofilia del tejido, debido a la unión de esta sustancia con los grupos NH_2 de las proteínas²⁸, lo que confirmamos en este trabajo. Este mismo fijador, según Baker¹ "aumenta la basofilia más que cualquier otro fijador", cosa que no se produce en nuestros estudios en los que el Zenker provoca la mayor afinidad por el colorante básico.

Gráfico 4

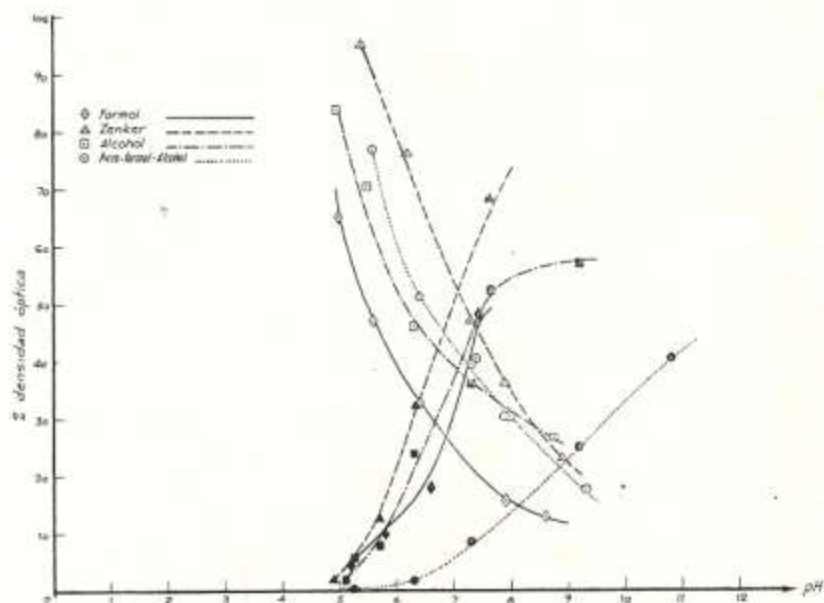


Influencia de distintos fijadores en la determinación del punto isoeléctrico aparente en la dermis papilar de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Las sales de mercurio se unen principalmente a los grupos amino de las proteínas produciendo un efecto similar al del formol. El dicromato de potasio actuaría en forma semejante al ácido crómico, o sea, como coagulante fuerte, a pH bajo, 3,5 - 3,8. Este valor es algo inferior al punto isoeléctrico de muchas proteínas y ha sido llamado rango crítico¹. En las zonas de pH cercanas al punto isoeléctrico de las proteínas, el efecto de las sales

de cromo no ha sido estudiado. La mezcla Zenker sin ácido acético tiene un pH que cae ligeramente en el lado superior al rango crítico y las proteínas reaccionan con los aniones cromo en este caso¹. Resumiendo, el aumento de basofilia causado por el Zenker puede deberse a la acción bloqueadora del dicromato de potasio y bicloruro de mercurio sobre los grupo amino y al efecto precipitante de este último.

Gráfico 5

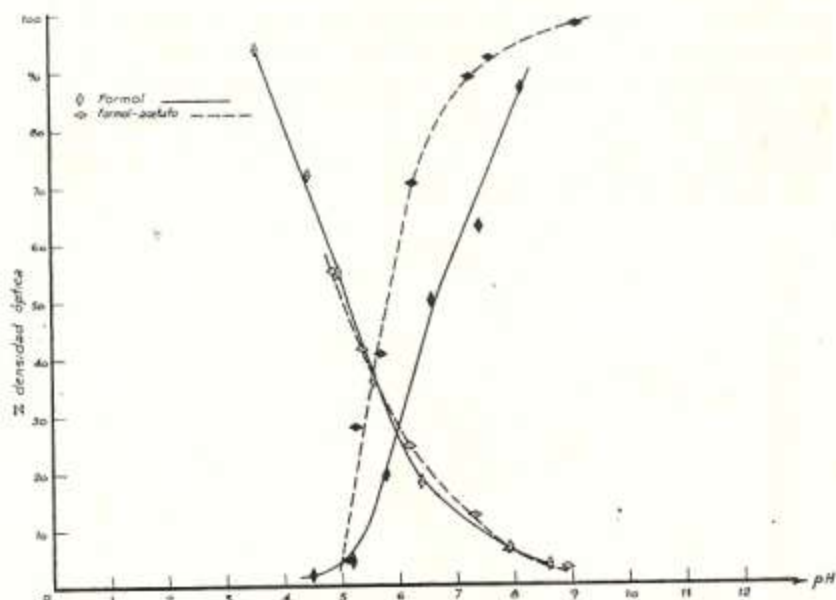


Influencia de distintos fijadores en la determinación del punto isoeléctrico aparente en la dermis reticular de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

El alcohol produciría el menor desplazamiento del punto isoeléctrico de las proteínas¹⁴⁻¹⁹, lo que interpretamos como un cambio equivalente en magnitud en la basofilia y acidofilia de las estructuras. Se explica esta acción porque el alcohol tiene un efecto desnaturalizante y no se uniría a los diferentes grupos funcionales de las proteínas. Nuestros resultados confirmarían esta opinión, ya que el punto isoeléctrico de las regiones de piel fijadas con alcohol, se ubica en una posición intermedia entre el punto determinado con otros fijadores. En los gráficos, siempre lo en-

contramos hacia la izquierda del formol neutro y Zenker, y hacia la derecha del picro-formol-alcohol. Esta constancia es característica e induce a pensar que el alcohol mantiene el punto isoeléctrico de las proteínas en un punto aproximado al real. Según Baker¹, este fijador produciría un cambio en el punto isoeléctrico de alrededor de 0,5 unidades de pH en el sentido de menor acidez.

Gráfico 6



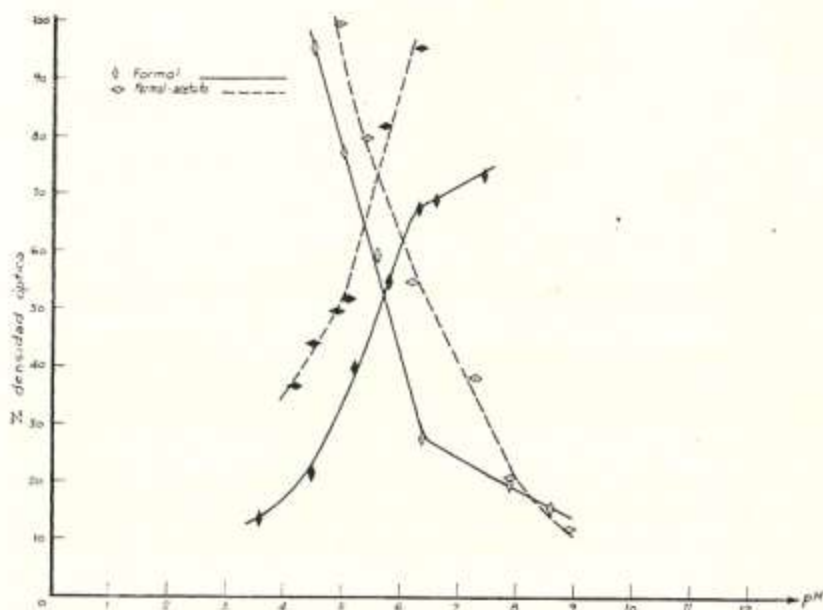
Influencia de los fijadores formol neutro y formol-acetato de sodio en la determinación del punto isoeléctrico aparente en el estrato córneo de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Se ha dicho que la formalina desplaza el punto isoeléctrico cerca de una unidad de pH hacia el lado ácido en relación con el alcohol. En nuestro estudio no se mantiene esa constancia (Tabla I)²⁸.

El ácido pícrico disminuye bastante la afinidad por los colorantes básicos (posiblemente por bloqueo de los grupos carboxilos). Además, la acidofilia sería aumentada por este fijador. Todo esto hace que el punto isoeléctrico esté muy desplazado hacia el lado menos ácido del pH y en algunos casos hacia el alcalino, en todas las zonas de piel estudiadas.

Hemos comparado en gráficos apartes (6 a 10), la acción fijadora del formol-acetato con la del formol neutro. Hay una constancia en la acidofilia con ambos fijadores; se ve que se dibujan curvas semejantes para el colorante ácido en todas las zonas de la piel, excepto en el estrato granuloso (Gráfico 7). Esto confirma la acción del formol sobre los grupos amino en ambos fijadores. En cambio, la basofilia es modificada: aumenta con la fijación en formol-acetato. La interpretación que damos a esto se basa en la acción del acetato de sodio, que podría producir una mayor liberación de grupos carboxílicos por efecto ligeramente desnaturalizante sobre las proteínas. Como consecuencia, se observa un desplazamiento leve del punto isoeléctrico hacia el lado ácido. Creemos que pequeños cambios en la composición del fijador, estudiados de esta manera, pueden aclarar la acción de electrolitos u otras sustancias en la fijación.

Gráfico 7

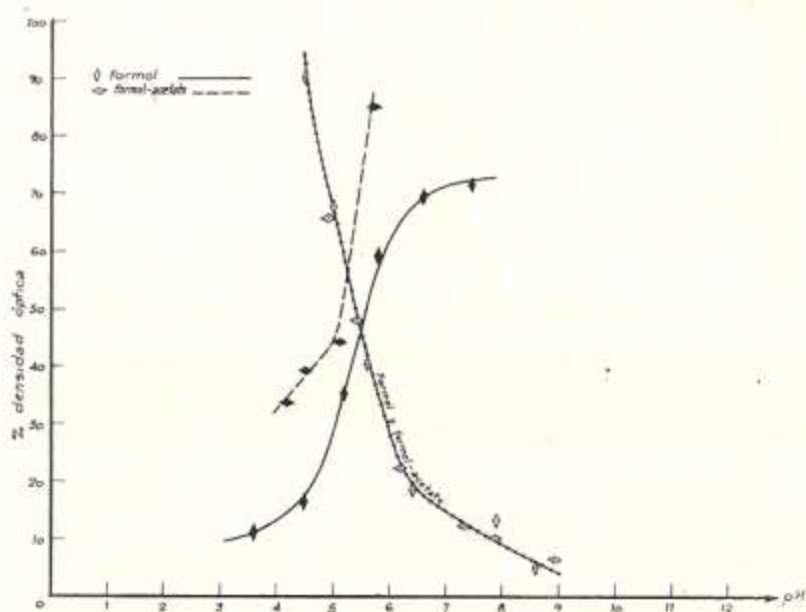


Influencia de los fijadores formol neutro y formol-acetato de sodio en la determinación del punto isoeléctrico aparente en el estrato granuloso de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Otro dato histoquímico que se obtiene por la técnica de tinción a pH controlado es la extinción con azul de metileno. No

podemos dejar de decir algo sobre esta materia, aunque la orientación principal de nuestro trabajo no se ha dirigido en este sentido. Se puede establecer el grado de basofilia del tejido determinando el pH en el que se pierde la tinción con azul de metileno. Así se llegan a diferenciar con cierta aproximación, proteínas, mucopolisacáridos ácidos y nucleoproteínas según su capacidad de conservar la basofilia a pH más bajo^{5, 8, 9, 19, 22}. Para nuestro trabajo, la utilidad de estas observaciones reside en que, determinado el punto de extinción, podemos tener una idea sobre la probable existencia de mucopolisacáridos y nucleoproteínas en el tejido que estudiamos⁵.

Gráfico 8



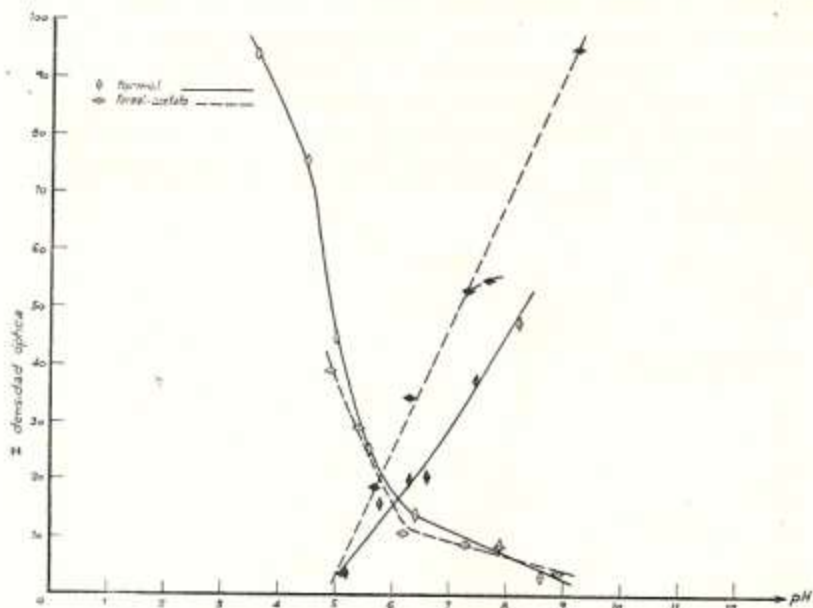
Influencia de los fijadores formol neutro y formol acetato de sodio en la determinación del punto isoelectrico aparente en el estrato poligonal de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Basándonos en todos estos conocimientos sobre la acción de fijadores químicos en el punto isoelectrico y valores de extinción, se pueden discutir algunos hechos observados en cada zona de la piel.

Estrato Córneo. — Esta zona de la piel es de carácter escamoso y su composición es principalmente proteica. Contiene mu-

cha cantidad de aminoácidos básicos, como arginina, lisina, histidina y el aminoácido azufrado cistina.

Gráfico 9



Influencia de los fijadores formol neutro y formol-acetato de sodio en la determinación del punto isoelectrico aparente en la dermis papilar de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

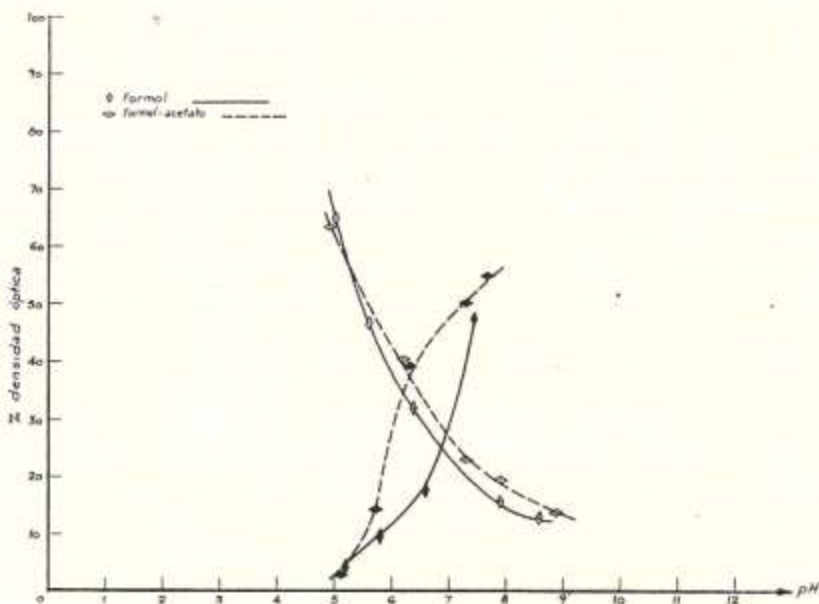
Posee bastante afinidad por colorantes ácidos y básicos lo que se desprende del aspecto regular de las curvas con los diferentes fijadores. Con el colorante básico hay incrementos bruscos de afinidad especialmente en el material fijado con Zenker y alcohol. Si miramos esto desde un punto de vista inverso, podría interpretarse como una extinción más o menos brusca de la tinción con azul de metileno. Cuando se obtienen curvas de este tipo, se dice que la envoltura electrostática de la proteína es más sensible a los cambios pequeños de pH. Estos incrementos serían característicos para algunas proteínas²⁴. Por otra parte esta posibilidad de reacción fácil o sensible de la proteína con el colorante está adversamente influenciada por la posibilidad de bloqueo de sus grupos reactivos con alguno de los iones introducidos por el fijador. Creemos sin embargo, que la proteína

constituyente del estrato córneo no sufriría una gran modificación por este tipo de reacciones bloqueadoras.

El punto isoelectrico de la queratina estaría alrededor de pH 6. Datos bioquímicos, le asignan un valor de pH 5,5⁴.

La extinción con colorante básico a pH 4,5 indica que los grupos que se unen no son extremadamente ácidos. No corresponden a mucopolisacáridos ácidos sulfatados ni a nucleoproteínas. Los valores de absorción en el punto isoelectrico se distribuyen en poco más de diez unidades para los distintos fijadores; esto expresaría una acción química más o menos homogénea de todos ellos sobre el tejido.

Gráfico 10



Influencia de los fijadores formol neutro y formol-acetato de sodio en la determinación del punto isoelectrico aparente en la dermis reticular de la piel humana normal. Las figuras negras indican la tinción con azul de metileno; las sin relleno, la tinción con Fast Green.

Estrato Granuloso.— Las células constituyentes de esta zona de la piel tienen forma aplanada característica. Se encuentran en filas de 3 células de espesor promedio.

Nos interesó principalmente, estudiar los gránulos de queratohialina que contienen en su citoplasma. Se ha descrito en ellos la existencia de sustancias, tales como proteínas sulfuradas con aminoácidos del tipo cisteína^{16, 21}, nucleoproteínas^{9, 15} y mucopolisacáridos¹¹. Encontramos afinidad marcada de la proteína por ambos colorantes especialmente el ácido (estos gránulos se describen como basófilos con las técnicas corrientes de tinción histológica). Aquí, a diferencia de lo que ocurre en el estrato córneo, no hay incrementos bruscos de unión con cualquiera de los colorantes. Probablemente hay una acción bloqueadora algo superior por los fijadores. Esto es especialmente visible hacia la zona más alta de pH, en que se observa que las curvas tienden a hacerse horizontales con los dos colorantes.

La distribución de los puntos isoeléctricos es muy cercana entre sí, y se puede decir que el punto isoeléctrico aparente de la proteína constituyente de estos gránulos se encontraría cerca de pH 6. El punto más elevado de cruce de curvas corresponde a Zenker: se aleja más que el resto de los fijadores y confirma nuestra opinión de que esta proteína se modifica mucho por los constituyentes de este fijador. En el gráfico que se refiere a este estrato (Gráfico 2) la extinción con azul de metileno no aparece representada, por dificultades técnicas para determinarla con el histofotómetro. Sin embargo, por observaciones con el microscopio óptico, pudimos determinar que se produce por debajo del pH 3. Por ello creemos que la composición de la sustancia queratohialínica contiene núcleoproteínas y quizás mucopolisacáridos ácidos.

Estrato Poligonal.— Es una zona de la epidermis que tiene gran abundancia de células, cuya forma es poliédrica. Se le llama también estrato espinoso por las expansiones citoplasmáticas que contactan una célula con otra, éstos han sido llamados impropriamente "puentes intercelulares"².

En nuestro estudio revisamos la composición proteica citoplasmática de las células poligonales más superficiales. En un principio lo hicimos también con las células profundas, pero en nuestras mediciones no encontramos mayor diferencia con las externas (las más superficiales presentan la ventaja de que son de tamaño más grande y no contienen melanina, lo que facilita la medición. La afinidad por colorantes es algo elevada en general.

El Zenker y la mezcla picro-formol-alcohol, son los que más la aumentan.

El punto isoeléctrico se encuentra cercano a 6 y, si admitimos que el alcohol lo desvía un poco en el sentido de la menor acidez, podemos decir que estaría entre 5,5 y 6. El rango de pH en el que se mueve el punto isoeléctrico con los diferentes fijadores es el más pequeño observado para todas las zonas estudiadas (0,7 unidades de pH). La extinción con el colorante básico no se puede apreciar en el gráfico 3, pues al igual que para el estrato granuloso, no fue posible determinarla por medición con el histofotómetro. Sin embargo por observaciones con el microscopio óptico vimos que tiende a producirse a un pH ligeramente inferior a 3.

Porción Papilar del Dermis.— Su estructura es la de una variedad de tejido conjuntivo. Está constituida por fibras conjuntivas finas, abundante sustancia amorfa y las células propias. Conforman las llamadas papilas del dermis. En nuestras mediciones tratamos especialmente de ubicar las fibras, pero no siempre lo logramos, porque todo el tejido presenta bastante homogeneidad estructural. Es probable que haya interferido en cierto grado la tinción de la sustancia amorfa en los valores obtenidos.

El tejido es predominantemente acidófilo, tal como podía esperarse de la naturaleza proteica del colágeno. Es digno de hacer notar el aumento apreciable de acidofilia y disminución de basofilia introducidos por el fijador picro-formol-alcohol lo que hace aparecer el punto isoeléctrico corrido hacia el lado alcalino (pH 8,5). Creemos que esto no es un hecho real sino que se debe a influencia del fijador solamente.

El punto isoeléctrico se encuentra más bien en la zona de 6,5 que es donde se cruzan las otras curvas. La extinción con azul de metileno se produce a pH 5 muy exactamente. Pensamos que no hay mucha interferencia por sustancias que no son proteicas.

Porción Reticular del Dermis.— Su ubicación es más profunda y no tiene un límite neto con la otra región del dermis. La estructura corresponde a la variedad de tejido conjuntivo denso. Destacan en él, fuera de las formaciones anexas a la piel, gruesas fibras colágenas. En ellas hicimos el estudio del material colágeno para complementar lo obtenido en el estrato papilar.

Se nota bastante semejanza en los resultados de ambas porciones dérmicas. Comparativamente hay, en este caso, un aumento bastante marcado de la acidofilia, y pequeño en la basofilia. La única excepción la presenta el picro-formol-alcohol, que disminuye notoriamente la basofilia; lo que unido al aumento de acidofilia lleva el punto isoelectrico hasta 8,8; valor que consideramos muy influido por la acción del fijador, tal como en el caso de la zona papilar.

El verdadero valor del punto isoelectrico debe estar alrededor de 7, cosa que se desprende de la constancia que se observa con los otros fijadores. En todo caso es diferente al dado por la literatura para el colágeno sin fijar. Como la extinción con el colorante básico se produce aproximadamente a pH 5, y en la zona reticular tenemos la seguridad de haber estudiado fibras colágenas, no hay interferencia por sustancias de otra naturaleza. Esto se puede hacer extensivo a la otra zona del dermis en que se obtuvo un valor de extinción semejante.

RESUMEN

Hemos realizado un estudio histoquímico de algunas regiones de la piel humana normal. Con este objeto, hemos empleado la técnica de tinción que utiliza colorantes ácidos y básicos, a pH controlado. Uno de los datos más importantes, obtenido por la aplicación de esta técnica, es la determinación del punto isoelectrico aparente.

Histoquímicamente, se debe estudiar este punto (pHi) en función de la influencia de diversos fijadores químicos. Así, observamos, que la ubicación del punto isoelectrico aparente es modificado en distinto grado por los diversos fijadores. La fijación en formalina 10% y Zenker sin ácido acético, desplaza el punto isoelectrico aparente, hacia una zona más ácida, por tratarse de fijadores que bloquean los grupos amino de las proteínas. El alcohol produciría el menor desplazamiento, debido a que no se une a ninguno de los grupos funcionales de las proteínas. El fijador picro-formol-alcohol, en cambio, desvía el punto isoelectrico hacia el lado menos ácido y, en algunas estructuras de la epidermis, hacia la zona alcalina, debido a que el ácido pícrico de la solución, bloquea los grupos carboxilos.

La fijación también influye en la mayor o menor afinidad del tejido por los colorantes. Hemos podido observar que la formalina disminuye la capacidad de unión por los colorantes ácidos. Zenker aumenta la basofilia del tejido. El alcohol favorece la unión con ambos colorantes, y el picro-formol-alcohol exacerba la acidofilia.

La técnica de tinción a pH controlado nos permitió establecer los valores de extinción con azul de metileno. Así pudimos determinar, diferencialmente, si en las sustancias proteicas estudiadas, se encontraban presentes núcleoproteínas o mucopolisacáridos ácidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. — BAKER, J. "Principles of Biological Microtechnique. Study of fixation and dyes". Edited by Richard Clay and Company Ltda. Londres. 1958.
2. — BLOOM, W.; FAWCETT, D.W. "A Textbook of Histology". Edited by W. B. Saunders. Philadelphia-London. 1964.
3. — CONN, H. J. "Biological Stains". Edited by Williams & Wilkins, Baltimore. 1953.
4. — CROUSE, R. G. "Alkali Soluble Human Epidermal Proteins". The Epidermis. Edited by Academic Press. New York. 1964.
5. — CURRAN, R. C. "Histochemistry of Mucopolysaccharides". Internat. Rev. Cytol. 17: 149. 1964.
6. — DEMPSEY, E.; SINGER, M. "Observations on the chemical cytology of the thyroid gland at different functional stages". Endocrinology. 38:270. 1946.
7. — DEMPSEY, E.; WISLOCKI, G. B. "Histochemical contribution to Physiology". Physiol. Rev. 26: 1. 1946.
8. — DEMPSEY, E.; BUNTING, H.; SINGER, M.; WISLOCKI, G. "The dye binding capacity and other chemo-histological properties of mammalian mucopolysaccharides". Anat. Rec. 98: 417. 1947.
9. — DEMPSEY, E.; SINGER, M.; WISLOCKI, G. Stain Tech. 25: 73. 1950.
10. — FIGUEROA, E.; VALLEJOS, R. "Effect of Oxygen Pressure on Glycogen Synthesis by Rat Liver Slices". Biochem. J. 98: 253. 1966.
11. — FLESCHE, P.; JACKSON ESODA, E. C. "Mucopolysaccharides in human epidermis". J. Invest. Derm. 35: 43. 1960.
12. — HALE, A. J. "The Histochemistry of Polysaccharides". Internat. Rev. Cytol. 13: 1962.

13. — LEVINE, N. D. *Stain Tech.* 14:29. 1939.
 14. — LISON, L. "Histochemie et Cytochemie Animales". Editeur Gauthier-Villars. Paris. 1960.
 15. — MATOLTSY, A. G.; MATOLTSY, M. "A study of morphological and chemical properties of keratohyalin granules". *J. Invest. Derm.* 38: 237-247. 1962.
 16. — MONTAGNA, W.; ERAEN, A.; RADEMACHER, A.; CHASE, H. "Histology and cytochemistry of human skin. IV. The distribution of sulfhydryl and disulfide groups". *J. Invest. Derm.* 23: 23. 1954.
 17. — NIEMEYER, H. "Bioquímica General". Ediciones de la Universidad de Chile. 1964.
 18. — PEARSE, A. E. *J. Clin. Pathol.* 2: 81. 1949.
 19. — PEARSE, A. E. "Histochemistry Theoretical and Applied". Edited by Little, Brown and Company. Boston. 1961.
 20. — PETERSON, R.; WEISS, J. *Endocrinology.* 57: 96. 1955.
 21. — RUDALL, K. "The proteins of the mammalian epidermis". *Adv. Protein Chem.* 7: 253. 1952.
 22. — SINGER, M.; WISLOCKI, G. "The affinity of syncytium, fibrin and fibrinoid of the human placenta for acid and basic dyes under controlled conditions of staining". *Anat. Rec.* 102: 175. 1948.
 23. — SINGER, M.; MORRISON, P. "The influence of pH, dye, and salt concentration on the dye binding of modified and unmodified fibrin". *J. Biol. Chem.* 175: 133. 1948.
 24. — SINGER, M. "Factors which control the staining of tissue sections with acid and basic dyes". *Internat. Rev. Cytol.* 1: 211. 1952.
 25. — SOKOLOFF, L.; MUND, A.; KANTOR. "The affinity of fibrinoid substances for acid dyes". *Am. J. Path.* 27: 1037. 1951.
 26. — SPICER, S.; LILLIE, R. D. "Histochemical identification of basic proteins with Biebrich Scarlet at alkaline pH". *Stain Tech.* 36: 365. 1961.
 27. — SPICER, S. "Histochemically selective acidophilia of basic nucleoproteins in chromatin and nucleoli at alkaline pH". *J. Histochem. Cytochem.* 10: 691. 1962.
 28. — WEISS, L. P. "Binding of acid and basic dye at varied pH by blood and bone marrow cells of man". *Blood.* 8: 249. 1953.
 29. — WEST, E. S.; TODD, W. R. "Textbook of Biochemistry". Edited by The McMillan Company. New York. 1953.
-