

Aspectos histoquímicos del amiloide en un caso de amiloidosis secundaria

Dr. Claudio Montero"

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la estructura, constitución y formación del amiloide dista mucho de ser completo. Existen en la bibliografía múltiples trabajos que enfocan el problema desde distintos puntos de vista y una cierta proporción de ellos dedican sus esfuerzos al estudio histoquímico de los depósitos en cuestión, pero los resultados son, casi siempre, contradictorios (2, 8).

Aunque nuestro trabajo, orientado hacia la aplicación de técnicas histoquímicas al amiloide, de un caso de amiloidosis secundaria, repite, sin duda, los pasos realizados por otros autores, hemos aplicado una serie de técnicas combinadas, cuyos resultados pueden tener alguna importancia en la interpretación de ciertos hechos, hasta ahora poco considerados, en los trabajos de este tipo.

Creemos que una detallada consideración de los resultados obtenidos en la aplicación de técnicas histoquímicas a este caso de amiloidosis secundaria, puede ser de alguna utilidad, como aportación al conocimiento histoquímico de la misma.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material procede de una biopsia por punción hepática, efectuada en un enfermo del Hospital General San Felipe, de la Escuela de Medicina, de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras.

La muestra de tejido hepático, obtenida con la técnica usual en estos casos, por los clínicos de la sala correspondiente, fue fijada inmediatamente de extraída, en formalina al 10% (lo que equivale a una concentración de formaldehído puro del 4% aproximadamente), durante 24 horas a temperatura ambiente (25°C) e incluida en parafina (Embedol), por un proceder acelerado que permite efectuar la inclusión el mismo día. Teniendo en cuenta que la muestra suele medir 1 o 2 cm. de largo por 0,1 cm. de diámetro, la fijación y deshidratación, por este proceder rápido, permite una muy buena reproducción de los resultados histológicos e histoquímicos.

De rutina se aplicó la técnica de la hematoxilina de Harris acetificada, durante 30 segundos a un minuto, lavado en agua destilada y virado en agua alcalina, seguida de una contratinción con eosina acuosa, también acetificada, a la que se deja actuar 30 segundos aproximadamente, tras lo cual se deshidrata y monta con resina sintética.

(*) Catedrático visitante de Patología. Facultad de Ciencias Médicas, UNAH.
Tegucigalpa, D. C, Honduras.

El diagnóstico de **amiloidosis**, realizado ya con esta técnica, fue confirmado después con el método del rojo Congo de Benhold, modificado por Puchtler, Sweat y Levine (7) y por la observación de secciones así teñidas, con luz polarizada.

La técnica del ácido **peryódico-Schiff**, (APS), fue aplicada con una oxidación con ácido peryódico al 0,5%, de 8 a 10 minutos de duración, a temperatura ambiente, seguida de la aplicación del reactivo de Schiff, preparado en frío según Lillie (4).

El azul alciano 8GN de la casa Matheson, Coleman y Bell se preparó al 0.59í en ácido acético al 3%, lo que da un PH aproximado de 2,5. Su aplicación, a temperatura ambiente, duró tiempos variables que se indican en cada caso.

La metacromasia se estudió con el método del azul de toluidina al 0.05 % en agua destilada, con un PH aproximado de 5,5, observando primero con montaje en agua destilada y secando después cuidadosamente con papel de filtro y aclarando brevemente con xileno, lo cual, dado el pequeño tamaño de las biopsias, esto se consigue con facilidad.

Se determinó el punto de extinción (punto cromóforo) con azul de toluidina en amortiguador de citrato de Walpole, a diferentes PH. Primero se efectuaron tinciones a distintos pH entre 3 y 5, encontrándose que el punto cromóforo, a-í llamado por nosotros (3), se situaba entre 3.9 y 4,2 v, a continuación, se realizaron tinciones a pH intermedios, entre dichos límites.

Se aplicaron reacciones bloqueadoras de grupos hidroxilos y aldehidos por acetilación, de grupos aminos por nitrosación y de grupos carboxilos por mutilación, todos ellos siguiendo la pauta de Lillie (4).

RESULTADOS

Con la técnica del rojo Congo de Benhold, modificada por Puchtler, Sweat y Levine (7) se obtuvo una nítida reacción positiva, solo del amiloide, quedando sin teñir las áreas de hepatocitos conservados (Fig. 1). Una ulterior comprobación de este diagnóstico se hizo, observando las secciones así teñidas, con luz polarizada con lo que se comprobó el **dicroismo** de las zonas de amiloide. Nuestros actuales resultados coinciden en líneas generales con los **obtenidos** anteriormente en 1967 (10).

Con la reacción del ácido peryódico-Schiff (APS), el amiloide se tiñe de un color rojo magenta pálido (Fig. 2). Si lo comparamos con el obtenido en las áreas de hepatocitos cargados de glicógeno, si consideramos que la mayor intensidad con esta reacción, la da el glicógeno, el cual se tiñe de color rojo magenta intenso y asignamos a esta intensidad, el valor máximo de cuatro cruces, podríamos interpretar la intensidad de la reacción del amiloide, como equivalente a una o dos cruces aproximadamente. El glicógeno se comprobó con digestión con alfa amilasa, lo que negativiza la reacción APS en 2 horas a 37% por supuesto usando los testigos correspondientes.

La aplicación de la técnica del azul alciano al 0,5% en ácido acético al 3%, con un pH aproximado de 2,5, tiñe el amiloide con una intensidad que podemos parangonar con la que da la reacción del APS; pero cuando

combinamos estas dos reacciones en la secuencia ácido peryódico-azul alciano-Schiff (APAAS), obtuvimos una reacción negativa, lo que nos llevó a ensayar las secuencias siguientes: ácido peryódico-Schiff-azul alciano (APSAA), que dio por resultado una reacción azul alciano negativa también, y la secuencia azul alciano-ácido peryódico-Schiff, (AAAPS) en la que el azul alciano es, entonces positiva, particularmente con tiempos prolongados de acción del azul alciano (Fig. 3).

La metacromasia con azul de toluidina en agua destinada con un pH aproximado de 5,5 y observando con montaje en agua, da una coloración violeta o metacromasia de tipo beta (Fig. 4). Efectuado el ensayo para determinar el punto de extinción con el azul de toluidina se encontró que dicho punto se situaba en 4,1 medidos los pH con aparato Beckman.

La acetilación de grupos hidroxilos fue consistentemente negativa hasta en períodos de 24 horas, pero la de grupos aldehidos, obtenidos por oxidación con ácido peryódico de los glicoles 2,3, se consiguió en períodos de 2 horas.

La metilación hizo negativa la coloración ulterior con azul alciano y después de la deaminación, para el bloqueo de los grupos aminos, se aplicó la técnica del azul de toluidina, y se observó la transformación de la metacromasia en ortocromasia.

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Nuestro propósito está limitado, en el presente trabajo, por la escasez de material disponible, el de una biopsia hepática usual, por lo que forzosamente tuvo también que ser limitado el número de técnicas a aplicar y puntos a resolver. Con la técnica del rojo Congo de Benhold, modificada, por Puchtler, Sweat y Levine (7), quedó demostrada la naturaleza amiloidea de los depósitos encontrados en esta biopsia hepática, lo cual fue confirmado, a mayor abundamiento, cuando se comprobó el dicroísmo de dichos depósitos, teñidos por el rojo Congo, cuando se ven al microscopio con luz polarizada, que muestran una birrefringencia de color verdoso característico.

Es evidente que, en nuestro caso, la reacción APS ha sido sistemáticamente débil, si comparamos con la obtenida por el glicógeno de las áreas de hepatocitos conservados. Hay que mencionar aquí, aunque no fuera el propósito de nuestra investigación fundamental, que el material granular APS positivo, contenido en los hepatocitos se demostró que era glicógeno con digestión con alfa-amilasa, de secciones llevadas paralelamente a secciones testigo, tratadas solo con agua, durante el mismo tiempo, a la misma temperatura. Este resultado de la reacción APS débil no corresponde desde luego con ninguno de los resultados obtenidos cuando dicha reacción se aplica a los mucopolisacáridos, tanto ácidos como neutros, por lo que si ellos existen, ha de ser bien en pequeña cantidad, bien en unión estereoquímica tal con las proteínas, que quedan pocos grupos libres capaces de reaccionar para dar esta reacción APS positiva.

La reacción azul alciano a pH 2,5 es débil, cuando se aplica durante períodos de 30 minutos, y, reacciones prolongadas hasta de 48 horas, no consiguieron dar una intensidad mayor a la reacción, como la que, según

nuestra experiencia, se obtiene con los mucopolisacáridos ácidos. Hay que recordar que esta reacción es indicadora de la presencia de radicales ácidos, los cuales, por lo general, en los sustratos orgánicos suelen ser radicales carboxilos, fosfóricos o sulfatos.

Quando se combinaron las reacciones APS con el azul alciano a pH 2,5, en las secuencias APAAS, APSAA y AAAPS, se obtuvieron los resultados siguientes; en los dos casos en los que el azul alciano sigue después del ácido peryódico o de la reacción APS completa, dicha reacción azul alciano positiva débil se hace negativa o sea que el resultado final es una coloración rojo magenta, más o menos intensa, producida por el APS. Sólo cuando el azul alciano se aplicó primero, en la secuencia AAAPS durante períodos largos de acción del azul alciano, se obtuvo una reacción positiva relativamente más intensa. Se podría pensar en un bloqueo por el ácido peryódico, sin embargo, puesto que, como se ha dicho, el azul alciano reacciona sólo con radicales ácidos y el ácido peryódico actúa principalmente con los glicoles—2,3, para dar grupos aldehidos, no es dado pensar en una acción bloqueadora.

Cabe deducir, pues, que, siendo ya la reacción del azul alciano relativamente débil, queda enmascarada por la reacción APS más enérgica, o sea, que el número de grupos ácidos es menor, en su conjunto que el de hidroxilos o aminoalcoholes que son, en último término, los responsables de la reacción APS positiva.

La presencia de un número relativamente pequeño de radicales ácidos ionizados se ha demostrado por medio de la aplicación de la técnica del punto de extinción (punto cromóforo) con azul de toluidina, amortiguado a distintos pH. Estas experiencias realizadas con medidor de pH Beckman, llevaron a la determinación del punto cromóforo el cual quedó fijado en 4.1. En efecto, este pH, aunque ácido, está por encima del pH de los grupos carboxilos de los mucopolisacáridos y, por supuesto, muy por encima del de los mucopolisacáridos fuertemente sulfatados. Por otra parte, la misma calidad de la beta metacromasia del sustrato es indicadora de una menor acidez de las estructuras tisulares.

La fijación con formaldehído se haría, según Baker, (1) principalmente con los grupos aminos de las proteínas, por lo que los grupos hidroxilos, teóricamente, quedarían libres para reaccionar y concretamente los glicoles-2,3, cuya oxidación tiene lugar en la reacción del APS. La débil reacción APS positiva del amiloide parecería, pues, indicar que hay pocos hidroxilos capaces de reaccionar y la débil reacción del azul alciano a pH 2,5, significaría que, a ese pH hay pocos carboxilos reactivos, capaces de unirse con el colorante. La reacción del rojo Congo, por otra parte, aunque indudablemente positiva—no es una coloración que podríamos llamar particularmente intensa y, como se sabe por los estudios de Puchtler, Sweat y Levine (7) se debe a enlaces de hidrógeno entre los grupos aminos del colorante y los hidroxilos del amiloide, por lo que aquí hay evidentemente un paralelismo entre las intensidades moderadas de los tipos reaccionales APS y rojo Congo. Finalmente la determinación del punto cromóforo para el azul de toluidina, con un valor alrededor del pH 4,1, nos confirma la relativamente escasa cantidad de grupos amónicos ionizados en el sustrato, consistente con los anteriores resultados con el azul alciano.

Nosotros (3) preferimos llamar punto cromóforo al punto de extinción o pretendido punto isoeléctrico, el cual como afirma Lison, no es en realidad el punto isoeléctrico de las proteínas del sustrato.

Ya confeccionado el presente trabajo leemos en la revista francesa *Annales d'Histochemie*, un trabajo de Vilter, publicado en 1968 (9), en el que se expone una nueva concepción del mecanismo de la metilación, cuando se hace actual el reactivo metanol/HCl, con negativización posterior de la reacción azul alciano; se trataría, por el contrario, de una lactonización, con lo cual se abren nuevos horizontes para la interpretación del carácter aniónico de los sustratos. Desgraciadamente el limitado material de una biopsia nos impide ensayar las experiencias oportunas que confirmaran estas ideas nuevas.

COMENTARIOS

Con las técnicas empleadas en nuestro caso no es posible pretender llegar a conclusiones definitivas, sin **embargo**, no hemos encontrado, en la literatura revisada, que se haya determinado el pH del punto cromóforo, lo cual es importante ya que del valor del mismo se pueden extraer algunas consecuencias y prever el comportamiento tintorial del amiloide en nuestro caso. Los dos trabajos real y exclusivamente histoquímicos realizados sobre el amiloide, los de Braunstein y Bürger (2) y el de Thompson y cols, (8), llegan a conclusiones algo dispares usando, en cada caso, una batería de técnicas. En efecto, mientras Braunstein y Bürger concluyen que su estudio parece ofrecer pruebas concluyentes de que el amiloide estudiado, correspondiente a una serie de casos diferentes de amiloidosis, contiene mucopolisacáridos ácidos no sulfatados y una glicoproteína, en el trabajo de Thompson y cols. (8) concluyen los autores, que un componente constante y significativo del amiloide son ciertos aminoácidos y polipéptidos, no especificados, que contienen uniones disulfuros, independientemente del tejido o de la especie estudiada.

El pH del punto cromóforo hallado en nuestro caso, igual a 4,1, quiere decir que a ese pH no hay ya casi ningún grupo aniónico ionizado para unirse a los grupos catiónicos reactivos del azul de toluidina.

Es bien sabido que cuando se hace preceder la deaminación a la tinción con los colorantes tiazínicos, los sustratos que son gamma metacromáticos, ven aumentada su metacromasia en gran intensidad, debido a que desaparece la competencia estereoquímica que ejercen los radicales aminos frente a los **carboxilos** o sulfatos. En nuestro caso, sin embargo, la deaminación transformó la beta metacromasia con azul de toluidina en débil ortocromasia, lo que interpretamos en el sentido de que en este caso no hay una tal competencia aunque no está claro cual sea el proceso exacto que tiene lugar para transformar la beta metacromasia en ortocromasia.

Sólo he encontrado en la descripción que hace Pearse (6) del amiloide en su texto de histoquímica, una cita de los autores Carnes y Forker, quienes refieren que el enlace no metacromático en el azul de toluidina era abolido a pH 4,5. No está claro que entienden dichos autores por "enlace no metacromático" pero el pH 4,5, donde se hace negativa la

tinción con azul de toluidina está cerca del valor determinado por mi, a pesar de la diferencia en 0,4 unidades.

Pensamos que sólo un estudio tan detallado como sea posible del caso, que se nos pueda presentar, de amiloidosis, con los medios a nuestro alcance, puede llevarnos **algún** día, quizás, a un conocimiento más exacto de la constitución y estructura del amiloide.

RESUMEN

Se presenta un caso de amiloidosis hepática, diagnosticado en biopsia por punción en un enfermo con tuberculosis pulmonar, en el que se han aplicado una serie de técnicas histoquímicas, en un intento de dilucidar el carácter químico del amiloide. Se han aplicado las reacciones del APS, azul alciano a diferentes pH, determinación del punto cromóforo (punto de extinción) con azul de toluidina, rojo Congo, birrefringencia y varios tratamientos enzimáticos y bloqueantes de grupos ácidos e hidroxilos.

SUMMARY

A case of secondary amyloidosis of the liver, diagnosed by needle biopsy, in a tuberculous man, is presented. The author has applied a battery of histochemical reactions to serial sections in an attempt **to** elucidate the chemical features of this amyloid, among them: PAS, alcian blue, extinction point **with** toluidine blue, Congo red, and birrefringence and various enzymatic and blocking reactions **for** acid, amines, and hydroxyl groups.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.—BAKER, J. R.: Principles of biological microtechnique. Methuen & Co. Ltd. London, 1963, 2^a impresión.
- 2.—BRAUNSTEIN, H. y BURGER, L.: A study of the histochemical and staining characteristic of amyloid, *Ara. J. Path.* 35: 791, 1959.
- 3.—GUTIÉRREZ, M. y MONTERO, C: Chromophobic point: A new denomination for the so ealled isoelectric point in histochemistry. *Anales del Desarrollo.* 12: 63, 1964.
- 4.—LILLIE, R. L.: Histopathologic technic and practica histochemistry. Me Graw Hill Book, Co. The Blakiston Div. New York, 1965, 3^a edición.
- 5.—LISON, L. *Histochimie et cytochimie animales.* Gauthier-Villars Editores, París, 1960, 3^a edición.
- 6.—PEARSE, A. G. E.: *Histochemistry, theoretical and applied.* J. & A. Churchill Ltd., London, 1961, reimpresión de la 2 edición inglesa.
- 7.—PUCHTLER, H. SWEAT, F. y LEVINE, M.: On the **bindmg** of Congo red by amyloid, *J. Histochem. Cytochem.* 10: 355, 1962.
- 8.—THOMPSON, S. W., GEIL, R. G. y YAMANAKA, H. S. : A histochemical study of the protein nature of amyloid. *Am. J. Path.* 38: 737, 1961.
- 9.—VILTER, V.: Contribution a letude du mechamisme de la "Méthylation-saponification" dans **l'histochimie** des **mucines** acides. *Ann. Histochim.* 13: 205, 1968.
- 10.—MONTERO, C: Algunos aspectos histoquímicos de la amiloidosis secundaria en un caso de carcinoma tiroideo. *Rev. Cir. H. J. Mex.* Tomo XX, **156**: 65, 1967.

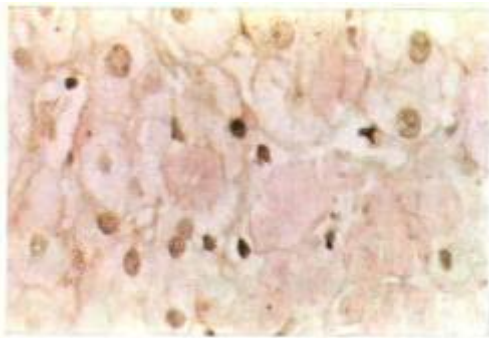


Fig. 1.—Rojo Congo, 500x

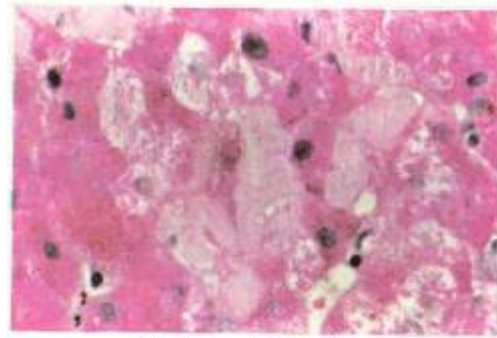


Fig. 2.—APS, 500x

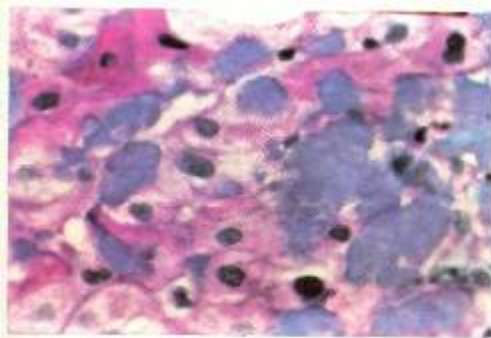


Fig. 3.—AAPAS. 500X

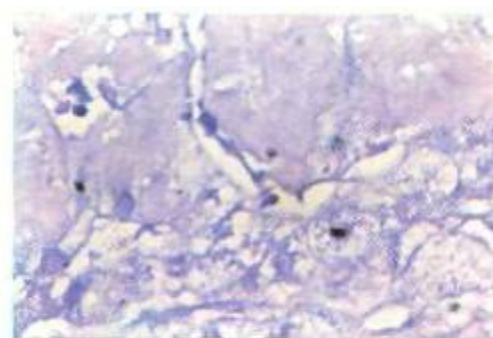


Fig. 4.—AT pH 5,5. 500x