

**ESTUDIO HISTOQUIMICO Y ULTRAESTRUCTURAL DE LA
CELULA HEPATICA EN UN CASO DE GLUCOGENOSIS TIPO I**

- Dra. Haydée V. de Castejón.
- Dr. Orlando J. Castejón.

Instituto de Investigación Clínica.
Facultad de Medicina.
Universidad del Zulia.
Apartado 1151.
Maracaibo - Venezuela.

- Dr. Fernando Romero Rincón.
Hospital de Niños de Maracaibo.
Venezuela.

INTRODUCCION

Las glucogenosis constituyen un grupo de enfermedades congénitas y familiares que se caracterizan por anomalías cualitativas o cuantitativas del depósito de glucógeno en los tejidos.

Hers en 1964(11) y Zellweger y colaboradores en 1965(32), haciendo una revisión en la historia de las glucogenosis, refieren que probablemente las primeras descripciones clínicas de este tipo de enfermedad fueron efectuadas por Wagner y Parnas en 1921 (citado por Zellweger y col.(32) y Parnas y Wagner en 1922 (citado por Hers(11), quienes reportaron el caso de un niño con hepatomegalia asociada a la alteración del metabolismo de los carbohidratos; su historia clínica y la baja respuesta de la glicemia al inyectarle adrenalina han hecho pensar, a posteriori, en una glucogenosis hepática, aunque en aquella época no fue diagnosticada como tal. En 1929, Von Gierke (citado por Hers(11) dio a conocer la primera descripción anatomopatológica de la enfermedad que él llamó "hepato-nefromegalia glucogénica". Desde tal fecha, centenares de casos han sido reportados en la literatura y se han realizado diversos estudios conducentes al mejor conocimiento de este síndrome, siendo los resultados de las investigaciones bioquímicas, especialmente las enzimá-

ticas, los que han hecho posible catalogar las glucogenosis como debidas a un trastorno del metabolismo de los carbohidratos y clasificarlas de acuerdo al defecto enzimático específico y a las alteraciones producidas en la estructura del glucógeno tisular acumulado.

El estudio enzimático de este desorden genético fue iniciado por Cori y Cori en 1952(2), quienes reportaron que en el hígado de los pacientes afectados de glucogenosis, la glucosa 6-fosfatasa estaba ausente o deficiente, causa por la cual la conversión de glucosa 6-fosfato en glucosa no se cumplía, trayendo como consecuencia la gran acumulación de glucógeno en el hígado, riñón y otros tejidos. En trabajos posteriores, Cori(3) hace énfasis en que esta enfermedad no puede ser tratada como única y uniforme, recomendando a su vez una clasificación basada en el defecto enzimático que la provoca. Dicha clasificación ha permitido añadir nuevos tipos reconocidos, sin alterar su patrón original. Hasta el presente, se han establecido siete tipos de glucogenosis, de los cuales dos cursan con anomalías en la estructura macromolecular del glucógeno y el resto son causados por defectos enzimáticos, bien sea en la síntesis o en la degradación del glucógeno de estructura normal. Hug y colaboradores han agregado dos nuevos tipos a la clasificación(13); sin embargo, el defecto enzimático de éstos no está aún bien dilucidado.

A pesar de que los estudios bioquímicos han permitido determinar en esta enfermedad el defecto enzimático y su localización metabólica, poco se conoce acerca de las modificaciones producidas a nivel celular, como consecuencia de la alteración enzimática y del acúmulo del glucógeno.

Con fines diagnósticos recibimos en nuestro laboratorio una muestra de tejido hepático obtenido por punción biopsia de un paciente con diagnóstico clínico de glucogenosis. El estudio histoquímico de la muestra evidenció en el hepatocito un depósito anormalmente grande de glucógeno y déficit de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, llegándose a la conclusión diagnóstica de glucogenosis tipo I de Cori.

El estudio de tal muestra nos ha permitido hacer un análisis de las características histoquímicas y ultraestructurales de la célula hepática y del glucógeno acumulado, con el fin de ampliar aún más el conocimiento existente y tratar de clarificar los mecanismos productores de dicho desorden genético. Los resultados de tal análisis y sus consideraciones son el objeto de la presente comunicación.

Reporte del caso.

Niño del sexo masculino, de 4 años de edad, que ingresa al Hospital de Niños de Maracaibo (P. M. Historia No. 30558) por presentar la siguiente sintomatología: Pérdida del conocimiento, crisis periódicas de

sudoración y adinamia, vómitos frecuentes desde la edad de año y medio, aumento progresivo del abdomen desde los dos años. La historia familiar no aporta dato concluyente. Producto del cuarto embarazo a término con parto eutócico. Tiene tres hermanos aparentemente sanos. Los antecedentes familiares no fueron estudiados correctamente.

Al examen físico (Fig. 1) se trata de un niño con talla de 90 cms. y peso de 16,900 gr., con palidez generalizada de la piel e hipertrichosis en espalda y miembros. Hábitus pastosos con tendencia a la adiposidad y marcha similar a la de mujer embarazada. Abdomen globuloso con circunferencia abdominal de 63,5 cms. Red venosa colateral. A la palpación abdominal: hígado grande, duro, no doloroso, evidenciable hasta la cresta ilíaca y hasta el hipocondrio izquierdo. No se apreciaron otras tumoraciones o visceromegalias. La percusión y auscultación cardíaca presentaron características normales. Se observó hipotonía muscular discreta.

El examen radiológico mostró en tórax, la silueta cardíaca dentro de límites normales; cráneo radiológicamente normal; huesos largos con densidad ósea disminuida y ausencia parcial de la esponjosa en las metafisis.

Los exámenes de química sanguínea mostraron moderada hipoglucemia 60-70 mg o/o, hipercolesterolemia (396 mg.), disminución del fosfato inorgánico sérico (15 m Eq.) y fosfatasa alcalina sérica normal (8,2 U. Bodansky).

Las pruebas relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos mostraron que la administración de 0,2 cc. de adrenalina, por vía subcutánea, provocó una respuesta anormalmente baja en los niveles de glicemia (Fig. 2) y la inyección por vía endovenosa de 8,5 gm. de glucosa en 5 minutos, condujo a un aumento de la glicemia que se mantuvo alta aún dos horas después de su administración (Fig. 3). Uroanálisis repetidos evidenciaron acetona y albúmina positivas en las primeras determinaciones, haciéndose negativos en los exámenes subsiguientes, probablemente debido a la modificación de la dieta alimenticia hospitalaria.

MATERIAL Y METODO

La muestra de tejido hepático obtenida por punción biopsia fue dividida en porciones para estudiar, por medio del microscopio de luz y del electrónico, las características histoquímicas y ultraestructurales del hepatocito y del glucógeno acumulado y a la vez realizar la determinación de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa. Dicho material fue sometido a los siguientes procesos:

Fig. 1. Niño afectado de glucogenosis tipo I de Cori. Obsérvese la tendencia a la adiposidad, el abdomen globuloso y la lordosis compensatoria.

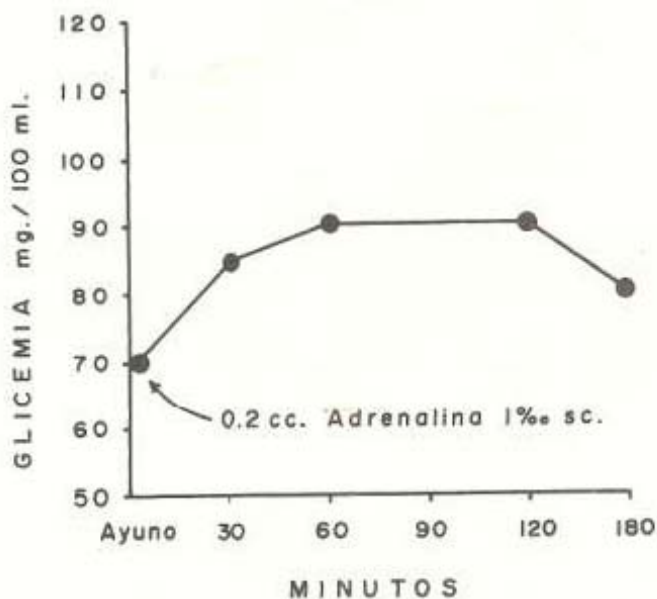


Fig. 2. Efecto de la administración subcutánea de adrenalina sobre los niveles de glicemia.

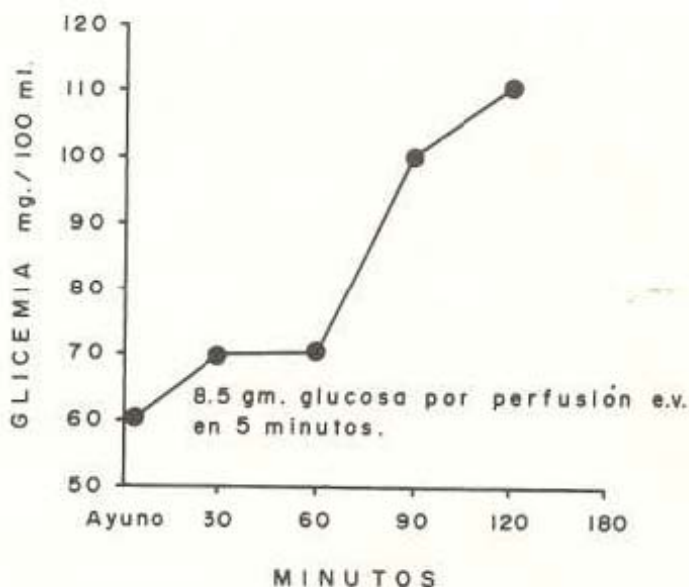


Fig. 3. Efecto de la administración endovenosa de glucosa sobre los niveles de glicemia.

Una porción de la muestra (a) fue fijada por 19 horas a 4°C en el fluido alcohólico Gendre de Lison, el cual preserva con eficacia el glucógeno tisular. El procedimiento continuó con deshidratación en alcohol absoluto, infiltración en xilol e inclusión en parafina.

Un segundo segmento (b) se fijó en glutaraldehído al 4 o/o en solución reguladora de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,4 por 3 horas a 4°C; continuándose con lavado del material en la solución reguladora, deshidratación alcohólica, infiltración en xilol e inclusión en parafina.

Una tercera porción (c) fue congelada de inmediato en criostato, a -30°C, sin fijación química previa, con el fin de estudiar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa en el tejido.

Una cuarta muestra (d), destinada a ser estudiada con el microscopio electrónico previo seccionamiento en fragmentos muy pequeños de 1 a 2 mm. de grosor, fue fijada en glutaraldehído al 4 o/o, preparado en solución reguladora de fosfato de sodio, pH 7,4 y osmolaridad de 380-410 mOsm/litro, por 2 horas a 4°C. Se continuó con lavado por 1 hora en la

solución reguladora y fijación secundaria por dos horas en solución al 1 o/o de tetraóxido de osmio, en fosfato de sodio 0,1M, a pH 7,4 y osmolaridad de 210 mOsm/litro. La deshidratación se efectuó en concentraciones crecientes de etanol y en dos pasajes sucesivos de óxido de propileno, incluyéndose los fragmentos finalmente, en Epón 812(15).

Como control se utilizó el hígado de un ratón adulto normal, procesado en condiciones idénticas a la biopsia hepática estudiada.

Las secciones de 6 a 8 micras de grosor de las porciones (a) y (b) fueron desparafinadas, hidratadas y sometidas a las siguientes reacciones histoquímicas, que conducen a la demostración de polisacáridos tisulares.

Coloración del carmín según la técnica de Best (Pearse 1960, pág. 841)(19).

Coloración del ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS), según la técnica de Hotchkiss(12) y Mc Manus(16).

Reacción de Bauer (Gurr 1962, pág. 145)(9).

Coloración del azul alcian en solución a pH 2,5, según la técnica de Steedman(27) modificada por Mowry(18), utilizando como colorante de fondo el rojo nuclear rápido. Esta coloración fue practicada para demostrar mucopolisacáridos ácidos.

Coloración del azul alcian en solución a pH 1,5 según la técnica de Lev y Spicer(14), practicada con el fin de hacer visibles los mucopolisacáridos ácidos sulfatados.

Coloración del azul alcian a pH 2,5 —ácido periódico— reactivo de Schiff según la técnica de Wagner y Shapiro(29). Esta doble coloración permite la observación de los polisacáridos en general y de los mucopolisacáridos ácidos en particular.

La digestión enzimática del glucógeno tisular se efectuó utilizando alfa amilasa (Sigma Chemical Co.) en solución acuosa al 1 o/o a 37°C, por media a una hora, o malta diastasa (E. Merck) al 1 o/o en solución acuosa, a 37°C, por el mismo tiempo. Cumplido el tiempo de digestión, las secciones se procesaron de acuerdo a las técnicas de coloración antes mencionadas.

Para el estudio al microscopio electrónico de la célula hepática y del glucógeno acumulado, se utilizó la porción (d) incluida en Epón(15) y cortada en secciones finas con ultramicrotomo LKB o Porter-Blum,

provistos de cuchilla de vidrio o de diamante. Dichas secciones fueron recogidas sobre rejillas de cobre, desnudas o cubiertas con una película de Formvar y estabilizadas con un baño de carbón. Posteriormente se colorearon con una solución saturada de acetato de uranilo(30) o citrato de plomo a pH alto(23) y se examinaron con un microscopio electrónico Siemens Elmiskop I. Las estructuras submicroscópicas de las fotomicrografías electrónicas se midieron con una máquina Universal Cambridge.

Para el estudio de la actividad enzimática de la glucosa-6-fosfatasa en el tejido hepático, las secciones de 10 micras de la porción (c) se incubaron en la sal potásica de glucosa-6-fosfato según la técnica de Chiquoine(4).

RESULTADOS

Microscopía de luz.

Tanto el tejido fijado por el fluido alcohólico Gendre como el fijado por glutaraldehído, presentaron características histológicas y tintoriales similares. La coloración del carmín de Best, la reacción de Bauer y la del ácido periódico-reactivo de Schiff mostraron en el tejido características muy parecidas; razón por la cual sólo describiremos la apariencia del hapatocito coloreado con carmín de Best que nos muestra indistintamente la observada con las otras dos coloraciones. La estructura histológica del hígado se mostró considerablemente alterada, notándose un aumento irregular de los hepatocitos, y prominente distorsión de su arquitectura lobular. Como se observa en las figuras 4 al 8 la coloración del carmín de Best hizo visible en las células hepáticas un material rosado intenso que ocupando todo el citoplasma, en ocasiones desplazaba el núcleo hacia la periferia de la célula (Figs. 5 y 6). Se observaron también numerosas vacuolas de tamaño variable (Fig.6), distribuidas en todo el citoplasma, las cuales aparecían como espacios vacíos rodeados por el depósito carmín positivo. La naturaleza de los fijadores empleados no alteró la apariencia vacuolar del citoplasma. En algunos hepatocitos se observó además en el citoplasma, la presencia de cuerpos globulares (Figs. 4, 5 y 7) de tamaño variable que contenían el material carmín positivo y se hallaban o no rodeados del mismo material menos coloreado. Las membranas celulares se mostraron interrumpidas especialmente en aquellos hepatocitos muy sobrecargados de dicho depósito. En algunas áreas del tejido este mismo material se observó en el espacio extracelular (Fig. 4). Otras células vacías y degeneradas mostraron solamente los perfiles de las membranas y en ocasiones el núcleo céntrico o excéntrico (Fig 4). El núcleo de tamaño variable mostró algunas veces un depósito de material PAS positivo (Figs. 5 y 8). En otros hepatocitos el núcleo no fue visible o se mostraba totalmente vacuolado.

Fig. 4. Coloración: carmín de Best. La arquitectura lobular se muestra distorsionada. Algunos hepatocitos aparecen intensamente coloreados, mientras que otros muestran citoplasma vacuolado, con pequeñas inclusiones carmín positivas y soluciones de continuidad en sus membranas plasmáticas. X400.

Fig. 5. Coloración: carmín de Best. En el centro de la fotografía aparece una célula parenquimatosa aumentada de tamaño, con contenido citoplasmático intensamente positivo y espacios vacuolares. En su vecindad se observan otras células hepáticas totalmente cargadas de glucógeno, el cual rechaza el núcleo hacia la periferia. X400. Ampliación fotográfica 2X.

Fig. 6. Coloración: carmín de Best. Mayor aumento de una célula hepática cuyo contenido citoplasmático aparece fuertemente positivo, con gran cantidad de vacuolas y núcleo rechazado hacia la periferia. X1000. Ampliación fotográfica 1,5X.

Fig. 7. Coloración: carmín de Best. Ampliación de una parte de la figura 4 que muestra pequeños cuerpos globulares carmín positivos rodeados de un material rosado menos intenso X400. Ampliación fotográfica 3X.

Fig. 8. Coloración: carmín de Best. Mayor aumento de un hepatocito totalmente cargado de glucógeno que muestra un núcleo céntrico el cual contiene también material glucogenico. X1000. Ampliación fotográfica 2X.

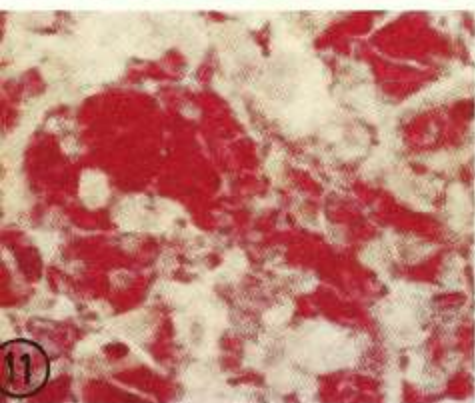
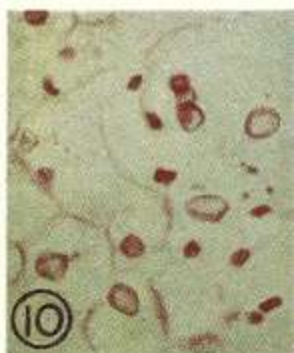
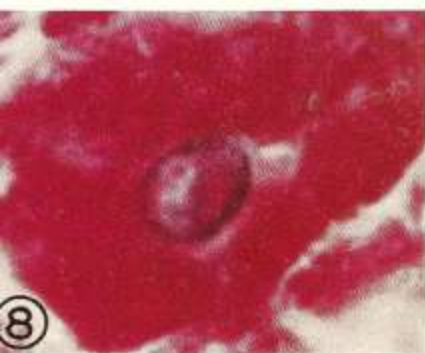
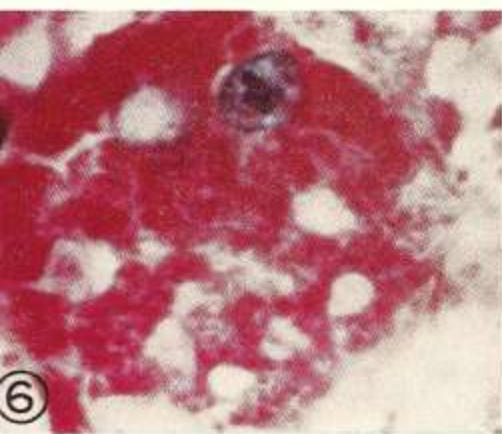
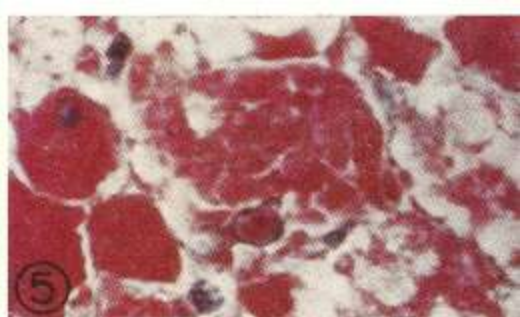
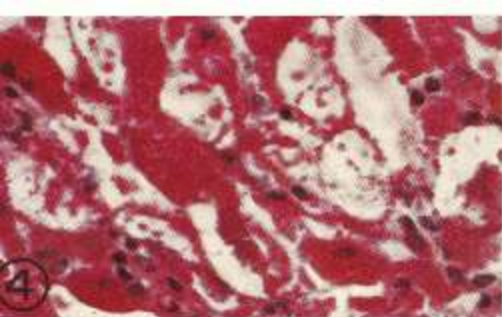
Fig. 9. Tejido hepático que ha sufrido la digestión enzimática de la alfa amilasa, a 37°C por una hora. Coloración ácido periódico-reactivo de Schiff. Obsérvese la completa desaparición del material PAS positivo. Este resultado es indicativo de que dicho material está constituido por glucógeno. X400. Ampliación fotográfica 1,5X.

Fig. 10. Coloración: azul alcian a pH 2,5-Rojo nuclear rápido. El contenido citoplasmático de las células hepáticas no fue coloreado por el azul alcian. Este resultado es demostrativo de la ausencia de mucopolisacáridos ácidos en el material de depósito anormalmente acumulado. X400.

Fig. 11. Coloración: azul alcian a pH 2,5-ácido periódico-reactivo de Schiff. En esta doble coloración, sólo la reacción del PAS mostró fuerte positividad en los hepatocitos. X400. Ampliación fotográfica 2X.

Fig. 12. Reacción de Chiquoine. Esta reacción histoquímica demostrativa de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, mostró en el tejido hepático de nuestro caso la gran deficiencia de dicha enzima. Compárese con la figura 13 en la cual se demuestra la actividad de la enzima en el tejido hepático de un ratón normal utilizado como control. X400. Ampliación fotográfica 1,5X.

Fig. 13. Tejido hepático de un ratón albino adulto normal. Reacción de Chiquoine. Nótese la actividad de la enzima en el parénquima hepático utilizado como control. X400. Ampliación fotográfica 1,5X.



La digestión enzimática con alfa amilasa o con diastasa permitió observar que al cabo de media hora de digestión, el material PAS positivo (Fig.9), disperso libremente en el citoplasma había desaparecido; se observó sólo una ligera positividad en algunos cuerpos globulares y en algunos núcleos. Al cabo de una hora de digestión la tinción se hizo completamente negativa. Este resultado nos permite afirmar que el material acumulado en el hepatocito corresponde a glucógeno.

Las tinciones de azul alcian a pH 2,5 (Fig.10) y a pH 1,5 dieron resultados negativos ya que no se produjo ninguna coloración ni en el citoplasma ni en el núcleo. De este resultado deducimos que el depósito acumulado en las células hepáticas no contiene mucopolisacáridos ácidos. Con la doble coloración azul alcian-PAS, solamente la segunda coloración, el PAS, mostró resultados positivos cuyas características ya hemos descrito previamente (Fig.11).

La reacción de Chiquoine, conducente a demostrar la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, mostró en los hepatocitos una pérdida casi absoluta de la actividad enzimática (Fig. 12) a diferencia del hígado control el cual presentó gran actividad (Fig. 13).

Microscopía Electrónica.

Descripción general del hepatocito. El estudio electronomicroscópico de la célula hepática confirmó los hallazgos obtenidos con el microscopio de luz.

Se observó en el citoplasma zonas necróticas extensas (Figs. 14, 15, 16, 17) que mostraban muy baja densidad electrónica con desaparición de la matriz citoplasmática, las citomembranas, organelos e inclusiones. Estas zonas necróticas están irregularmente circunscritas por estrechas bandas de retículo endoplasmático rugoso, el cual aparece rechazado hacia la envoltura nuclear o hacia la periferia del citoplasma. Las áreas necróticas contienen, en forma aislada, glucógeno mono y multigranular, glucogenosomas, cuerpos densos, mitocondrias degeneradas muy electrondensas, trabéculas de una substancia homogénea densa y vacuolas confluentes.

La superficie celular se halla cubierta por haces de tejido conectivo (Fig. 18) mezclado con gránulos de glucógeno. En aquellas células donde hay ruptura de la membrana celular, es fácil observar gránulos de glucógeno en los espacios de Disse. En estos espacios pueden observarse formas mono y multigranulares de glucógeno, los cuales son fagocitados por las células de Kupffer.

A continuación hacemos un análisis de las alteraciones de las diferentes estructuras subcelulares del hepatocito.

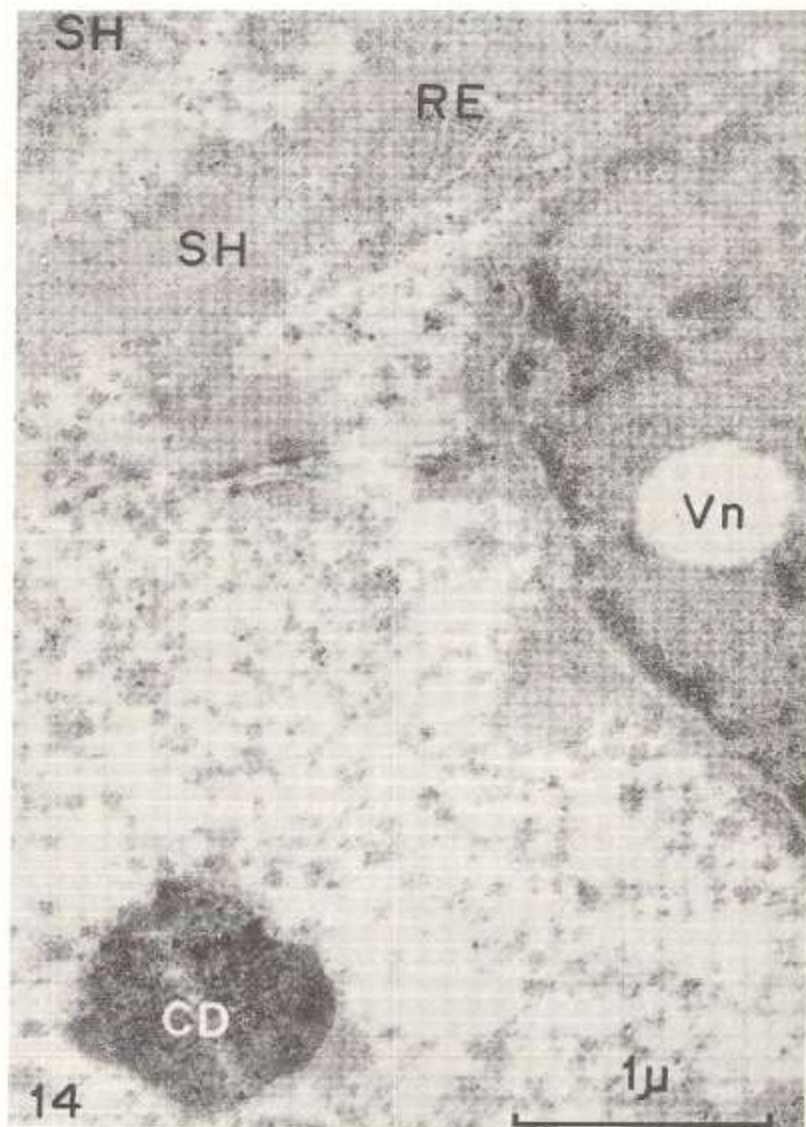


Fig. 14. Hepatocito necrótico. Se observan fragmentos del retículo endoplasmático rugoso (RE) mezclado con una substancia homogénea densa (SH). El glucógeno aparece en forma mono y multigranular distribuido en la matriz del hialoplasma, la cual ha perdido su densidad electrónica característica. Se observa además un cuerpo de alta densidad electrónica (CD). Una banda fina de material granular aparece adosada a la membrana nuclear externa. El núcleo muestra una vacuola (V) y aumento de la densidad del núcleoplasma. La distribución de la cromatina es aparentemente normal. Magnificación: 36.000X.



Fig. 15. Hepatocito que muestra necrosis del hialoplasma (parte inferior de la figura) con restos del retículo endoplasmático (RE), mitocondrias densas (M) y gránulos de glucógeno dispersos. Magnificación: 36.000X.

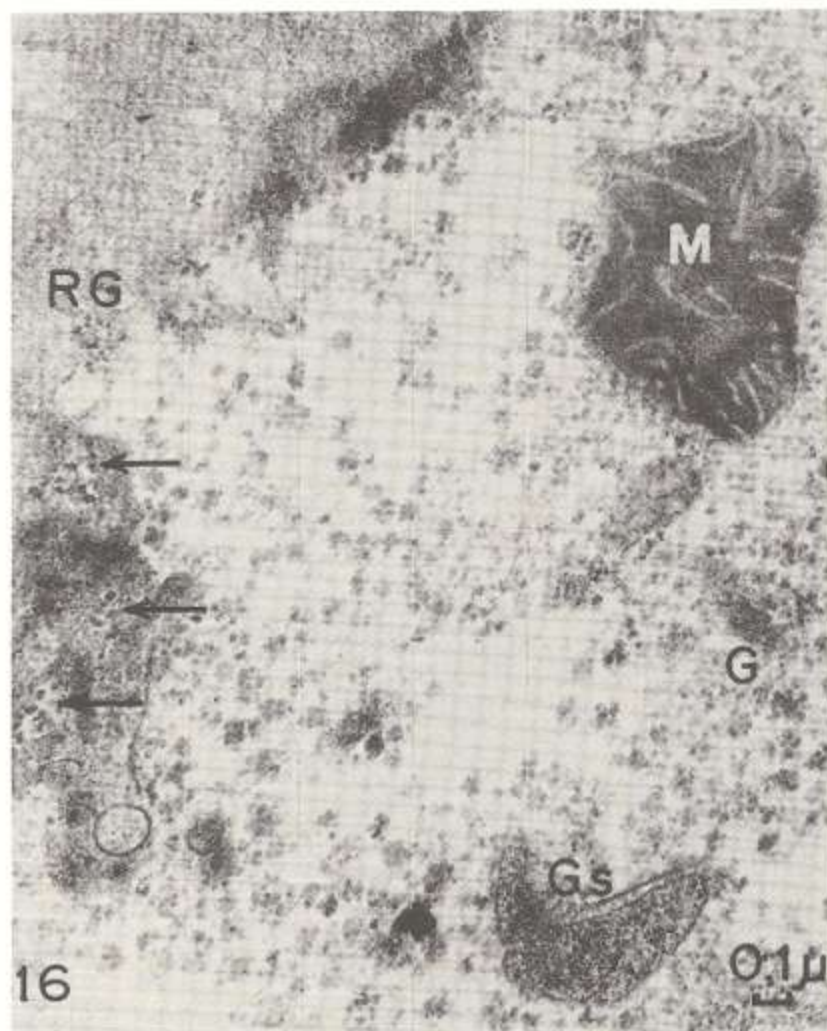


Fig. 16. Segmento de la periferia del hepatocito mostrando necrosis extensa del citoplasma. En la parte superior de la figura se observa una banda de material retículo-granular (RG) que contiene pequeñas inclusiones glucogénicas (flechas). Nótese además la presencia de una mitocondria (M) de matriz muy densa y de crestas claras, y de un glucogenosoma (Gs) limitado por una membrana trilaminar. Magnificación: 50.000X.

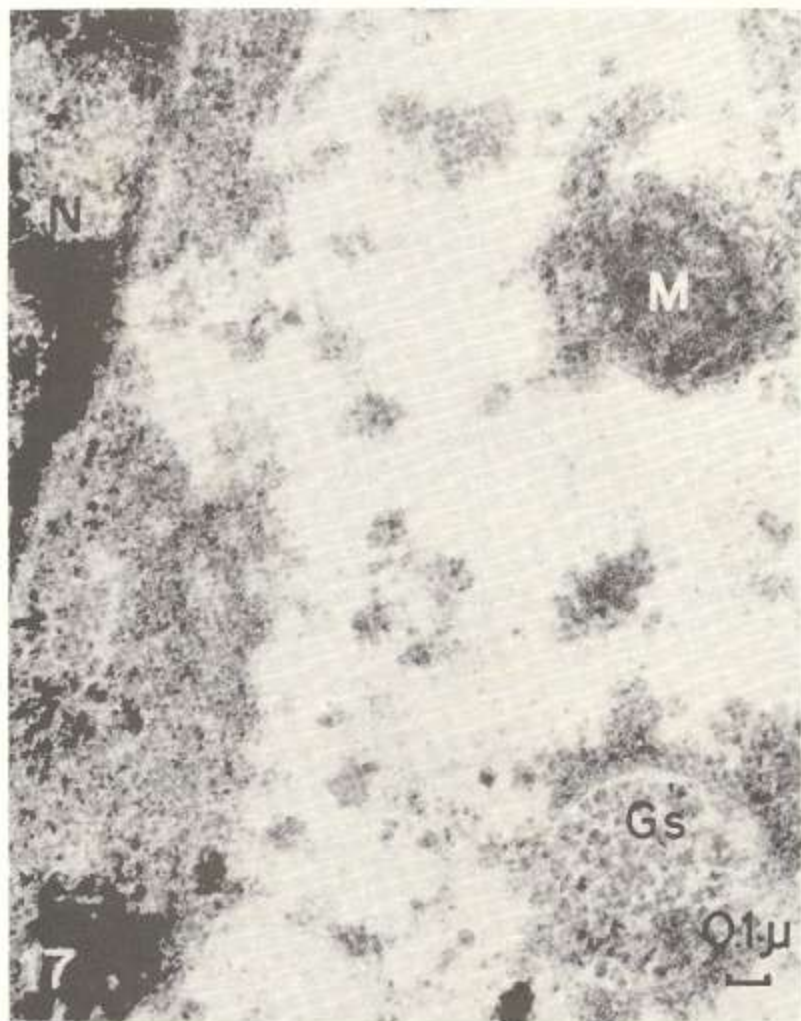


Fig. 17. En este hepatocito las áreas necróticas claras aparecen limitadas por restos de citoplasma degenerado con gránulos de glucógeno. Se observa una mitocondria (M) densa y un glucogenosoma (Gs) que muestra una mezcla de glucógeno mono y multigranular dispuesto en forma laxa y cuya membrana limitante aparece enmascarada por glucógeno citoplasmático. En la parte superior izquierda de la figura se observa parte del núcleo (N). Magnificación: 60.000X.

Retículo endoplasmático. El glucógeno, que ocupa grandes áreas del citoplasma, rechaza el retículo endoplasmático rugoso hacia la periferia de la célula y hacia la membrana nuclear; dicho retículo (Figs. 14, 15, 18, 19, 20) mostró un estado atrófico con dilataciones fusiformes de los canalículos y agrandamiento de las vesículas y de las cisternas. Estas últimas tienden a ser confluentes y a formar vacuolas grandes. Los canalículos pierden su disposición en paralelo y tienden a adoptar contornos circulares y en forma de herradura. Otros muestran un aspecto ramificado, trabecular o laberíntico (Figs. 19, 20). Las cisternas dilatadas muestran islotes citoplasmáticos en su interior.

Mitocondrias. Se observó un marcado pleomorfismo mitocondrial (Fig. 19), mostrando algunas un aspecto hipertrófico. La matriz mitocondrial es de alta densidad electrónica (Figs. 15, 16, 17, 18, 19, 21), lo cual contrasta fuertemente con la baja densidad de las crestas mitocondriales. Generalmente las mitocondrias se observaron asociadas a un material homogéneo moderadamente electrondenso, a vacuolas de tamaño variable, a figuras mielínicas, y rodeadas por el glucógeno anormalmente depositado. Algunas mitocondrias muestran gránulos de alta densidad electrónica (Fig. 21), como se observa en los hepatocitos normales. No se encontró glucógeno intramitocondrial. Se observaron áreas del citoplasma donde grupo de mitocondrias circunscriben depósitos de glucógeno.

Cuerpos densos. Se distinguieron varios tipos de inclusiones densas cuyo contenido es variable, y los cuales parecen corresponder a lisosomas.

a) Cuerpos de moderada densidad electrónica, redondeados, de contornos irregulares y tamaño variable, con invaginaciones superficiales y halo periférico de alta densidad electrónica. Muestran una matriz homogénea y contienen algunos restos de membrana en su interior (Fig. 20).

b) Cuerpos de contenido granular grueso, presumiblemente formas multigranulares de glucógeno, provistos de una membrana limitante, la cual se halla rodeada por un material granular fino, de moderada densidad electrónica (Fig. 14).

c) Cuerpos densos (Figs. 21, 22, 23) cuyo contenido granular, predominantemente partículas finas, se muestra mezclado con granulaciones gruesas. Están limitados por una membrana trilaminar, cuya hoja interna se halla separada del contenido granular por un espacio claro. La hoja externa está asociada a un material granular fino. En algunas fotomicrografías, esta membrana aparece interrumpida en su trayecto (Fig. 21). Estos cuerpos pueden estar íntimamente adosados a la envoltura nuclear.

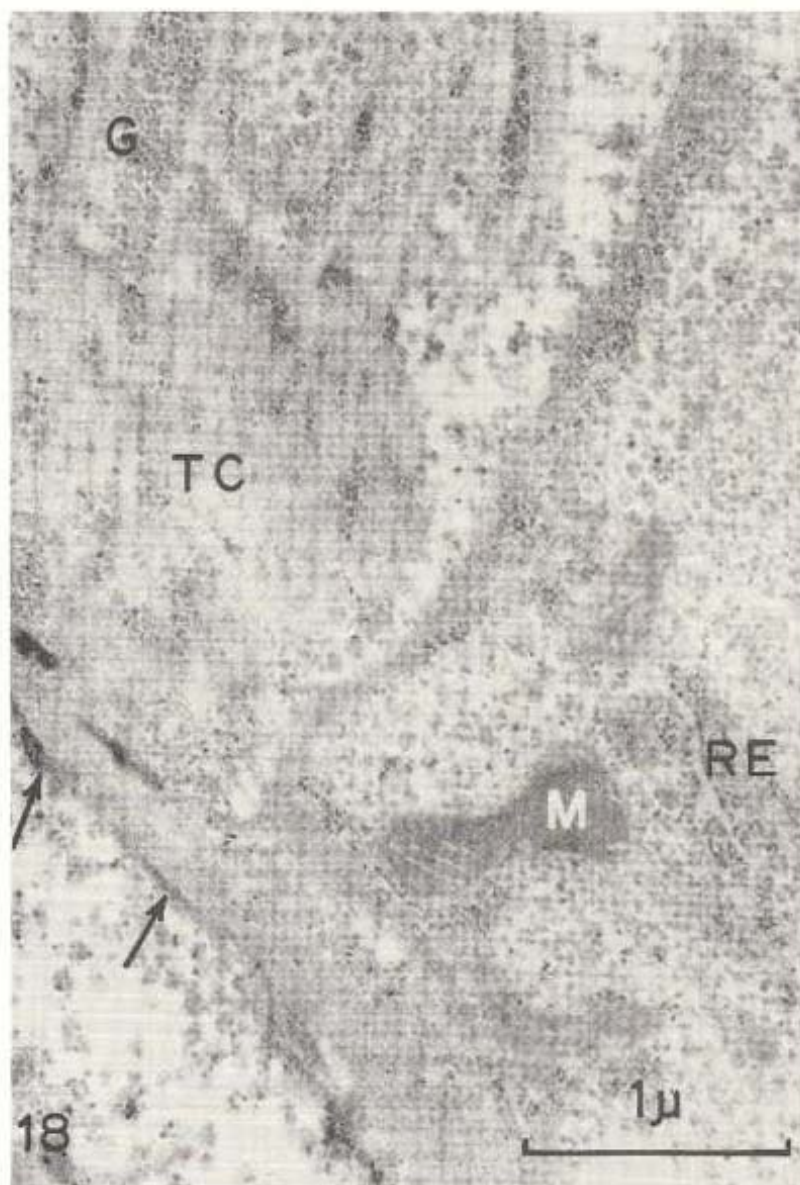


Fig. 18. Citoplasma necrótico de un hepatocito mostrando haces de tejido conectivo (TC) entre los cuales se intercalan gránulos de glucógeno (G). Estos manojos se hallan rodeados por material retículo-granular amorfo, el cual se muestra marcadamente electrondenso en su vecindad al citoplasma necrótico (flechas). A su alrededor se observan escasos fragmentos del retículo endoplasmático rugoso (RE) y mitocondrias (M). Magnificación: 36.000X.

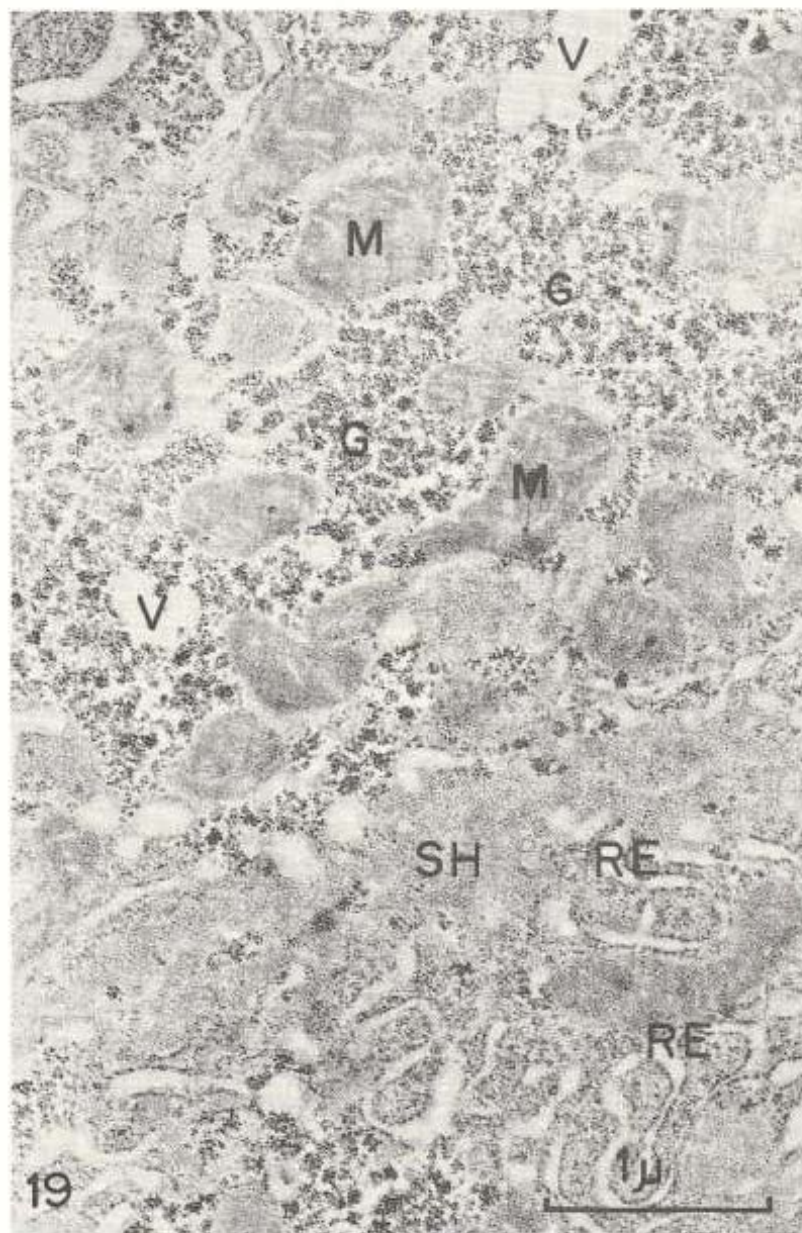


Fig. 19. Citoplasma del hepatocito mostrando el retículo endoplasmático rugoso (RE) de aspecto laberíntico, una substancia homogénea densa (SH), mitocondrias pleomórficas de alta densidad electrónica (M), acúmulos de glucógeno (G) y vacuolas confluentes (V) separadas por membranas finas. Magnificación: 32.500X.

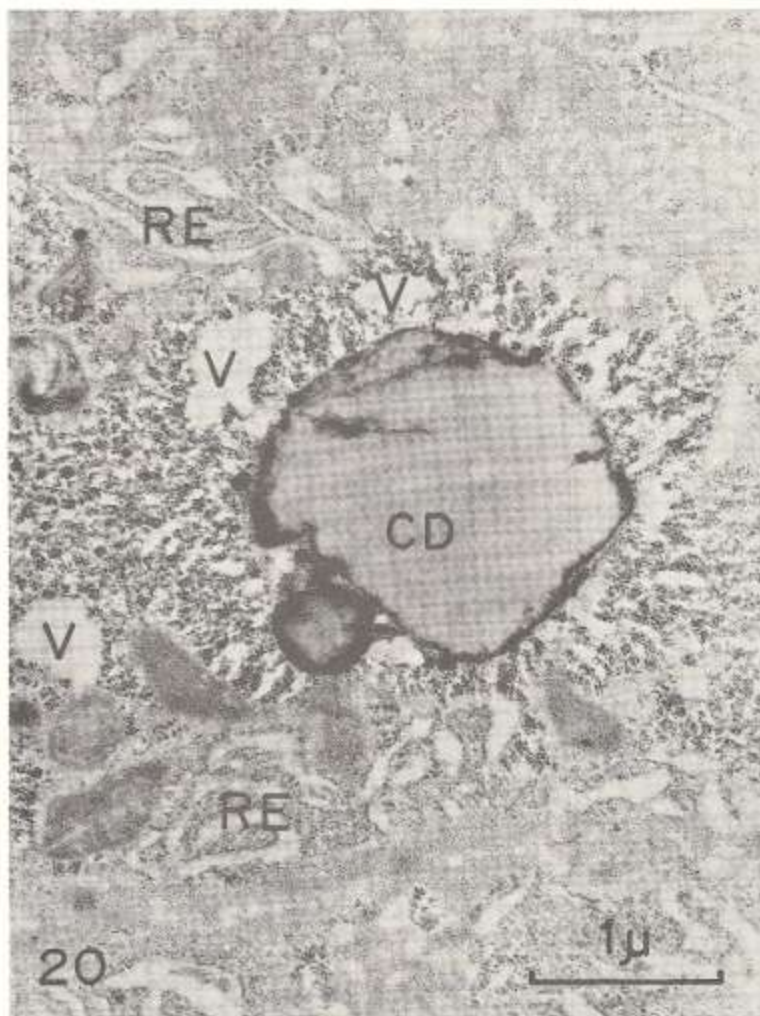


Fig. 20. Cuerpos densos (CD) presumiblemente lisosomas secundarios que muestran una matriz homogénea grisácea y restos de membranas en su interior. Su contorno es irregular y electrodensos. En el citoplasma vecino se observan vacuolas y acúmulos de glucógeno separados por canales claros irregulares. Hacia la periferia, el retículo endoplasmático (RE) aparece dilatado, de aspecto ramificado y laberintiforme. Magnificación: 26.000X.

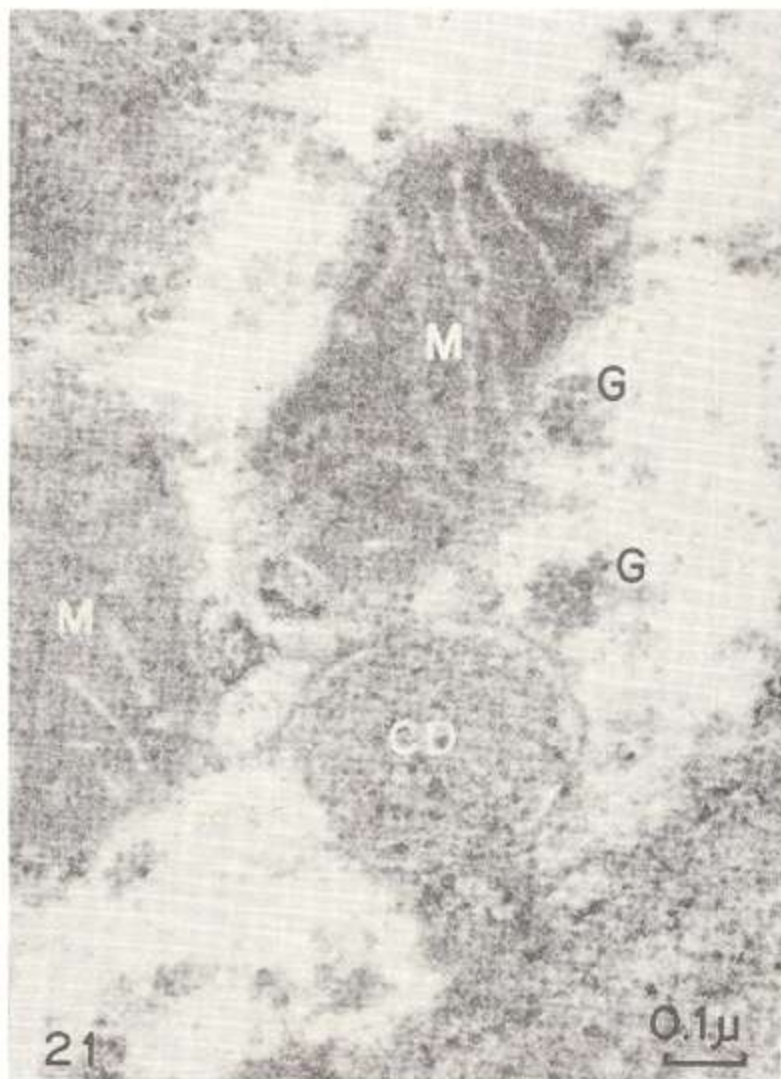


Fig. 21. Cuerpo denso (CD) que contiene un material granular fino, homogéneo de moderada densidad electrónica y un material granular grueso, de alta densidad electrónica. Nótese la interrupción extensa de su membrana limitante. El material observado en su vecindad es de aspecto similar al de su contenido, lo cual permite sospechar que se trata de una vacuola autofágica. Las mitocondrias (M) muestran aspecto degenerado con escasa visibilidad de la doble membrana mitocondrial y granulaciones muy electrondensas sobre la matriz densa. Entre ambas estructuras y sobre el hialoplasma necrótico se observa glucógeno (G) del tipo alfa. Magnificación: 120.000X.

Complejo de Golgi. No ha sido observado hasta ahora. Si consideramos además que sólo se observan algunas vesículas de membranas lisas, intercaladas entre las masas de glucógeno, inferimos que el sistema de membranas lisas del hepatocito, incluido el complejo de Golgi, tiende a desaparecer en esta enfermedad.

Vacuolas. Se observan gran cantidad de vacuolas (Figs. 19, 20, 24) limitadas por membranas, de tamaño variable, de contorno irregular y cuyo contenido es de baja densidad electrónica. Algunas de ellas mostraron restos de membranas y material amorfo de moderada densidad electrónica. Se observaron grandes y pequeñas vacuolas, dispuestas en serie y separadas por delgados tabiques citoplasmáticos o por membranas (Fig. 24).

Glucógeno. El depósito rosado intenso observado en el hepatocito con el microscopio óptico utilizando las reacciones del carmín de Best, Bauer y PAS, correspondió en el estudio electronmicroscópico de la célula, al glucógeno en sus distintas formas de agregación, constituyendo los resultados de dicho estudio el hallazgo más relevante debido a la gran variabilidad, en cuanto a forma y modo de agregación, del glucógeno anormalmente acumulado. Como se observa en todas las fotomicrografías electrónicas mostradas en la presente comunicación, el glucógeno monogranular, cuyas partículas miden 300 Å de diámetro promedio y que corresponden según la nomenclatura de Drochman(7) a las partículas beta del hepatocito normal, se muestra entremezclado con el glucógeno multigranular (tipo alfa de Drochman) el cual, dispuesto en rosetas, está constituido por grupos de partículas redondeadas u ovals de 230 Å de diámetro promedio. Dichas rosetas alcanzan gran tamaño y ocupan en forma libre y dispersa, extensas áreas del citoplasma.

Glucogenosomas. Se observó además (Figs. 16, 17, 23, 26, 27, 28), la presencia de cuerpos redondeados u ovals, variables en tamaño, rodeados por una membrana limitante, que contienen gran cantidad de glucógeno monogranular fuertemente compactado, mezclado con glucógeno multigranular. La membrana limitante trilaminar, aparece enmascarada, en gran parte de su trayecto, por un material de alta densidad electrónica que se adhiere predominantemente a su superficie citoplasmática. Dicho material contiene, en ocasiones, gránulos de glucógeno. Estos cuerpos aparecen generalmente aislados sobre áreas necróticas del citoplasma y asociados con vacuolas autofágicas, con escasos contornos circulares del retículo endoplasmático rugoso y con fibras de tejido conjuntivo (Fig. 26).

Núcleo. El núcleo céntrico o excéntrico exhibió la cromatina nuclear dispuesta según el patrón característico de la fijación por glutaraldehído(24), en forma de una banda fina irregular, adherida a la membrana

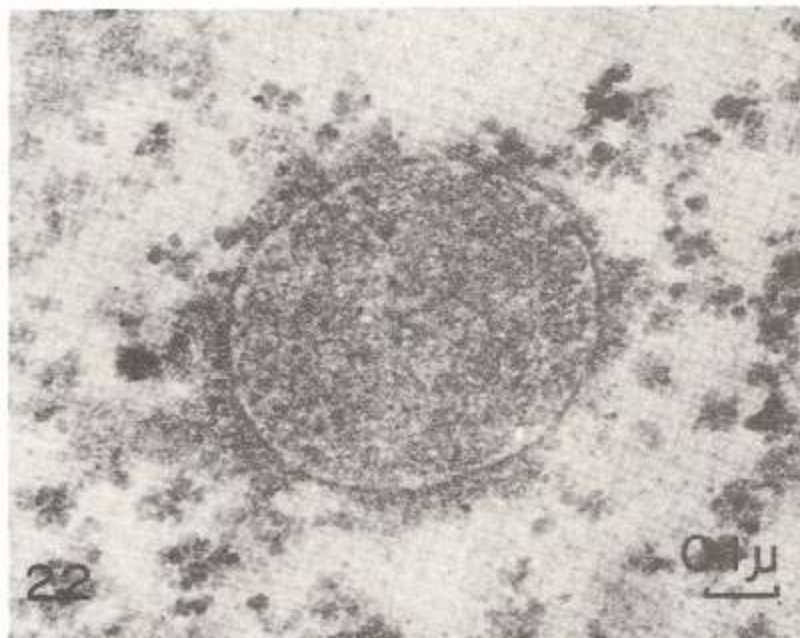


Fig. 22. Cuerpo denso presumiblemente lisosoma secundario, con membrana limitante trilaminar. Contiene un material granular fino, homogéneo, de moderada densidad electrónica y un material granular grueso, de alta densidad electrónica. Asociados a la hoja externa de su membrana limitante se observan gránulos de glucógeno y un material granular fino. La hoja interna se halla separada del contenido por un espacio claro. Magnificación: 96.000X.

nuclear interna y con proyecciones cortas y ramificadas hacia el nucleoplasma. En este último se observaron además masas pequeñas y dispersas de cromatina. Los nucléolos, generalmente hipertróficos, muestran buen desarrollo del nucleolonema, el cual tiende a adoptar aspecto de panal de abejas (Fig. 29). Se observó muy escasa cromatina asociada al nucléolo. La densidad del nucleoplasma es variable, estando en algunos hepatocitos disminuída mientras que en otros está aumentada (Fig. 14), en comparación con el aspecto que muestra en el hepatocito normal fijado con glutaraldehído. Los nucléolos pueden ser centrales o periféricos; en este último caso se observan adheridos a la membrana nuclear. Se observó además, la presencia de vacuolas nucleares translúcidas (Fig. 14) de tamaño variable.

Actualmente investigamos la presencia de glucógeno intranuclear, el cual fue observado en el estudio con el microscopio óptico; dicha investigación será objeto de una futura comunicación.



Fig. 23. Segmento de citoplasma necrotizado que muestra un glucogenosoma (Gs) rodeado por una banda de material granular fino. En su vecindad se observan restos de retículo endoplasmático rugoso (RE), figuras mielínicas (FM) y un cuerpo denso (CD) con características similares al descrito en la figura 22. En la parte superior de la figura se observa citoplasma degenerado mezclado con gránulos de glucógeno. Magnificación: 36.600X.

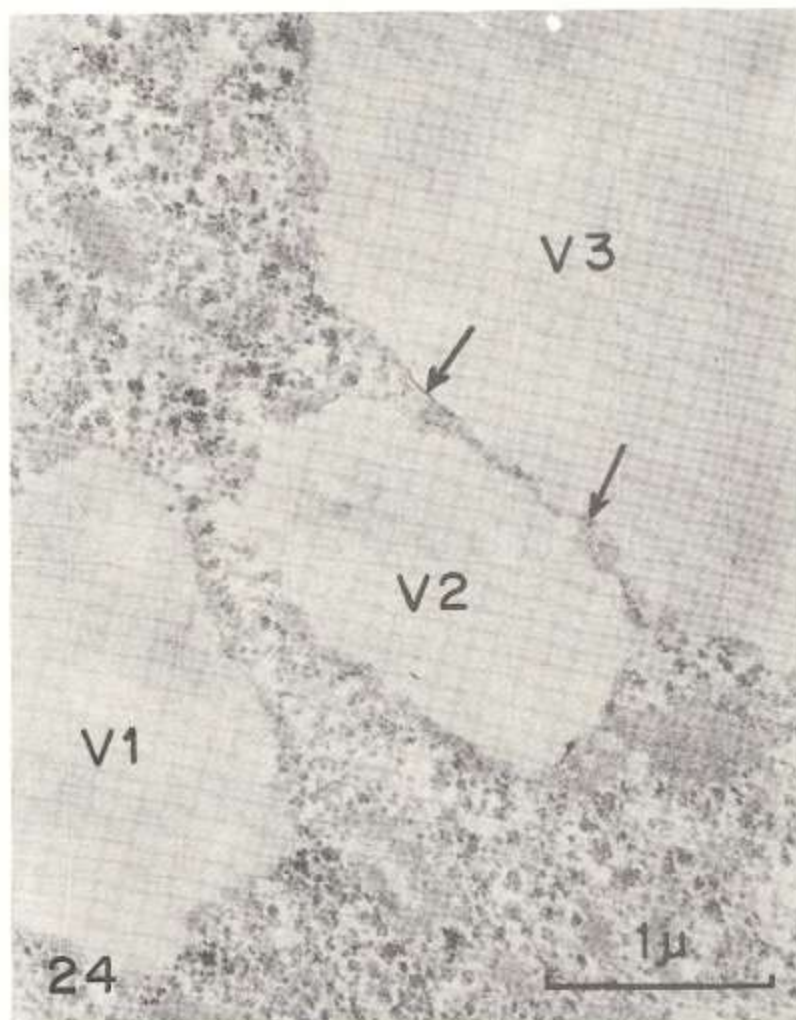


Fig. 24. Vacuolas citoplasmáticas (V1,V2,V3) separadas por delgados tabiques y en algunas zonas (flechas) por su membrana limitante. El tejido vecino muestra acúmulos de glucógeno mono y multigranular. Magnificación: 30.000X.



Fig. 25. En el citoplasma de este hepatocito se observa gran abundancia de gránulos de glucógeno separados por espacios claros y por una substancia homogénea grisácea. Magnificación: 39.000X.

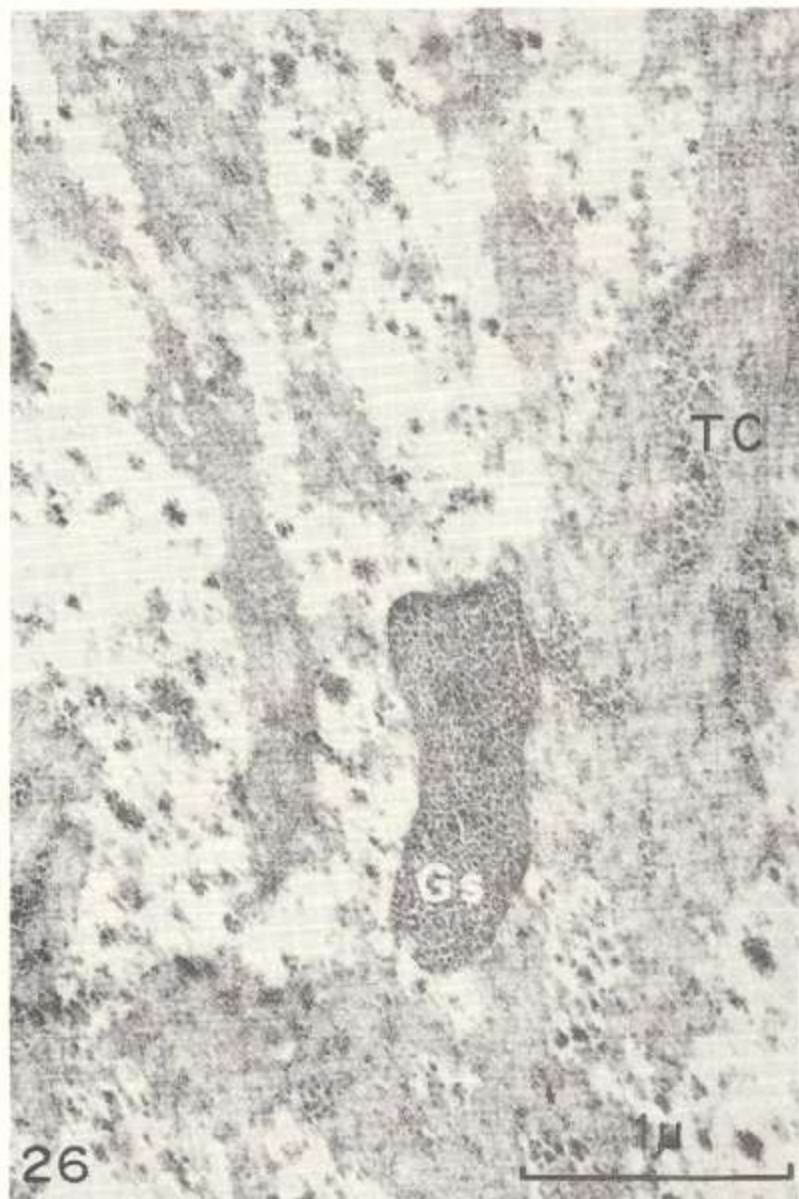


Fig. 26. Glucogenosoma (Gs) alargado, rodeado por haces de tejido conectivo (TC) y gránulos de glucógeno. Magnificación: 36.000X.



Fig. 27. Alta magnificación del glucogenosoma mostrado en la figura anterior. Se observa la membrana trilaminar limitante (flechas) y acúmulos compactados de glucógeno mono y multigranular, los cuales se hallan separados por espacios claros. Magnificación: 108.000X.

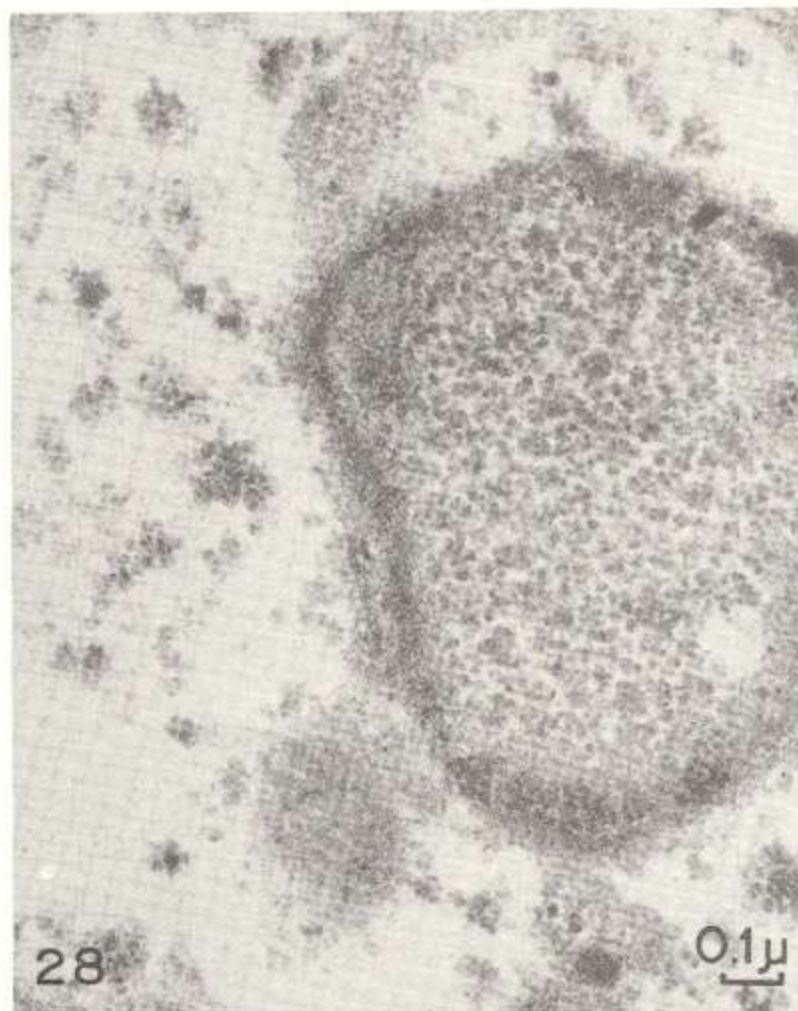


Fig. 28. Glucogenosoma mostrando una cubierta capsular formada por un material fino, el cual enmascara su membrana limitante. En su interior se observa glucógeno mono y multigranular y espacios vacuolares. Magnificación: 84.000X.

DISCUSION

Hemos realizado un análisis histoquímico y ultraestructural de una muestra de tejido hepático afectado de glucogenosis tipo I. De los resultados de tal estudio deducimos que las modificaciones citoplasmáticas sufridas por el hepatocito van desde el acúmulo masivo de glucógeno y la

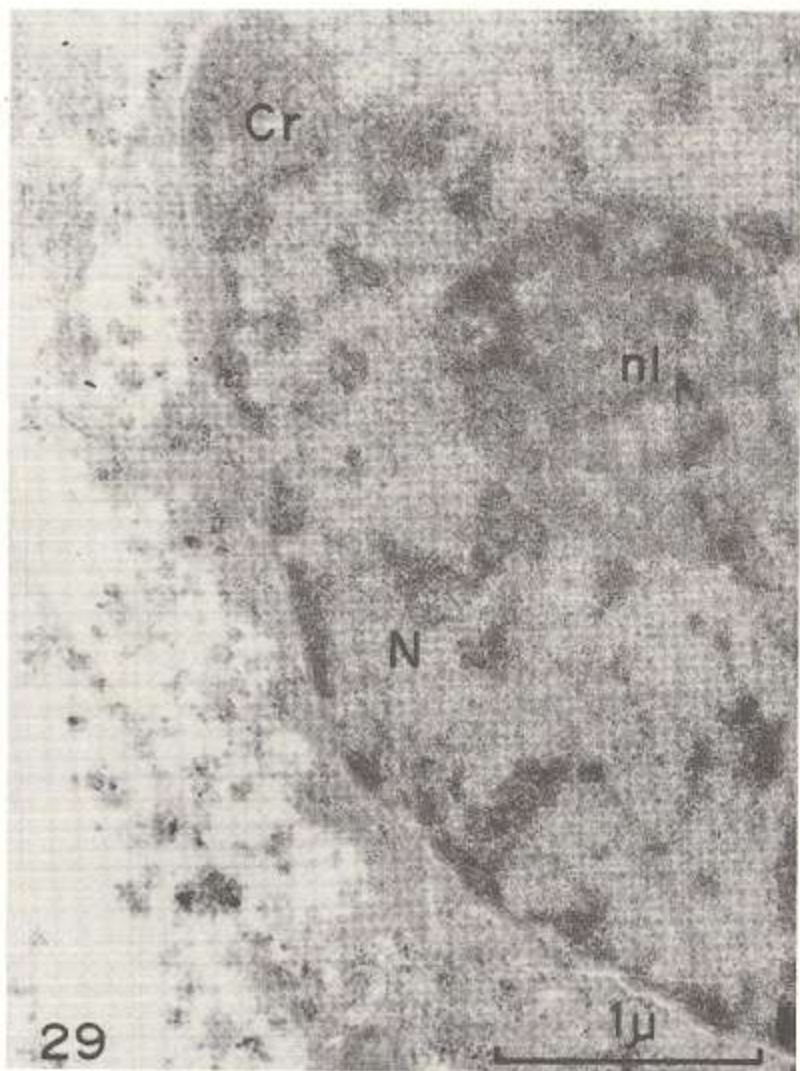


Fig. 29. Núcleo del hepatocito (N) con su respectivo nucléolo (nl). Las bandas anastomóticas del nucleolonema aparecen bien desarrolladas tendiendo a adoptar la configuración de panal de abejas. Las vacuolas nucleololares que se observan entre las bandas del nucleolonema contienen material granular fino. La cromatina (Cr) muestra una distribución similar a la observada en el hepatocito normal. Se observan restos de citoplasma adosados a la membrana nuclear externa y áreas de necrosis. Magnificación: 36.000X.

aparición de fenómenos regresivos hasta la completa lisis celular con presencia del contenido citoplasmático, especialmente glucógeno, en los espacios intersticiales.

Modificaciones del retículo endoplasmático. En primer lugar hemos observado el depósito excesivo de glucógeno asociado a la disminución e hinchamiento del retículo endoplasmático rugoso. Este hallazgo, previamente descrito por otros autores en este tipo de glucogenosis (20, 25), nos induce a pensar en la existencia de una estrecha relación entre el trastorno del metabolismo del glucógeno por un lado y la escasez del retículo endoplasmático por el otro. Millonig y Porter(17), estudiando el hígado de animales normales sujetos a ayuno y sucesivamente realimentados, observaron que el retículo endoplasmático era abundante en los animales en ayunas, mientras que en los animales realimentados, a medida que el glucógeno iba apareciendo en la célula hepática, el retículo endoplasmático iba disminuyendo; este experimento permite deducir cierta relación del retículo endoplasmático con el metabolismo del glucógeno. En nuestros análisis hemos observado también una desaparición casi completa del retículo endoplasmático liso.

Modificaciones lisosomales. En el presente trabajo hemos descrito tres variedades de cuerpos densos, algunos con características muy similares a los lisosomas. Nos llamó la atención el hecho de que algunos de ellos contenían restos de membranas y gránulos de glucógeno. Según la clasificación de De Duve(6) tales cuerpos deben corresponder a citolisomas o vacuolas autofágicas. Estas vacuolas no han sido consideradas patológicas, ya que normalmente dentro de los lisosomas se efectúa la autólisis de áreas circunscritas de la célula sin que aparezcan daños similares en el resto del citoplasma. Por tal motivo es frecuente encontrar, dentro de los lisosomas secundarios, remanentes de los constituyentes citoplasmáticos, pudiéndose observar en el hepatocito normal, lisosomas con características similares a los cuerpos densos reportados por nosotros en el presente estudio. La presencia de citolisomas que contienen exclusivamente glucógeno es un hallazgo realmente poco frecuente en el estudio del hepatocito normal. Estas bolsas llenas de glucógeno han sido denominadas glucogenosomas por Phillips y colaboradores(21, 22), quienes las observaron en hígado de rata recién nacida. Tales cuerpos fueron descritos por primera vez por Baudhuin y colaboradores en 1964(1), en el hígado de un paciente afectado de glucogenosis tipo II, interpretándolos como lisosomas anormales. La localización de fosfatasa ácida en estos cuerpos(22) deja poca duda de su origen lisosomal. Posteriormente Hug y colaboradores(13), reportaron la misma observación en los hepatocitos de otro paciente afectado de glucogenosis tipo II. Según Hers (10, 11), en este tipo de glucogenosis no es posible la degradación del glucógeno dentro de los lisosomas, debido a pérdida de la actividad de la alfa 1,4, glucosidasa ácida lisosomal. Hug y colaboradores(13), especulando sobre el mecanismo

de producción de tales glucogenosomas en la glucogenosis tipo II, consideran que el glucógeno libremente disperso en todo el citoplasma puede ser degradado normalmente por las enzimas glucogenolíticas, mientras que el glucógeno que ha sido circunscrito dentro de los lisosomas en el curso de una degradación citoplásmica focal, al no poder ser metabolizado por la deficiencia enzimática lisosomal, empieza a acumularse, trayendo como consecuencia la formación de estas grandes bolsas llenas de glucógeno.

Sin embargo, a pesar de que estos glucogenosomas han sido descritos como característicos de la glucogenosis tipo II, también han sido reportados en el hígado en condiciones tales como la descrita por Phillips y colaboradores (22) ya comentada en párrafos anteriores, y la descrita por Dallner y colaboradores(5), quienes haciendo un estudio a nivel del retículo endoplasmático del hígado de rata recién nacida, constataron que la actinomicina D inhibe la producción y actividad de ciertas enzimas, como la glucosa-6-fosfatasa, la NADPH-citocromo c reductasa y la NADPH-NT reductasa; y observaron a la vez, en las microfotografías electrónicas correspondientes, una disminución marcada del retículo endoplasmático, con dilatación de éste y grandes acúmulos de glucógeno de tipo beta en las vacuolas autolíticas. En ese reporte, los autores no hacen hincapié sobre el sistema enzimático responsable de las alteraciones metabólicas de los hidratos de carbono, sino sobre los marcados trastornos enzimáticos y morfológicos ocasionados por los antibióticos, que actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas.

Hemos descrito glucogenosomas en los hepatocitos de nuestro paciente afectado de glucogenosis tipo I. Esta observación no ha sido reportada en ninguno de los estudios efectuados en tal tipo de glucogenosis(1, 20, 25, 26), ni en ningún otro tipo diferente de la glucogenosis tipo II (1, 13). Consideramos, en base a nuestros hallazgos, que la aparición de tales lisosomas anormales en el hepatocito podría ser no sólo consecuencia de la pérdida de actividad de la alfa 1,4-glucosidasa ácida lisosomal, como se ha considerado hasta el presente(1, 13), sino la expresión de un mecanismo supletorio en la degradación del glucógeno, al existir un trastorno deficitario en el ciclo glucogenolítico. Se ha demostrado que la glucosa-6-fosfatasa es sintetizada y localizada a nivel del retículo endoplasmático (5, 8, 28); y se sabe además, que cuando se inhibe la síntesis de proteínas con actinomicina D(28) se nota entre otras manifestaciones, una gran disminución de la actividad de la glucosa-6-fosfatasa con reducción marcada del retículo endoplasmático y aparición de glucogenosomas. Hallazgos similares hemos observado en los hepatocitos de nuestro paciente: déficit de actividad de la glucosa-6-fosfatasa, reducción marcada del retículo endoplasmático, acúmulo de glucógeno mono y multigranular y presencia de glucogenosomas. La coincidencia en los hallazgos nos

permite especular por analogía, que la presencia de glucogenosomas en un caso de glucogenosis diferente al tipo II, está concionada por un factor lisosomal auxiliar del ciclo glucogenolítico, al existir un trastorno deficitario de alguna de las enzimas primordiales de dicho ciclo metabólico; en nuestro caso, el déficit enzimático ha recaído en la glucosa-6-fosfatasa.

Al microscopio óptico se observaron en los hepatocitos, cuerpos globulares de tamaño variable que reaccionaban positivamente a las tinciones para glucógeno y que hemos relacionado con los glucogenosomas observados al microscopio electrónico. Teniendo conocimiento de que en la glucogenosis tipo II se han demostrado, a nivel del músculo estriado voluntario(31), cuerpos globulares con acúmulos de carbohidratos no glucogénicos, practicamos en el tejido hepático de nuestro paciente, una serie de reacciones histoquímicas conducentes a la demostración de otros polisacáridos diferentes del glucógeno, específicamente mucopolisacáridos ácidos. Sin embargo, el contenido de estos cuerpos globulares fue digerido por la amilasa y la diastasa y no dio ninguna positividad a tales reacciones histoquímicas, indicándonos tal resultado que la constitución de estos cuerpos es primordialmente glucogénica.

Glucógeno intranuclear. Hemos observado con relativa frecuencia al microscopio óptico, la presencia de glucógeno en el núcleo de los hepatocitos. Estamos estudiando actualmente al microscopio electrónico sus características y será objeto de un estudio adicional. La aparición de glucógeno intranuclear en la glucogenosis tipo I ha sido reportada previamente por Salomón y col.(25) y por Sheldon y colaboradores(26). Estos últimos mostraron que las partículas de glucógeno intranuclear tienen un diámetro menor que las partículas de glucógeno citoplasmático y que los poros de la membrana nuclear. Por lo consiguiente, consideran que el material nuclear debe estar constituido por un glucógeno poco ramificado o de cadena corta que ha sido secuestrado en el núcleo, ya que teniendo estas moléculas pequeñas un diámetro menor que los poros nucleares, pueden pasar fácilmente a través de ellos; paso que no puede ser efectuado por moléculas de glucógeno más grandes y de cadena ramificada. Estas consideraciones ameritan un mayor estudio que pueda ser relacionado con la presencia o ausencia de las enzimas que actúan en el metabolismo del glucógeno. Es de notar que tanto el glucógeno intranuclear como el de los cuerpos globulares se mostró ligeramente más resistente a la acción degradativa de la amilasa o la diastasa. Esta observación está siendo también objeto de nuevos estudios en nuestro laboratorio.

Fenómenos degenerativos. Aunque se observan con relativa frecuencia en los hepatocitos en el curso de la glucogenosis, no son característicos únicamente de la glucogenosis tipo I. Generalmente son de carácter

esteatósico y se muestran como vacuolas intracitoplasmáticas de tamaño variable. Hemos observado en los hepatocitos estudiados gran cantidad de vacuolas que en ocasiones semejaban ser confluentes. Otra modificación ligada al proceso degenerativo-necrótico, la constituyó la presencia de alteraciones citológicas marcadas producidas por la lisis celular, con degeneración mitocondrial, desaparición del retículo endoplasmático y ruptura de la membrana citoplasmática con liberación de glucógeno al espacio intersticial, y por último, la presencia de fibras de colágeno neoformado, que constituyen la fase final de un proceso lítico producido en el hepatocito a consecuencia del acúmulo excesivo del glucógeno.

El presente estudio histoquímico y ultraestructural ha permitido obtener un conocimiento más detallado de la patología celular hepática y del aspecto y localización del glucógeno en la glucogenosis tipo I de Cori; conocimiento que contribuye a una mejor comprensión sobre el mecanismo de acumulación del glucógeno. Sin embargo, creemos que en este tipo de afección se hace necesario realizar un estudio más exhaustivo sobre los mecanismos enzimáticos del metabolismo glucogénico alterado que conduzca a la solución terapéutica final de este desorden genético.

RESUMEN

Se estudió al microscopio óptico y electrónico el tejido hepático, obtenido por punción biopsia, de un niño con diagnóstico clínico de glucogenosis, forma hepatomegálica, en el cual la actividad de la glucosa-6-fosfatasa, analizada por el método histoquímico de Chiquoine resultó marcadamente deficiente.

El tejido destinado a ser estudiado por métodos histoquímicos al microscopio de luz, se fijó en glutaraldehído o en fijador alcohólico Gendre y se incluyó en parafina. Para el estudio electronmicroscópico se fijó inicialmente en glutaraldehído, luego en tetraóxido de osmio y se incluyó en Epon.

Las reacciones histoquímicas conducentes a la demostración de polisacáridos evidenciaron, en el hepatocito notablemente alterado, gran cantidad de glucógeno acumulado en el citoplasma, en forma libre o en forma de cuerpos globoides. Se observó además glucógeno en algunos núcleos en forma de masas o grumos, rodeados de material nuclear.

El análisis electronmicroscópico de las secciones finas del tejido hepático, coloreado con acetato de uranilo y citrato de plomo, mostró las alteraciones estructurales ya reportadas por otros autores. El glucógeno acumulado se observó dispuesto en dos formas, la usual, de estructura comparable al glucógeno del hepatocito normal, constituido por partículas

alfa y beta, que en cantidades masivas se localizan libremente en el citoplasma del hepatocito; y la forma no usual, los glucogenosomas, constituidos por bolsas o inclusiones de tamaño variable que contienen glucógeno monogranular fuertemente compactado con algunas rosetas de glucógeno alfa. Estos glucogenosomas, interpretados como lisosomas anormales, sólo han sido reportados en el tipo de glucogenosis por deficiencia de la alfa-1, 4-glucosidasa ácida lisosomal. Su presencia en la glucogenosis tipo I por deficiencia de la glucosa-6-fosfatasa nos induce a considerar que ellos no son característicos del déficit de una enzima en particular, como se ha considerado hasta el presente, sino que pueden constituir la forma de expresión de un mecanismo auxiliar supletorio al existir un trastorno deficitario primario en el ciclo glucogenolítico. Se hacen otras consideraciones en relación a las modificaciones citopatológicas observadas.

SUMMARY

Liver tissue obtained by biopsy puncture practiced on a child with clinical diagnosis of glycogenosis, hepatomegalic form, was studied with the optic and electron microscope. In the tissue the activity of glucose-6-phosphatase, analyzed by Chiquoine's histochemical method, resulted markedly deficient.

The tissue destined to be studied by histochemical methods with the light microscope, was fixed in glutaraldehyde or in Gendre alcoholic fluid and embedded in paraffin. For the electron microscope study it was initially fixed in glutaraldehyde, later in osmium tetroxide and embedded in Epon.

The histochemical reactions for the demonstration of polysaccharides, showed in the notably altered hepatocyte, a great amount of glycogen accumulated in the cytoplasm, in free form or in the form of globoid bodies. Besides, glycogen was observed in some nuclei in the form of masses or clusters surrounded by nuclear material.

The electron microscopic analysis of thin sections of the hepatic tissue, stained with uranyl acetate and lead citrate, showed structural alterations already reported by other authors. The accumulated glycogen was observed dispersed in two forms: the usual, of structure comparable to the glycogen of the normal hepatocyte, consisting of alpha and beta particles, which in massive quantities, are localized freely in the cytoplasm of the hepatocyte; and the unusual form, the glycogenosomes, identified as bags or inclusions of variable sizes which contain monogranular glycogen strongly packed with some rosettes of alpha glycogen. These

glycogenosomes, interpreted as abnormal lysosomes, have been reported only in the type of glycogenosis caused by deficiency of lysosomal alpha 1,4-acid glucosidase. Its presence in glycogenosis type I through deficiency of the glucose-6-phosphatase makes us consider that they are not characteristics of the deficit of any particular enzyme, as it has been considered up until now, since they can constitute the form of expression of a suppletory auxiliary mechanism when a primary deficitory disorder exists in the glycogenolytic cycle. Other considerations in relation to the cytopathologic modifications are discussed.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a las Sras. Digna de Bohórquez e Iris de Quiroz, por la asistencia técnica en el análisis histoquímico; a la Sra. Zoila de Mejía, Br. Nelly Montiel y Sr. José Espinoza, por la asistencia técnica en el estudio con el microscopio electrónico; a los Sres. Eduardo Añez y Ante Kravavika Pozar, por la preparación de las fotografías; al Sr. Aurelio Bohórquez, por la realización de los dibujos; a la Srta. Marina Medrano y Sra. Mavlyn de Semprún, por la asistencia secretarial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 - BAUDHUIN, P.; HERS, H. G.; LOEB, H. "An electron microscopic and biochemical study of type II Glycogenosis". *Lab. Invest.* 13: 1139-1152. 1964.
- 2 - CORI, G. T.; CORI, C.F. "Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease". *J. Biol. Chem.* 199: 661-667. 1952.
- 3 - CORI, G. T. "Biochemical aspects of glycogen deposition diseases". *Mod. Problems Paediat.* 3: 344-358. 1957.
- 4 - CHIQUOINE, A. D. "Distribution of glucose-6-phosphatase in liver and kidney of mouse". *J. Histochem. Cytochem.* 1: 429. 1953.
- 5 - DALLNER, G.; SIEKEVITZ, P.; PALADE, G. "Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. II. Synthesis of constitutive microsomal enzymes in developing rat hepatocyte". *J. Cell Biol.* 30: 97-117. 1966.
- 6 - DE DUVE, C. "The lysosome concept". *Ciba. Found. Symp. Lysosomes.* Edited by A.V.S. de Reuck and M. P. Cameron. Little, Brown and Co. Boston. 1963.

- 7 - DROCHMANS, P. "Morphologie du glycogene. Etude au microscope électronique du colorations negatives du glycogene particulaire". *J. Ultrastruct. Res.* 6: 141-163. 1962.
- 8 - ERNSTER, L.; SIEKEVITZ, P.; PALADE, G. E. "Enzymestructure relationship in the endoplasmic reticulum of rat liver. A morphological and biochemical study". *J. Cell Biol.* 15: 541-562. 1962.
- 9 - GURR, E. "Staining animal tissues. Practical and Theoretical". 1st. Edit. Leonard Hill (Books) Limited. 1962.
- 10 - HERS, H. G. "Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease)". *Biochem. J.* 86: 11-16. 1963.
- 11 - HERS, H. G. "Glycogen-storage disease." *Advances in Metabolic Disorders.* 1: 1-44. R. Levine and R. Luft, eds. Academic Press, New York. 1964".
- 12 - HOTCHKISS R. D. "A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations" *Arch. Biochem.* 16: 131-141. 1948.
- 13 - HUG, G.; GARANCIS, J. C.; SCHUBERT, W. K.; KAPLAN, S. "Glycogen-storage disease, Types II, III, VIII and IX. A biochemical and electron microscopic analysis". *Amer. J. Dis. Children.* 111: 457-474. 1966.
- 14 - LEV, R.; SPICER, S. S. "Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH". *J. Histochem. Cytochem.* 12:309. 1964.
- 15 - LUFT, J. H. "Improvements in epoxy resin embedding methods". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414. 1961.
- 16 - MC MANUS, J. F. A.; MOWRY, R. D. "Staining methods, Histologic and Histochemical". Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, New York, 1960.
- 17 - MILLONIG, G.; PORTER, K. R. "Structural elements of rat liver cells involved in glycogen metabolism". *The Proc. Europ. Reg. Conf. on Electron Microscopy.* V. II. Delf. 1960.
- 18 - MOWRY, R. W. "Alcian blue technic for the histochemical study of acidic carbohydrates". *J. Histochem. Cytochem.* 4: 407. 1956.
- 19 - PEARSE, A. G. E. "Histochemistry. Theoretical and Applied". 2nd. Edition. Little, Brown and Company, Boston. 1961.
- 20 - PENNELLI, N.; CAPUZZO, G. M.; NINFO, V. "La patologia ultrastrutturale dell'epatocita nella glicogenosi de tipo I. (M. di von Gierke)". *Riv. Anat. Pat. Oncol.* 30: 391-410. 1966.

- 21 - PHILLIPS, M. J.; UNAKAR, N. J. "Glycogenosomes in neonatal rat liver". *Federation Proc.* 25: 667. 1966.
 - 22 - PHILLIPS, M. J.; UNAKAR, N. J.; DOORNEWAARD, G.; STEINER, J. E. "Glycogen depletion in the newborn rat liver. An electron microscopic and electron histochemical study". *J. Ultrastruct. Res.* 18: 142-165. 1967.
 - 23 - REYNOLDS, E. S. "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy". *J. Cell Biol.* 17: 208-212. 1963.
 - 24 - 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.
 - 25 - SALOMON, J. C.; HABIB, R.; BERNHARD, W. "Etude au microscope électronique de la glycogénose hépatique". *Path. Biol. (Paris)* 9: 1251-1264. 1961.
 - 26 - SHELDON, H.; SILVERBERG, M.; KERNER, I. "On the differing appearance of intranuclear and cytoplasmic glycogen in liver cells in glycogen storage disease". *J. Cell Biol.* 13: 468-473. 1962.
 - 27 - STEEDMAN, H. F. "Alcian Blue 8GS. A new stain for mucin". *Quart. J. Microscop. Sci.* 91: 477-479. 1950.
 - 28 - TICE, L. W.; BARNETT, R. J. "The fine structural localization of glucose-6-phosphatase in rat liver". *J. Histochem. Cytochem.* 10: 754-762. 1962.
 - 29 - WAGNER, B. M.; SHAPIRO, S. H. "Application of alcian blue as a histochemical method". *Lab. Invest.* 6: 472-477. 1957.
 - 30 - WATSON, M. L. "Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475-478. 1958.
 - 31 - WOLFE, H. J.; COHEN, R. B. "Nonglycogen polisaccharide storage in glycogenosis type 2 (Pompe's Disease)". *Arch. Path.* 86: 579-584. 1968.
 - 32 - ZELLWEGER, H.; ILLINGWORTH BROWN, B.; MCCORMICK, W. F.; LUN-BI TU. "A mild form of muscular glycogenosis in two brothers with alpha-1, 4-glucosidase deficiency". *Ann. Paediat.* 205: 413-437. 1965.
-