Investigación Clínica. Nº 29: 47-75. 1969.

IDENTIFICACION HISTOQUIMICA DE LOS GLUCOSAMINOGLUCANOS ACIDOS INTRANEURONALES

Tesis doctoral

— **Dra. Haydée Viloria de Castejón.**
Instituto de Investigación Clínica.
Apartado 1151.
Universidad del Zulia.
Maracaibo. Venezuela.

Resultados parciales de este trabajo han sido presentados en los siguientes eventos científicos:

XVI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia. Caracas, 22-28 de Mayo. 1966.

VII Congreso Venezolano de Ciencias Médicas. Caracas, 22-28 de Octubre. 1967.

XVIII Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia. Caracas, 19-25 de Mayo. 1968.

Las abreviaciones utilizadas en el presente trabajo son:

ADN: Acido deoxirribonucleico.

ARN: Acido ribonucleico.

CEC: Concentración electrolítica crítica.

PAS: Coloración del ácido periódico-reactivo de Schiff.

SNC: Sistema nervioso central.

INTRODUCCION

La existencia de los mucopolisacáridos en el sistema nervioso central de los mamíferos fue demostrada inicialmente por análisis histoquímicos[1 2 4 5 7 11 20 49 54]. Han sido, sin embargo, los estudios bioquímicos los que han permitido identificarlos y caracterizarlos como constituyentes del tejido nervioso[5-10 14 26 37 44 45 50].

Hess[20] en 1953, reveló la presencia de un material PAS positivo en la llamada sustancia fundamental del SNC de ratones, y concluyó que este material podría corresponder a un tipo de mucopolisacárido. Sulkin[49] reportó posteriormente, la existencia de un depósito PAS positivo en las neuronas de perros seniles; y lo identificó como un mucopolisacárido neutro o como una mucoproteína. Brante[5, 7] sugirió, que el citoplasma neuronal de los mamíferos debe contener mucoides.

El estudio histoquímico, realizado en forma sistemática para identificar mucopolisacáridos ácidos en el SNC, fue iniciado por Abood y Abul-Haj[1] en 1956, y por Young y Abood[54] en 1960, quienes utilizando la técnica del hierro coloidal preconizada por Rinehart y Abul-Haj, demostraron la presencia de un mucopolisacárido ácido en el axoplasma y neurilema de nervios periféricos de anfibios y mamíferos, y en el citoplasma, axón y dendritas de las neuronas de cerebros de diferentes vertebrados. Este mucopolisacárido ácido, debido a su fácil digestión por la hialuronidasa testicular, fue identificado como ácido hialurónico. Sin embargo, el estudio de Abood y Abul-Haj no es concluyente, si se tiene presente que esta enzima también digiere otros mucopolisacáridos ácidos como el condroitínsulfato A y el condroitínsulfato C. Posteriormente, Bonaretti y Boschi[4] han reportado alteraciones en la cantidad de mucopolisacáridos ácidos (ácido hialurónico) en

los axones de nervios periféricos afectados de degeneración walleriana.

Los análisis bioquímicos de cerebros de diferentes mamíferos realizados por Brante[5-7], Szabo y Roboz-Einstein[50], Meyer y colaboradores, Hoffman, Linker, Grumbach y Sampson[26], Clausen y Rosenkast[8], Clausen y Hansen[9], y Singh y Bachhawat[44, 45], han demostrado la existencia de diferentes fracciones de mucopolisacáridos ácidos: ácido hialurónico, condroitínsulfato A, condroitínsulfato C, heparina, heparánsulfato, dermatánsulfato y otras fracciones sulfatadas no identificadas hasta el presente. Robinson y Green[37], administrando a ratas sulfato marcado con S^{35}, obtienen del cerebro, un extracto con propiedades similares a un sulfomucopolisacárido; y el cual fue localizado por técnicas autorradiográficas en la sustancia gris, especialmente en la capa de células polimorfas y fusiformes del cerebro y en las capas granulosa y de las células de Purkinje del cerebelo.

Teniendo en mente que la información existente hasta el presente, desde el punto de vista histoquímico, sobre los mucopolisacáridos ácidos del SNC, no es concluyente, y habiendo sido reportada, por análisis bioquímicos y por técnicas autorradiográficas, la existencia de varias fracciones de estos compuestos, hemos creído conveniente realizar un estudio histoquímico sistemático en el SNC de los mamíferos con el objeto de precisar la localización regional y celular de los diferentes tipos de mucopolisacáridos ácidos. Los avances recientes alcanzados por la Histoquímica en la localización y caracterización de tales compuestos en los tejidos, utilizando el azul alcián 8GX como colorante básico, preparado en soluciones de diferentes pH[22, 27, 28] y en soluciones con concentraciones crecientes de cloruro de magnesio[42], nos permiten iniciar este estudio; el cual será llevado a cabo en los diversos tipos celulares del SNC de los mamíferos.

Nuestro interés en tales macromoléculas se deriva de su probable participación en funciones primordiales del sistema nervioso, tales como en la conducción del impulso nervioso, en la excitabilidad, en la unión con aminas biogénicas y en el transporte de solutos[1, 4, 10, 16, 44, 45, 50, 54]. Una vez concluido este estudio sistemático podremos, posteriormente, estudiar las modificaciones sufridas por estos compuestos durante la mielogénesis, en procesos desmielinizantes, en infecciones virales como la encefalitis ve-

nezolana, en procesos neoplásicos y en otros síndromes neurológicos. El presente trabajo cumple la primera etapa de este estudio sistemático, al realizar una amplia exploración histoquímica de los mucopolisacáridos ácidos intraneuronales en el SNC del ratón albino suizo y demostrar, en el citoplasma neuronal, el ácido hialurónico, el condroitín-4-sulfato y/o el condroitín-6-sulfato; además de otro compuesto sulfatado, probablemente el dermatánsulfato. Hasta el presente no hemos encontrado en la literatura mundial, ningún estudio histoquímico previo a éste, que demuestre tales compuestos sulfatados en las neuronas.

Los términos mucinas ácidas, mucopolisacáridos ácidos y glucosaminoglucanos ácidos serán utilizados indistintamente como sinónimos.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron trescientos ratones albinos suizos adultos, aparentemente sanos, cuyo peso oscilaba entre 25 y 30 gramos, los cuales fueron anestesiados con inyección intraperitoneal de 0.20 - 0.30 mg. de Nembutal (Pentobarbital sódico de los Laboratorios Abbott) por gramo de peso corporal. A un grupo de 230 animales sacrificados por decapitación, se les extrajo el cerebro rápidamente, el cual fue seccionado sagitalmente en segmentos de 0.3 cm. de grosor. Estos bloques fueron fijados en glutaraldehído al 1% en solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.1M, a pH 7.4 y osmolaridad de 380 mOsm/litro. El tiempo de fijación varió entre 18 y 24 horas. Los restantes 70 ratones fueron fijados mediante la técnica de perfusión vascular preconizada por Palay y colaboradores[29] y modificada por nosotros para adaptarla al ratón albino suizo. El líquido de perfusión utilizado fue similar a la solución de glutaraldehído empleada en la fijación por inmersión del otro grupo de ratones. Una vez completada la perfusión, se aisló cuidadosamente el sistema nervioso central, se seccionó longitudinalmente en bloques de 0.3 cm. de grosor, los cuales continuaron fijándose en fijador fresco frío por 12 horas. Los procesos que siguieron a la fijación del material fueron idénticos para todos los cerebros, fijados por inmersión o por perfusión. Los bloques, después de ser lavados toda la noche en solución amortiguadora fría de fosfato de sodio 0.1M a pH 7.4, fueron deshi-

dratados en etanol a concentraciones crecientes de 50%, 70%, 95% y absoluto; luego se les hizo infiltración con xilol y se incluyeron en parafina o en Tissuemat Fisher. Las secciones, de 6 a 8 micras de grosor, fueron desparafinadas, hidratadas y sujetas a las siguientes reacciones histoquímicas.

1.— **Coloración de azul alcián en solución a pH 2.5.** En esta técnica, original de Steedman[47] y modificada por Mowry[27], el azul alcián 8GX (National Aniline) es empleado al 0.1% en solución de ácido acético al 3%; obteniéndose un pH de 2.5. Las secciones son teñidas por treinta minutos a temperatura ambiente, lavadas en agua destilada y coloreadas luego con Kernechtrot (rojo nuclear rápido de G.T. Gurr) al 1% por 2 ó 3 minutos. Este último se utilizó como colorante nuclear.

2.— **Coloración de azul alcián en solución a pH 1.0.** Esta técnica, selectiva para la demostración de sulfomucopolisacáridos, utiliza el colorante a una concentración de 0.1% en solución de ácido clorhídrico 0.1N, pH 1.0, según la técnica de Lev y Spicer[22]. Las secciones son coloreadas por 30 minutos, secadas con papel de filtro y luego recoloreadas con Kernechtrot.

3.— **Tinción diferencial de glucosaminoglucanos ácidos.** Esta técnica, basada en el principio de la "concentración electrolítica crítica" y preconizada por Scott y Dorling[42] en 1965, consiste en la preparación de una serie de vasos de Columbia que contienen azul alcián al 0.05% en solución amortiguadora de acetato de sodio, pH 5.8; y además, cloruro de magnesio en concentraciones tales que permiten obtener una molaridad diferente en cada vaso de coloración; esta molaridad, creciente, va desde 0.1M hasta 1.4M. En cada uno de los vasos de Columbia se coloca un juego de secciones, que son coloreadas por 2 horas a temperatura ambiente; luego son lavadas en agua destilada y coloreadas de nuevo con Kernechtrot.

4.— **Efecto de algunas enzimas sobre las características tintoriales de las células nerviosas.** Para evaluar la susceptibilidad de la alcianofilia a la digestión con hialuronidasa, las secciones de tejido fueron sometidas por 2 a 20 horas, a la acción de la hialuronidasa testicular (Nutritional Biochem.) a una concentración de 0.05% con una actividad de 300 U.S.P. U/mg, preparada en solución amortiguadora 0.1M de fosfato de sodio, pH 5.5, de acuerdo a la técnica de Leppi y Stoward[21]. Las secciones de con-

trol fueron incubadas, durante el mismo lapso de tiempo, en la solución amortiguadora sin enzima. Estas secciones, junto con las previamente tratadas con la enzima, fueron coloreadas con todas las tinciones de azul alcián mencionadas anteriormente.

Para practicar digestión proteolítica a las secciones, se utilizó pepsina (Sigma, cristalizada dos veces) a una concentración de 2 mg/ml en una solución 0.02N de acetato de sodio-ácido clorhídrico, a pH 2.5. El tiempo de digestión fue de 30 minutos a 37°C. Estas secciones digeridas, junto con las secciones de control, tratadas en la solución amortiguadora, sin enzima, fueron coloreadas con azul alcián a pH 2.5.

Con el objeto de discriminar si la alcianofilia presente en el citoplasma neuronal es debida a los glucosaminoglucanos ácidos, al ácido ribonucleico, o a ambos, se trataron un grupo de secciones con ribonucleasa tipo II-A (Sigma) a la concentración de 0.04 mg/ml en agua destilada en vidrio, por 2 horas a 37°C. Las secciones digeridas y las de control, fueron coloreadas con verde de metilo-pironina Y, según la técnica de Kurnick[30] para ARN y ADN, y por azul alcián a pH 2.5.

Para evaluar el grado de contaminación por ribonucleasa que pueda tener la hialuronidasa testicular, un lote de secciones tratadas previamente por hialuronidasa y un lote control, fueron coloreadas por el verde de metilo-pironina Y.

Se estudió mediante el microscopio óptico, el sistema nervioso central en sus áreas anatómicas básicas.

RESULTADOS

Azul alcián a pH 2.5.

Con esta coloración una gran mayoría de neuronas mostraron citoplasma de color azul cielo (Fig. 1). Las neuronas piramidales grandes y algunas células de Purkinje se tiñeron más intensamente que el resto de las neuronas. A mayor aumento, se observó que el material alcianofílico se disponía como una masa homogénea difusa o en grumos, que ocupaba todo el citoplasma; en algunas neuronas este material era aún visible en sus prolongaciones. Generalmente el núcleo mostró poca o ninguna reac-

ción positiva. Como el Kernechtrot fue usado como colorante nuclear, los núcleos aparecieron celestes claros o de color rosado. Las neuronas estrelladas y fusiformes de la corteza cerebral mostraron en su citoplasma una alcianofilia moderada, los núcleos claros o ligeramente rosados y los nucléolos teñidos de un rosado más intenso. Algunas neuronas piramidales, estrelladas o de Purkinje, situadas inmediatamente adyacentes a las neuronas francamente alcianofílicas, presentaron un citoplasma con diferentes tonos de color púrpura claro, producto de la mezcla del color azul cielo del azul alcián con el rosado o rojo del Kernechtrot (Fig. 2), mientras que otras neuronas se colorearon totalmente de rosado o rojo por haber perdido completamente su afinidad por el azul alcián. La presencia de estas neuronas negativas fue confirmada en todas las secciones estudiadas, tanto en los cerebros fijados por inmersión como en los fijados por perfusión. Se observó también que el número de neuronas negativas variaba considerablemente de una región a otra y de una sección a otra. Por lo consiguiente, no se obtuvo un patrón característico en la cantidad y la distribución de estas neuronas negativas.

Azul alcián a pH 1.0.

Las secciones sometidas a esta coloración mostraron, en el citoplasma de las neuronas, un material de color azul cielo claro, de intensidad menor a la observada en las neuronas coloreadas con azul alcián a pH 2.5 (Fig. 3). En algunas células nerviosas la coloración del citoplasma varió desde un celeste claro a varios tonos tenues de púrpura. El núcleo y los nucléolos se tiñeron de rosado claro. Se observó además, que el número de neuronas azul alcián negativas había aumentado considerablemente, particularmente en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Otras neuronas distribuidas en el mesencéfalo, metencéfalo y bulbo, mostraron el citoplasma con poca o ninguna reacción; sin embargo, se les observó una fina banda alcianofílica dispuesta en la región periférica del citoplasma, inmediatamente adyacente a la membrana celular.

Efecto del cloruro de magnesio sobre la alcianofilia del citoplasma neuronal.

Al colorear las secciones con una solución de azul alcián a pH 5.8, sin la adición de cloruro de magnesio, se observó cierta

irregularidad en la afinidad tintorial; algunas secciones fueron totalmente azules, mientras que otras mostraban una tinción en manchas. Al agregar Cl_2Mg a la solución colorante hasta obtener una concentración 0.1M, la tinción se limitó a las células del tejido nervioso. Las neuronas mostraron un citoplasma azul intenso (Fig. 4). Algunas de ellas, especialmente las piramidales, mostraban además estructuras fibrilares muy teñidas, y sus prolongaciones eran claramente visualizadas; el núcleo era de color azul muy claro o violeta claro y los nucléolos violeta, ligeramente azulados. Algunas neuronas corticales mostraron citoplasma y nucléolos celestes pálidos y núcleo claro; mientras que en otras neuronas la alcianofilia era de menor intensidad. No se observó en ninguna zona neuronas azul alcián negativas.

A la concentración 0.2M de cloruro de magnesio, las neuronas mostraron una muy suave disminución de la basofilia. La mayoría de éstas presentaban el citoplasma azul cielo, el núcleo claro o ligeramente azulado y el nucléolo rosado (Fig. 5); mientras que una minoría, habiendo perdido completamente su alcianofilia, aparecían con citoplasma rosado. Se observaron también células que mostraban tonos intermedios de celeste-rosado, más o menos claros. Sin embargo, la gran mayoría de las neuronas presentaba características alcianofílicas. Coloreando las secciones en una solución de azul alcián que contiene 0.3 - 0.4M de cloruro de magnesio, se observó una reducción moderada de la alcianofilia (Fig. 6). Las neuronas mostraron en su citoplasma un depósito no granular, azul purpúreo o violeta claro. Este depósito fue observado también en las prolongaciones de algunas células. Los núcleos fueron rosado claro y los nucléolos rosado intenso. El número de neuronas negativas aumentó considerablemente en la corteza cerebral, hipocampo y cerebelo. Cuando las secciones fueron sumergidas en una solución del colorante que contenía 0.5 - 0.6M de cloruro de magnesio, la basofilia se redujo drásticamente en todo el tejido nervioso; a excepción de algunas neuronas piramidales del mesencéfalo, metencéfalo y bulbo, las cuales mostraban un fino anillo azul cielo muy claro en la zona adyacente a la membrana celular, mientras que el resto del citoplasma y el núcleo permanecían negativos. A la concentración 0.7M - 0.8M, la interacción azul alcián-substrato fue totalmente abolida, apareciendo todas las neuronas coloreadas solamente por el Kernechtrot (Fig. 7).

Efecto de algunas enzimas sobre las características tintoriales del citoplasma neuronal.

La aplicación de hialuronidasa testicular sobre el tejido por 4 horas, a 37°, produjo en la mayoría de las neuronas, la casi completa remoción de la basofilia debida al azul alcián a pH 2.5 y a pH 1.0 (Fig. 8 y 9); con excepción de algunas neuronas piramidales de los núcleos mesencefálicos, protuberancia, núcleos cerebelares y bulbo, que mostraban un suave pero definido anillo azul en el área periférica del citoplasma, dando la impresión de estar localizado inmediatamente por debajo de la membrana celular o pertenecer a ella. Sin embargo, debido al bajo poder de resolución del microscopio de luz, esta última observación no pudo ser confirmada. Es interesante enfatizar que este fino anillo azul claro no desapareció a pesar de incubar el tejido en hialuronidasa testicular hasta por 20 horas (Fig. 10). Las secciones digeridas previamente por la hialuronidasa y coloreadas por azul alcián en soluciones que contenían 0.1M de cloruro de magnesio, mostraron una franca disminución de la alcianofilia presente en el citoplasma neuronal (Fig. 11); aunque, aparentemente, la basofilia nuclear y nucleolar aumentó ligeramente. En ningún caso se observó anulación de la basofilia. Las secciones previamente digeridas por hialuronidasa testicular y coloreadas con azul alcián que contenía 0.2M de cloruro de magnesio mostraron una moderada reducción de la alcianofilia citoplasmática, exhibiendo las neuronas un material azul muy claro (Fig. 12). En la concentración 0.3M - 0.4M de cloruro de magnesio, las secciones tratadas por hialuronidasa mostraron una casi total supresión de la alcianofilia citoplasmática (Fig. 13); con excepción de algunas neuronas piramidales del mesencéfalo, metencéfalo y bulbo que exhibían todavía un suave color azul en la zona inmediatamente adyacente a la membrana celular. Este cromatismo fue observado aún en las secciones digeridas y coloreadas por azul alcián en la concentración 0.5M - 0.6M de la sal de magnesio.

El tratamiento con pepsina modificó muy débilmente las características tintoriales de las neuronas, ya que en las secciones previamente digeridas y coloreadas con azul alcián a pH 2.5, las neuronas alcianofílicas no intensificaron su color azul; por

el contrario, algunas disminuyeron su intensidad, y las neuronas negativas permanecieron sin teñirse (Fig. 14).

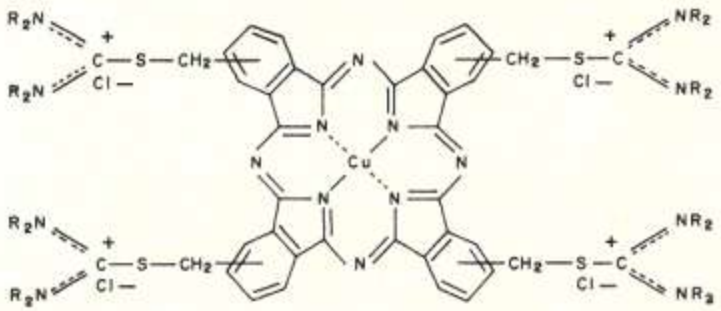
Las secciones, sometidas a ribonucleasa por 2 horas y coloreadas posteriormente con verde de metilo-pironina Y, no mostraron ningún componente coloreable por la pironina Y, ni en el citoplasma neuronal ni en los nucléolos (Fig. 15); a diferencia de las secciones de control que mostraban un material rojo pironinofílico en el citoplasma y en los nucléolos (Fig. 16). Al practicar la coloración de azul alcián a pH 2.5 a las secciones digeridas por ribonucleasa, se observó solamente una ligera disminución de la alcianofilia citoplasmática (Fig. 17), notándose con mayor intensidad en algunas células piramidales, el anillo azul adyacente a la membrana celular. De otra manera, en las secciones que fueron incubadas previamente por 4 horas en hialuronidasa testicular y luego coloreadas por verde de metilo-pironina Y, no se observó cambio apreciable en la intensidad de la pironinofilia citoplasmática (Fig. 18), en contraposición con los resultados obtenidos en las secciones digeridas por hialuronidasa y coloreadas con azul alcián a pH 2.5, ya mencionados anteriormente. Sin embargo, después de 18 horas de digestión con hialuronidasa testicular el material pironina positivo había desaparecido casi completamenre. La disminución de la tinción se observó también en las secciones de control, que habían permanecido igual tiempo en la solución amortiguadora sin enzima.

DISCUSION

Para interpretar los resultados del presente trabajo es necesario conocer las propiedades químicas del azul alcián y su mecanismo de tinción. El azul alcián es un colorante básico polivalente que fue utilizado por primera vez, en 1948, por Haddock[18], única y exclusivamente como colorante textil. Dos años después, Steedman[47], lo introdujo en el campo histoquímico como colorante selectivo para mucinas. Desde esa fecha se ha suscitado una gran controversia con respecto a la selectividad y al tipo de polianión al cual se une el colorante. Algunos autores como Rizzoli[36], Zugibe[55-57] y Quintarelli[31], demostraron su interacción con los condroitínsulfatos. Sin embargo, otros autores como Spicer[46] y Mowry[28], consideran que el colorante es más

selectivo para polianiones que contienen grupos carboxilo, que para los que contienen sulfato. Experimentalmente se ha demostrado que este colorante reacciona con ambos grupos carboxilados y sulfatados, tanto "in vitro" como en las secciones de tejido[32, 33, 41].

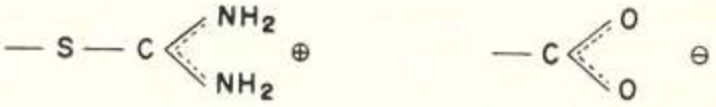
Los estudios realizados por Scott y colaboradores, a partir de 1964, sobre las propiedades químicas e histoquímicas del azul alcián[32, 33, 41-43], han permitido un mejor conocimiento de este colorante básico. De acuerdo con tales autores, el azul alcián es la forma soluble de una ftalocianina de cobre, sustancia químicamente inerte y extremadamente insoluble que posee las propiedades deseables de un pigmento. Cada anillo de ftalocianina tiene de dos a cuatro grupos isotiouronium que, no formando parte del cromóforo, sirven para transportar el pigmento (el núcleo de ftalocianina de cobre) al sitio donde sea requerido (por ejemplo, una fibra textil), cuando el colorante es preparado en solución acuosa y a una concentración suficiente. Estos grupos solubilizantes, muy importantes en la reacción histoquímica, son removidos por calor y álcali suave, quedando la ftalocianina depositada en la fibra, en forma finamente dispersa, extremadamente insoluble y difícilmente removible; de allí su aplicación en la industria textil[18].



ESTRUCTURA DEL AZUL ALCIAN

Los diferentes tipos de azul alcián se caracterizan por ser los únicos colorantes que poseen hasta cuatro grupos cargados positivamente por moléculas, los isotiouronium. Estos grupos son bases moderadamente fuertes, con un pK en la región de 9-10 y constituyen sistemas resonantes del tipo amidínico, en el cual

las cargas positivas son repartidas entre los nitrógenos y un átomo de carbono; comportándose como análogos positivos de los grupos carboxilados que son negativos.



Este colorante, por sus características tan peculiares, es atraído fuertemente por un campo electrostático negativo, el cual puede ser generado en los tejidos por polianiones, tales como el ácido hialurónico, la heparina, los condroitínsulfatos, el ADN y las glicoproteínas ácidas. En esta interacción colorante-polianión, la atracción culómbica entre cargas opuestas, forma uniones parecidas a las del tipo salino. Se cree que esta forma de unión es la única y la más frecuente en la mayoría de las reacciones histoquímicas del azul alcián.

Si la formación del complejo colorante-polianión es influida por fuerzas electrostáticas, el número de cationes del colorante que se unen al polianión dependerá del pH de la solución y del número de grupos aniónicos disociados[32, 33, 41]. Por consiguiente, un tejido será más fuertemente coloreado cuando el colorante sea usado a un pH en el cual los grupos aniónicos del sustrato estén ionizados y libres para reaccionar. Los compuestos glucurónicos carboxilados, tipo ácido hialurónico, tienen un pK de aproximadamente 3.1 - 3.3[24], por lo cual son atraídos intensamente por el azul alcián a pH 2.5. Cuando el colorante es disuelto en una solución de pH más bajo, por ejemplo, pH 1.0, los grupos aniónicos del polianión carboxilado no están completamente disociados y por lo tanto no formarán complejos con el colorante; mientras que sí lo formarán los compuestos sulfatados, que estarán a tal pH, casi totalmente disociados[32, 33]. Por consiguiente, la reacción positiva de un polianión, cuando se colorea con azul alcián a pH 1 a 2, es debida prácticamente a los grupos sulfato[52].

En nuestros experimentos, la tinción de azul alcián a pH 2.5 mostró una notable reacción positiva en el citoplasma de la mayoría de las neuronas. La tinción a pH 1.0 mostró aún positividad franca, pero de menor intensidad, en el citoplasma de un

número menor de neuronas. El hecho de que la intensidad de la basofilia citoplasmática y el número de neuronas alcianofílicas disminuyeran pero no desaparecieran al bajar el pH de la solución de azul alcián, es indicativo de que al menos dos tipos de glucosaminoglucanos ácidos están presentes en las neuronas: un tipo carboxilado, presente en la mayoría de ellas aunque no en todas, y otro tipo sulfatado, observado en un menor número de neuronas.

Profundizando aún más en el mecanismo de tinción del azul alcián, se ha demostrado que la combinación electrostática formada entre el polianión y los cationes orgánicos del colorante se hace reversible en presencia de electrólitos inorgánicos, de acuerdo al siguiente patrón[41]:

$$P^{z-}zM^{+} + zR^{+} \rightleftarrows P^{z-}zR^{+} + zM^{+}$$

P^{z-} es un polímero P con z cargas negativas.
M^{+} es un catión inorgánico, por ej. Na^{+}, K^{+}, Ca^{++}, Mg^{++}.
R^{+} es un catión precipitante, por ej. azul alcián.

Aplicando la ley de acción de masas:

$$\frac{[P^{z-}zR^{+}]\quad[M^{+}]z}{[P^{z-}zM^{+}]\quad[R^{+}]z} = K$$

K es la constarte de equilibrio.
$[M^{+}]$ es la concentración de M^{+}.
$[R^{+}]$ es la concentración de R^{+}.

$\frac{[P^{z-}zR^{+}]}{[P^{z-}zM^{+}]}$ es la relación entre el producto coloreado insoluble y el reactivo incoloro soluble formado por el polímero y el catión inorgánico presente en la solución; a esta relación la llamaremos D o grado de tinción. La reacción envuelve un intercambio iónico, y en la ausencia de otros factores no electrostáticos, el valor de la constante de equilibrio K es determinado por la afinidad de M^{+} y R^{+} por los grupos ionizados del polianión. Si se hacen M^{+} y R^{-} constantes y se permite variar solamente la

naturaleza de los grupos ionizados de P^{z-}, cada sitio aniónico tendrá un valor de K. Los grupos aniónicos comúnmente presentes en los tejidos de mamíferos son $-COO^-$, $-OSO_3^-$ y $-PO_4^=$. Teniendo concentraciones conocidas de M^+ y R^+, por ej., de Mg^{++} y de azul alcián, la constante de equilibrio variará con cada polianión. Si en una gráfica, el grado de tinción (D) es trazado en contra de la relación $[R^+]/[M^+]$, a varios valores de z, se consigue que cuando z es mayor de 5, hay una ruptura brusca de la curva. La posición de la ruptura de la curva sobre el eje $[R^+]/[M^+]$ es determinada por el valor de K. Si a $[R^+]$ le damos un valor constante, K puede ser expresado en términos de $[M^+]$. Como la ruptura es bien definida cuando z es un número grande, en una concentración crítica, K será expresado como "concentración electrolítica crítica (CEC)". Cada tipo de sitio aniónico, teniendo un valor de K, también tiene asociada una CEC. En estas consideraciones se fundamenta el mecanismo de reacción de la coloración diferencial de Scott y Dorling[42], la cual, basándose en que se requiere diferente concentración de electrólitos (Cl_2Mg) para solubilizar selectivamente el complejo polianión-azul alcián, permite una identificación adecuada de los diferentes glucosaminoglucanos ácidos en los tejidos, tales como el ácido hialurónico, los condroitínsulfatos, la heparina, el keratánsulfato, el dermatánsulfato, el heparánsulfato y otros.

Para que K pueda ser expresada en términos de concentración de M^+, la concentración de R^+ (del colorante) debe ser constante en el proceso de coloración y de un experimento a otro. De allí que en la técnica de Scott y Dorling, la concentración de azul alcián, en todos los vasos de coloración es constante. Los valores de K, interpretados como CEC, medida en molaridades de cloruro de magnesio, varía de acuerdo al siguiente patrón: los polianiones que contienen $-COO^-$ tienen los más bajos valores de CEC; los que contienen $-OSO_3^-$ tienen los más altos valores; aquellos que contienen ambos grupos tienen valores intermedios; y los polifosfatos tienen valores de CEC ligeramente mayores que los policarboxilados.

En la técnica de Scott y Dorling[42], la tinción de los polímeros que contienen grupos carboxilados se suprime completamente cuando las secciones de tejido son coloreadas en una solución de azul alcián que contiene 0.2M de cloruro de magnesio. La reacción de-

bida a condroitínsulfatos es abolida, cuando las soluciones del colorante contienen 0.7M-0.8M de Cl_2Mg.[35]; mientras que la reacción debida a heparina lo es en concentraciones mayores, de 1.0-1.2M. En nuestros experimentos, utilizamos dicha técnica con el fin de identificar la naturaleza de los dos tipos de glucosaminoglucanos que habíamos visualizado en el citoplasma de las células nerviosas con azul alcián a pH 2.5 y 1.0. La tinción practicada en concentraciones crecientes de cloruro de magnesio desde 0.1M hasta 1.4M, mostró la supresión de la basofilia citoplasmática en casi todas las neuronas en la concentración de 0.5-0.6M; con total extinción de la tinción a 0.7-0.8M.

Estudiando estos resultados observamos, que la CEC requerida para suprimir la tinción en casi todas las neuronas fue mayor que la exigida para un compuesto policarboxilado o polifosfatado, pero menor que la necesitada para un condroitínsulfato totalmente sulfatado. Quintarelli y Dellovo[35] reportaron hallazgos similares en cartílago hialino humano. Según estos autores, el hecho de que la tinción de un condroitínsulfato, químicamente demostrado en el área pericondrial, se suprimiera usando 0.5-0.6M de cloruro de magnesio en la solución del colorante, indica que el polímero ácido tiene una baja densidad de cargas o un bajo peso molecular; ya que en los modelos experimentales, usando condroitínsulfatos, la CEC para la inversión de la tinción ocurre a 0.7-0.8M[34].

Los resultados obtenidos por nosotros en la tinción de azul alcián a diferentes concentraciones de electrólitos, y los obtenidos con azul alcián a pH 1.0, nos permiten establecer que uno de los polímeros ácidos presentes en el citoplasma neuronal tiene características similares a los condroitínsulfatos y posee un bajo peso molecular o un grado bajo de sulfatación. Esta última consideración está de acuerdo con los hallazgos de Thorp y Dorfman[53], quienes demostraron en tejido cartilaginoso que, a pesar de que el condroitínsulfato intracelular es químicamente idéntico al extracelular, el primero no está completamente sulfatado.

La digestión con hialuronidasa nos permitió hacer diferencias, a nivel del citoplasma neuronal, entre los compuestos carboxilados y sulfatados previamente mencionados. Los únicos glucosaminoglucanos ácidos que pueden ser removidos en las secciones de tejidos tratadas con hialuronidasa testicular, son aquellos que contienen el residuo endo-B-N-acetil-D-glucosamínico[21], tales como el ácido

hialurónico, el condroitín-4-sulfato (o A) y el condroitín-6-sulfato (o C).

Cuando nuestras secciones fueron incubadas previamente en hialuronidasa testicular, observamos una ligera disminución de la basofilia citoplasmática en las neuronas coloreadas por azul alcián en concentraciones 0.1M y 0.2M de cloruro de magnesio; mientras que se observó supresión completa de la alcianofilia en la mayoría de las células nerviosas cuando fueron coloreadas por azul alcián a pH 2.5. Estas observaciones nos demuestran que el polianión carboxilado presente en el citoplasma de una gran mayoría de neuronas es fácilmente digerido por la hialuronidasa testicular, correspondiendo al ácido hialurónico. Nuestros hallazgos confirman los previamente reportados por Young y Abood[54] quienes, aplicando la tinción del hierro coloidal, demostraron ácido hialurónico en el citoplasma de las neuronas del SNC de varias especies de mamíferos.

La desaparición de la alcianofilia citoplasmática de las neuronas, en aquellas secciones previamente digeridas por hialuronidasa testicular y coloreadas por azul alcián a pH 1.0 y en soluciones que contenían 0.3M-0.4M de Cl_2Mg, nos comprueba que el material con características de condroitínsulfato presente en las neuronas, corresponde al condroitín-4-sulfato o al condroitín-6-sulfato, o a ambos, y que éstos poseen un bajo grado de sulfatación.

La persistencia de un material resistente a la hialuronidasa testicular, coloreable por el azul alcián a pH 1.0, pH 2.5 y hasta en la concentración 0.5M-0.6M de cloruro de magnesio, dispuesto como una fina banda en la zona adyacente a la membrana celular de algunas neuronas piramidales, nos permite sospechar la existencia en tales células, de otro glucosaminoglucano ácido; el cual probablemente corresponda a dermatánsulfato. Sin embargo, se requiere un estudio histoquímico más amplio para realizar la identificación exacta de este compuesto.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio nos muestran que el ácido hialurónico, el condroitín-4-sulfato y/o el condroitín-6-sulfato, están presentes en el citoplasma de las neuronas y que otro compuesto sulfatado, probablemente dermatánsulfato, se localiza en la vecindad de la membrana celular de un número menor de neuronas piramidales.

Nuestros hallazgos son totalmente correlacionables con los previamente reportados por Green y Robinson[14] y Robinson y Green[37] quienes, mediante técnicas de fraccionamiento y autorradiografía, aislaron dos sulfomucopolisacáridos en la sustancia gris del cerebro; y con los de Brante[7], Meyer y col.[26], Clausen y Rosenkast[8], Szabo y Roboz-Einstein[50], Clausen y Hansen[9] y Singh y Bachhawat[44, 45], quienes por análisis químico aislaron del SNC de mamíferos varias fracciones de glucosaminoglucanos ácidos; entre otras, ácido hialurónico, dermatánsulfato, condroitín-4-sulfato y condroitín-6-sulfato.

Ha sido establecido desde hace más de una década, que en los tejidos animales, los polisacáridos generalmente están asociados con proteínas[13, 31, 50-52]. Cuando se colorea con azul alcián a pH 2.5, puede ocurrir un enmascaramiento de la alcianofilia por las proteínas asociadas al polisacárido ácido[33, 43, 52]. El bloqueo de la basofilia puede ser tan intenso que produzca resultados negativos a pesar de que el tejido contenga suficiente material basofílico; como ha sido demostrado claramente en cartílago por Szirmai[52] y por Scott y colaboradores[43]. Este tipo de bloqueo podría ser abolido en parte por métodos que reducen o remueven la carga positiva del polímero catiónico (proteína) asociado con el polisacárido, o bien por remoción del polímero catiónico en sí. Los métodos utilizados para reducir las cargas positivas de las proteínas, como son la deaminación con ácido nitroso o la formación de base Schiff entre los grupos amino y los aldehídos, generalmente producen un aumento de la basofilia que no es constante ni concluyente. No se conoce ninguna reacción química que elimine todos los tipos de grupos catiónicos que se encuentren en un tejido y por lo tanto, estas reacciones no pueden ser decisivas para anular el bloqueo de la basofilia. Se pensó entonces en la remoción de las proteínas, por digestión proteolítica[33], como medio de anular tal bloqueo.

En nuestros experimentos, la tinción del azul alcián a pH 2.5 mostró un grupo de neuronas, dispuestas al azar en todo el tejido nervioso, que no tomaban el colorante; y en consecuencia, pensamos en interferencia por proteínas. Cuando se hizo digestión proteolítica con pepsina al tejido nervioso, no observamos modificaciones favorables en la alcianofilia de las células. Las células azul alcián negativas persistieron en su condición, lo cual nos hizo pensar que tales células no tienen glucosaminoglucanos ácidos.

Sin embargo, Scott y colaboradores[43], en un trabajo muy reciente, afirman que el tratamiento proteolítico puede alterar la estructura del tejido y el material basofílico puede ser disuelto y perdido en el líquido de digestión, por lo que este método no podría ser concluyente para afirmar la ausencia de polisacáridos ácidos en tales células. Estos autores consideran, que si las interacciones electrostáticas entre coloides positivos y negativos pueden ser suprimidas cuando se utilizan soluciones salinas, sería posible disociar el complejo basófilo-proteína, utilizando soluciones salinas de una concentración tal que rompan la unión bloqueadora y permitan que el basófilo ya liberado pueda captar el colorante básico. El azul alcián en la tinción de Scott y Dorling, tiñe el material basofílico en concentraciones de sal mucho mayores que las requeridas para disociar el complejo basófilo-proteína y por consiguiente, los resultados obtenidos con esta técnica son concluyentes para la demostración de glucosaminoglucanos ácidos. Nuestros resultados, utilizando la técnica de Scott y Dorling, mostraron neuronas azul alcián negativas desde la concentración 0.2M de Cl_2Mg, donde se observaron en escasa cantidad, aunque el número de ellas fue aumentando a medida que se incrementaba la molaridad de la sal de magnesio. Estos hallazgos nos permiten concluir que no todas las neuronas contienen mucopolisacáridos ácidos. En este respecto, nuestras conclusiones difieren de las de Young y Abood[54], quienes postularon la distribución omnipresente de estos compuestos en el sistema nervioso central.

Teniendo presente que el contenido de ácido ribonucleico del citoplasma neuronal es grande, y que este compuesto es basofílico, quisimos cerciorarnos de si el material alcianofílico, visualizado en tales células cuando son teñidas con azul alcián a pH 2.5, correspondía íntegramente a los glucosaminoglucanos ácidos, al ácido ribonucleico, o a ambos. Con este propósito realizamos las pruebas cruzadas ya previamente descritas, utilizando hialuronidasa y ribonucleasa. Los resultados obtenidos son indicativos de que el material alcianofílico corresponde casi completamente a los mucopolisacáridos ácidos, ya que en las secciones digeridas previamente por ribonucleasa, el material alcianofílico persistía aún cuando el componente pironina-positivo demostrativo de ARN, ya había desaparecido. Por el contrario, en las secciones tratadas con hialuronidasa, el material alcianofílico desapareció; persistiendo aún el material pironinofílico. Estas observaciones propiamente sugieren,

que la tinción de azul alción a pH 2.5 es selectiva para polisacáridos ácidos y no muestra gran apetencia por el ácido ribonucleico. Esta consideración coincide totalmente con la opinión de Mowry[28] quien, en una revisión sobre mucopolisacáridos ácidos afirma, que a diferencia de todos los otros colorantes básicos usados, el azul alción no muestra afinidad por el ácido ribonucleico, componente casi omnipresente en todas las células animales. Además, la observación de que algunas neuronas, a pesar de tener ARN en su citoplasma no muestran alcianofilia, favorece nuestro punto de vista.

Se ha demostrado que la ribonucleasa contamina una gran cantidad de hialuronidasas comerciales[23]. En nuestros experimentos, el hecho de que el material pironinofílico no desapareciera después de un tratamiento por cuatro horas con hialuronidasa testicular, nos permite afirmar que la enzima utilizada por nosotros muestra poca o ninguna contaminación con ribonucleasa. Después de un largo período de incubación se observó, que tanto el material alcianofílico como el pironina-positivo habían desaparecido; sin embargo, este efecto también se observó en las secciones de control que habían sido incubadas en la solución amortiguadora sin enzima. Por consiguiente, creemos que la remoción de ARN en las secciones tratadas con hialuronidasa, no puede ser atribuida a la acción enzimática, pero sí a los electrólitos presentes en la solución tampón. Este último efecto ha sido anteriormente demostrado por Stowell y Zorzoli[48], quienes lo observaron aún en agua destilada a 60°C.

Desde que Brante[7] en 1959, postuló el posible papel de los mucopolisacáridos ácidos en el proceso de mielinización, varios investigadores[3, 17, 25, 50, 54] han tratado de profundizar sobre la función de estos compuestos en el SNC. Las investigaciones de Guha, Northover y Bachhawat[17], Young y Abood[54], Balasubramanian y Bachhawat[3] y Singh y Bachhawat[44, 45] han aportado evidencia de la importancia de estos compuestos en los procesos de mielinización y de maduración del SNC. Green[16], en una revisión sobre aminas biógenas, refiere que los polisacáridos ácidos pueden combinarse con ellas. Robinson y Green[37], en un estudio posterior, reportaron que por centrifugación diferencial de homogeneizados de cerebros, se obtuvo condroitinsulfato en las fracciones sobrenadante y microsomal. En esta última fracción subcelular, Green y Furano[15] han aislado histamina.

Otros investigadores[1, 25, 50] han relacionado los glucosaminoglucanos ácidos con la conducción del impulso nervioso, actuando como resinas de intercambio iónico entre Na^+ y K^+, o por interacción con bases cuaternarias de amonio. Este último hecho ha sido evidenciado por Scott[38-40] desde 1955. Hasson[19] ha demostrado, interacción entre los polisacáridos ácidos y las bases cuaternarias de amonio con acción curarizante o despolarizante. Es presumible que, siendo la acetilcolina una sal cuaternaria de amonio[12], los glucosaminoglucanos ácidos puedan combinarse con ella o funcionar como uno de sus receptores. Aún en el caso de que no constituyan receptores en el sentido estricto de la palabra, ellos podrían competir con el receptor[19], o influir sobre la acción farmacológica de una droga y en la duración y extensión de la acción de una amina biógena[16]. El mucopolisacárido ácido, combinándose con la amina biógena y liberándola lentamente, podría actuar como un reservorio para la amina, y al mismo tiempo evitar su inactivación por enzimas. Además, se ha demostrado que cierta cantidad de polisacáridos ácidos en un tejido, puede limitar la sensibilidad de éste a las aminas; por competencia con el receptor farmacológico de la amina[16]. Creemos necesario profundizar aún más, por estudios fisiológicos, bioquímicos e histoquímicos, en el comprometimiento de los glucosaminoglucanos ácidos en la transmisión y conducción del impulso nervioso.

RESUMEN

Se estudian por procedimientos histoquímicos, los glucosaminoglucanos ácidos citoplasmáticos presentes en las neuronas del SNC de ratones albinos suizos adultos. El SNC es fijado por inmersión o por perfusión vascular con glutaraldehído al 1 % en fosfato de sodio 0.1M, pH 7.4 y osmolaridad de 380 mOsm/litro. Se deshidrata en etanol e incluye en parafina o Tissuemat.

En secciones de 6 a 8 micras se practicaron las coloraciones del azul alcián a pH 2.5, a pH 1.0 y a pH 5.8, con adición de concentraciones crecientes de cloruro de magnesio; además de la coloración del verde de metilo-pironina Y, para la demostración de ácidos nucleicos. Simultáneamente se sometieron secciones a digestión enzimática con hialuronidasa testicular, ribonucleasa y pepsina. La secuencia de estas reacciones permitieron localizar un material sen-

sible a la hialuronidasa testicular y resistente a la ribonucleasa, presente en el citoplasma de una gran mayoría de neuronas, y el cual corresponde por sus características tintoriales al ácido hialurónico, visible en la mayoría de las neuronas, y al condroitín-4 ó 6-sulfato, o ambos, presentes en un menor número de neuronas. Se observó además, en un reducido número de células piramidales, un material resistente a la hialuronidasa testicular, dispuesto en forma de fina banda en la región adyacente a la membrana celular y que por sus características tintoriales parece corresponder al dermatánsulfato. Se hace énfasis sobre el hecho de que los glucosaminoglucanos ácidos no están presentes en todas las células nerviosas.

Se hacen comentarios sobre las bases del mecanismo de tinción del azul alcián. Se discute el posible papel fisiológico de los compuestos demostrados, relacionándolos especialmente con la mielogénesis y con la conducción del impulso nervioso.

SUMMARY

The cytoplasmic acid glycosaminoglycans present in the neurons of the CNS of adult swiss albino mice are studied by means of histochemical procedures. The CNS is fixed by immersion or by vascular perfusion with 1% glutaraldehyde solution in sodium phosphate 0.1M, pH 7.4 and osmolarity as 380 mOsm/litre, dehydrated through graded ethanol and included in paraffin or tissuemat.

In sections of 6 to 8 micra, staining was carried out with alcian blue at pH 2.5, pH 1.0 and at pH 5.8 with the addition of increasing concentrations of magnesium chloride, as well as the staining of methyl green-pyronin Y for the demonstration of nucleic acids.

Simultaneously, sections were subjected to enzymatic digestion with testicular hyaluronidase, ribonuclease and pepsin. The sequence of these reactions permitted the localization of a material sensitive to the testicular hyaluronidase and resistant to the ribonuclease, present in the cytoplasm of a great number of neurons, and which corresponds because of its tinctorial characteris-

tics to the hyaluronic acid, visible in the majority of neurons; and to the chondroitin -4 or 6- sulphate, or both, present in a minor number of neurons. Moreover, a material resistant to the testicular hyaluronidase was observed in a reduced number of pyramidal cells, displayed in the form of a narrow band in the region adjacent to the cell membrane and because of its tinctorial characteristics seems to correspond to the dermatansulphate. Emphasis is placed on the fact that the acid glycosaminoglycans are not present in all nerve cells.

Comments are made upon the basis of the mechanism of staining of the alcian blue. The possible physiologic role of the demonstrated compounds is discussed, especially in relation with the mielogenesis and the conduction of the nervous impulse.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a las Sritas. Digna Peña, Iris Bohórquez y Neila Molero, por su asistencia técnica a los Sres. Ante Kravavika Pozar y Eduardo Añez, por el trabajo fotográfico; al Sr. Aurelio Bohórquez, por la realización de los dibujos; a la Srita. Marina Medrano, por su asistencia secretarial; al Dr. J. T. Núñez Montiel, por permitirnos el uso de su reproductor fotográfico; y al Dr. Orlando J. Castejón, por la lectura crítica del manuscrito.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1 — ABOOD, L. G.; ABUL-HAJ, S. K. "Histochemistry and characterization of hyaluronic acid in axons of peripheral nerve". J. Neurochem. 1: 119-125. 1956.

2 — BAIRATI, A. "Spreading factor and mucopolysaccharides in the central nervous system of vertebrates". Experientia 9: 461-462. 1953.

3 — BALASUBRAMANIAN, A. S.; BACHHAWAT, B. K. "Enzymic transfer of sulphate from 3'-phosphoadenosine-5'- phosphosulphate to mucopolysaccharides in rat brain". J. Neurochem. 11: 877-885. 1964.

4 — BONARETTI, T.; BOSCHI, E. "I mucopolisaccaridi acidi nel assone del nervo periférico. I. Modificazioni della quota mucopolisaccaridica nella degenerazione walleriana". Riv. Pat. Nerv. Ment. 81: 696-704. 1960.

5 — BRANTE, G. "Hexosamine compounds in the nervous system. A preliminary report". Metabolism of the Nervous System. Págs. 112-120. Richter, R. (edit.) Pergamon Press. New York. 1957.

6 — BRANTE, G. "Chemical pathology in gargoylism". Cerebral Lipidosis. Págs. 164-185. Cummings, N. J. (edit.) Blackwell Scientific Publication Oxford. 1957.

7 — BRANTE, G. "Mucopolysaccharides and mucoids of the nervous system". Proc. of the Fourth Int'l Congress of Biochem. Vol. III. Symposium III. Biochem of the Central Nervous System. Págs. 291-300. Bruck, F. (edit.) Pergamon Press. New York. 1959.

8 — CLAUSEN, J.; ROSENKAST, P. "Isolation of acid mucopolysaccharides of human brain". J. Neurochem. 9: 393-398. 1962.

9 — CLAUSEN, J.; HANSEN, A. "Acid mucopolysaccharides of human brain. Identification by means of infra-red analysis". J. Neurochem. 10: 165-168. 1963.

10 — CUSTOD, J. T.; YOUNG, J. I. "Cat brain mucopolysaccharides and their in vivo hyaluronidase digestion". J. Neurochem. 15: 809-813. 1968.

11 — CHOUINARD, L. A. "Histochemical characteristics of the PAS positive inclusions in the Purkinje cell of the cerebellar cortex in the adult cat". Canad. J. Zool. 40: 871-878. 1962.

12 — ELLIOT, K. A. C.; PAGE, I. H.; QUASTEL, J. H. "The physiological significance of acetylcholine". Neurochemistry. Págs. 452-521. 2nd. Edition. Charles Thomas Publisher. Springfield, Illinois. 1962.

13 — FRENCH, J. E.; BENDITT, E. P. "Histochemistry of connective tissue. II. The effect of protein on the selective staining of mucopolysaccharides by basic dyes". J. Histochem. Cytochem. 1: 321-325. 1953.

14 — GREEN, J. P.; ROBINSON, J. D., Jr. "The turnover of S^{35}-sulfate in sulfomucopolysaccharides and cerebron sulfuric acid of rat brain". Fed. Proc. 18: 398. 1959.

15 — GREEN, J. P.; FURANO, A. V. "The pools for amines in neoplastic mast cells". Biochem. Pharmacol. 11: 1049-1056. 1962.

16 — GREEN, J. P. "Binding of some biogenic amines in tissues". Advanc. Pharmacol. 1: 349-422. 1962.

17 — GUHA, A.; NORTHOVER, B. J.; BACHHAWAT, B. K. "Incorporation of radioactive sulphate into condroitinsulphate in the developing brains of rats". J. Sci. Industr. Res. 19C: 287-289. 1960.

18 — HADDOCK, N. H. "Alcian Blue, a new phthalocyanin dyestuff". Research. 1: 685-689. 1948.

19 — HASSON, A. "Interaction of quaternary ammonium bases with a purified acid polysaccharide and other macromolecules from the electric organ of electric eel". Biochim. Biophys. Acta. 56: 275-292. 1962.
20 — HESS, A. "The ground substance of the central nervous system revealed by histochemical staining". J. Comp. Neurol. 98: 69-91. 1953.
21 — LEPPI, T. J.; STOWARD, P. J. "On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucins in tissue section". J. Histochem. Cytochem. 13: 406-407. 1965.
22 — LEV, R.; SPICER, S. S. "Specific staining of sulphate groups with Alcian Blue at low pH". J. Histochem. Cytochem. 12: 309. 1964.
23 — LOVE, R.; LILES, R. H.; ELLEN, K. A. O. "Activity of ribonuclease in preparations of testicular and streptococcal hyaluronidase". J. Histochem. Cytochem. 8: 347-441. 1960.
24 — MATHEWS, M. B. "Macromolecular properties of isomeric chondroitin sulfates". Biochim. Biophys. Acta. 35: 9-17. 1959.
25 — MEYER, K.; RAPPORT, M. M. "Mucopolysaccharides of ground substance of connective tissue". Science. 113: 596-599. 1951.
26 — MEYER, K.; HOFFMAN, P.; LINKER, A.; GRUMBACH, M. M.; SAMPSON, P. "Sulfated mucopolysaccharides of urine and organs in gargolism (Hurler's syndrome). I. Adittional studies". Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 102: 587-590. 1959.
27 — MOWRY, R. W. "Alcian Blue technic for the histochemical study of acidic carbohydrates". J. Histochem. Cytochem. 4: 407. 1956.
28 — MOWRY, R. W. "The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxil groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal Iron stain, the use of Alcian Blue 8GX and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction". Ann. N. Y. Acad. Sci. 106: 402-423. 1963.
29 — PALAY, S. L.; McGEE-RUSSELL, S. M.; GORDON, S.; GRILLO, M. A. "Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide". J. Cell Biol. 12: 385-410. 1962.
30 — PEARSE, A. G. E. "Histochemistry. Theoretical and Applied". Pág. 826. 2nd. edition. Little Brown and Company. Boston. 1961.
31 — QUINTARELLI, G. "Histochemical identification of salivary mucins". Ann. N. Y. Acad. Sci. 106: 339-363. 1963.
32 — QUINTARELLI, G.; SCOTT, J. E.; DELLOVO, M. C. "The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. II. Dye binding of tissue polyanions". Histochemie. 4: 86-98. 1964.
33 — QUINTARELLI, G.; SCOTT, J. E.; DELLOVO, M. C. "The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. III. Chemical blocking and unblocking". Histochemie. 4: 99-112. 1964.

34 — QUINTARELLI, G.; DELLOVO, M. C. "The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. IV. Further studies on the methods for the identification of acid glycosaminoglycans". Histochemie. 5: 196-209. 1965.

35 — QUINTARELLI, G.; DELLOVO, M. C. "Age changes in the localization and distribution of glycosaminoglycans in human hyaline cartilage". Histochemie. 7: 141-167. 1966.

36 — RIZZOLI, C. "Ricerche sulla natura e distribuzione dei mucopolisaccaridi nei tessuti animali". Riv. Istochim. Norm. e Pat. 1: 345-382. 1955.

37 — ROBINSON, J. D.; GREEN, J. P. "Sulfomucopolysaccharides in brain". Yale. J. Biol. Med. 35: 248-254. 1962.

38 — SCOTT, J. E. "The solubility of cetylpyridinium complexes of biological polyanions in solutions of salts". Biochim. Biophys. Acta. 18: 428-429. 1955.

39 — SCOTT, J. E. "The precipitation of polyanions by long chain aliphatic ammonium salts. 5. The influence on precipitation of changes in the amine structure". Biochem. J. 81: 418-424. 1961.

40 — SCOTT, J. E. "The precipitation of polyanions by long chain aliphatic ammonium salts. 6. The afinity of substituted ammonium cations for the anionic groups of some biological polymers". Biochem. J. 84: 270-275. 1962.

41 — SCOTT, J. E.; QUINTARELLI, G.; DELLOVO, M. C. "The chemical and histochemical properties of Alcian Blue. I. The mechanism of Alciar. Blue staining". Histochemie. 4: 73-85. 1964.

42 — SCOTT, J. E.; DORLING, J. "Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian Blue in salt solutions". Histochemie. 5: 221-233. 1965.

43 — SCOTT, J. E.; DORLING, J.; STOCKWELL, R. A. "Reversal of protein blocking of basophilia in salt solutions. Implications in the localization of polyanions using Alcian Blue". J. Histochem. Cytochem. 16: 383-386. 1968.

44 — SINGH, M.; BACHHAWAT, B. K. "The distribution and variation with age of different uronic acid-containing mucopolysaccharides in brain". J. Neurochem. 12: 519-525. 1965.

45 — SINGH, M.; BACHHAWAT, B. K. "Isolation and characterization of glycosaminoglycans in human brain of different age groups". J. Neurochem. 15: 249-258. 1968.

46 — SPICER, S. S. "A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides". J. Histochem. Cytochem. 8: 18-35. 1960.

47 — STEEDMAN, H. F. "Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin". Quart. J. Microscop. Sci. 91: 477-479. 1950.

48 — STOWELL, R. E.; ZORZOLI, A. "The action of ribonuclease on fixed tissues". Stain Techn. 22: 51-61. 1947.

49 — SULKIN, N. M. "The distribution of mucopolysaccharides in the cytoplasm of vertebrate nerve cells". J. Neurochem. 5: 231-235. 1960.

50 — SZABO, M. M.; ROBOZ-EINSTEIN, E. "Acidic polysaccharides in the central nervous system". Arch. Biochem. 98: 406-412. 1962.
51 — SZIRMAI, J. A.; BALAZS, E. A. "Metachromasia and the quantitative determination of dye binding". Acta Histochem. (Jena). Suppl. 1: 56-79. 1958.
52 — SZIRMAI, J. A. "Quantitative approaches in the histochemistry of mucopolysaccharides". J. Histochem. Cytochem. 11: 24-34. 1963.
53 — THORP, F. K.; DORFMAN, A. "The occurrence of intracellular chondroitin sulfate". J. Cell Biol. 18: 13-17. 1963.
54 — YOUNG, I. J.; ABOOD, L. G. "Histological demonstration of hyaluronic acid in the central nervous system". J. Neurochem. 6: 89-94. 1960.
55 — ZUGIBE, F. T. "The demonstration of the individual acid mucopolysaccharides in human aortas, coronary arteries and cerebral arteries. I. The methods". J. Histochem. Cytochem. 10: 441-447. 1962.
56 — ZUGIBE, F. T. "The demonstration of the individual acid mucopolysaccharides in human aortas, coronary arteries and cerebral arteries. II. Identification and significance with aging". J. Histochem. Cytochem. 10: 448-461. 1962.
57 — ZUGIBE, F. T. "Mucopolysaccharides of the arterial wall". J. Histochem. Cytochem. 11: 35-39. 1963.

"El estudio del método científico es, en una palabra, la teoría de la investigación".

Mario Bunge
"La Ciencia. Su método y su Filosofía".

"El método de la ciencia no es, por cierto, seguro; pero es intrínsecamente progresivo porque es autocorrectivo: exige la continua comprobación de los puntos de partida, y requiere que todo resultado sea considerado como fuente de nuevas preguntas".

Mario Bunge
"La Ciencia. Su método y su Filosofía".

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

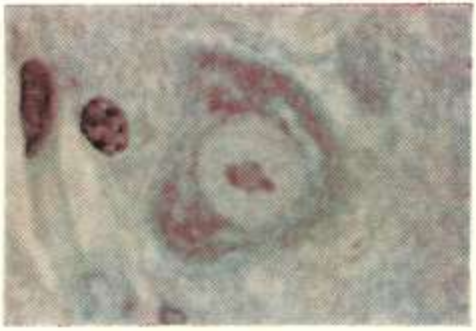


Fig. 4

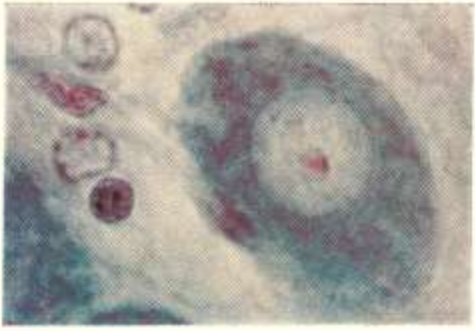


Fig. 5

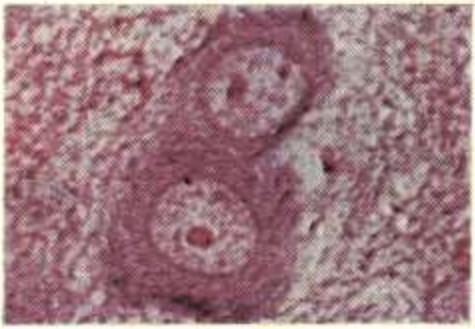


Fig. 6

Fig. 1. Coloración del azul alcián pH 2.5 - Kernechtrot. Fotomicrografía de una sección de la corteza cerebral mostrando un grupo de neuronas con citoplasma alcianofílico, núcleo claro y nucléolos rosados. 403X.

Fig. 2. Azul alcián pH 2.5 - Kernechtrot. Sección de la corteza cerebelosa donde se distinguen dos células de Purkinje alcianofílicas, vecinas a otras dos que muestran muy poca afinidad por el azul alcián. 504X. Ampliación fotográfica 2X.

Fig. 3. Azul alcián pH 1.0 - Kernechtrot. Neurona piramidal del mesencéfalo, mostrando en el citoplasma material alcianofílico, visible aún en sus prolongaciones. 403X. Ampliación fotográfica 1.5X.

Fig. 4. Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.1M - Kernechtrot. Neurona de un núcleo profundo del cerebelo, mostrando intensa basofilia en su citoplasma y en el material cromatínico. 787X.

Fig. 5. Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.2M - Kernechtrot. Neurona del Núcleo Rojo que muestra la afinidad del material citoplasmático por el azul alcián. Obsérvese que el nucléolo ha perdido tal afinidad. 1008X. Ampliación fotográfica 1.2X.

Fig. 6. Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.4M - Kernechtrot. Nótese aún la presencia del material alcianofílico en el citoplasma de dos neuronas mesencefálicas. 1008X.

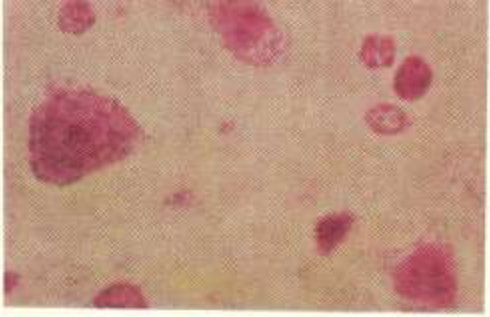


Fig. 7

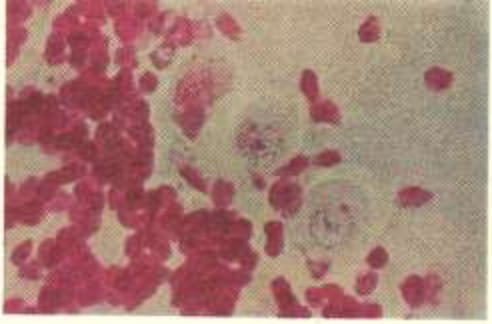


Fig. 8

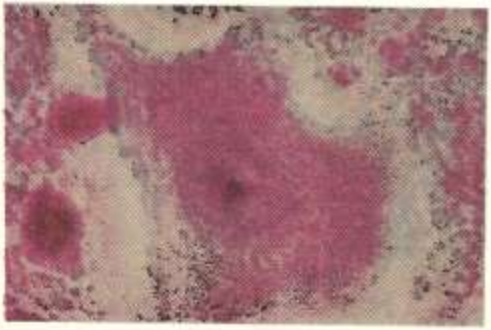


Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

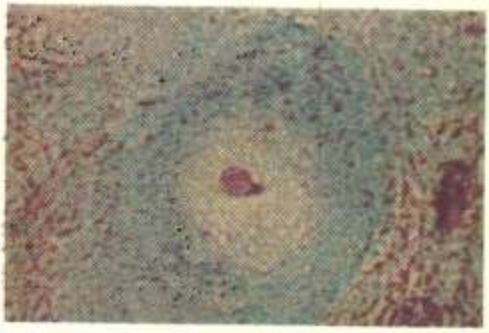


Fig. 12

Fig. 7. Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.7M - Kernechtrot. Neuronas de los núcleos profundos del cerebelo mostrando la supresión completa de la interacción colorante-substrato. 314X. Aumento fotográfico 2X.

Fig. 8. Hialuronidasa-Azul alcián pH 2.5 - Kernechtrot. Dos células de Purkinje mostrando eliminación completa del material alcianofílico después de 4 horas de digestión enzimática. Vecina a éstas se observa una típica célula de Purkinje, azul alcián negativa. 504X. Ampliación fotográfica 1.5X.

Fig. 9. Hialuronidasa-Azul alcián pH 1.0 - Kernechtrot. Neurona piramidal del bulbo raquídeo mostrando la desaparición del material alcianofílico después de ser tratada por 4 horas en hialuronidasa testicular. 1260X.

Fig. 10. Hialuronidasa-Azul alcián pH 2.5 - Kernechtrot. Neuronas de la substancia reticular exhibiendo un material alcianofílico remanente, adyacente a la membrana celular, después de 20 horas de digestión enzimática. 314X. Ampliación fotográfica 2X.

Fig. 11. Hialuronidasa-Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.1M - Kernechtrot. Nótese una ligera disminución de la alcianofilia citoplasmática en dos neuronas del mesencéfalo. Compárese con la alcianofilia observada en la figura 4. 403X. Ampliación fotográfica 2X.

Fig. 12. Hialuronidasa-Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.2M - Kernechtrot. Neurona del Núcleo Rojo mostrando una franca disminución de la alcianofilia citoplasmática. Compárese con la figura 5. 1260X.

Fig. 13

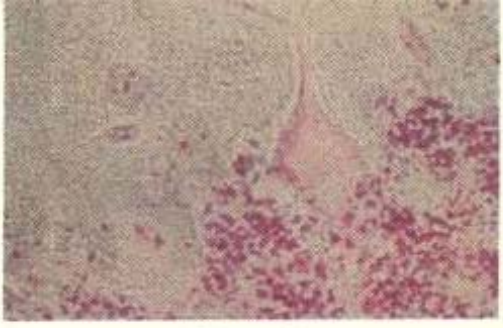


Fig. 14

Fig. 15

Fig. 16

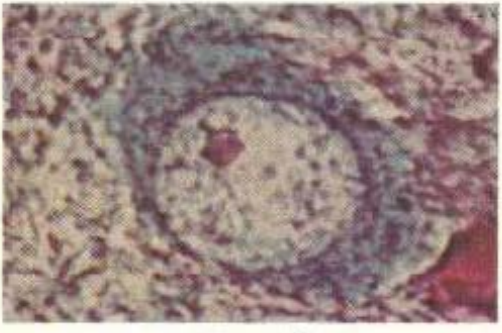


Fig. 17

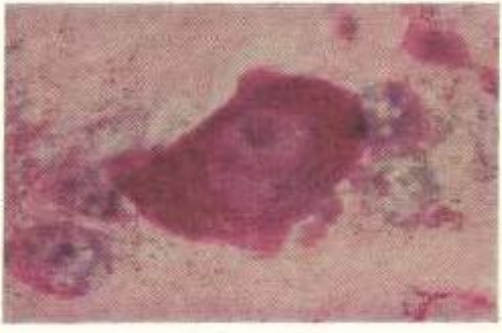


Fig. 18

Fig. 13. Hialuronidasa-Azul alcián pH 5.8, Cl_2Mg 0.4M - Kernechtrot. Neuronas mesencefálicas mostrando completa remoción del material alcianofílico. Compárese con la figura 6. 1260X.

Fig. 14. Pepsina-Azul alcián pH 2.5 - Kernechtrot. Sección de la corteza cerebelosa mostrando dos células de Purkinje, en las cuales no se observó incremento en la afinidad por el Azul alcián después de la digestión proteolítica. 504X.

Fig. 15. Ribonucleasa-verde de metilo-pironina Y. Neurona mesencefálica mostrando remoción completa del material pironinofílico. Compárese con su control (Fig. 16). 1260X.

Fig. 16. Verde de metilo-pironina Y. Material pironinofílico correspondiente al ARN, es francamente visualizado en el citoplasma y en el nucléolo de una neurona del mesencéfalo. 1260X.

Fig. 17. Ribonucleasa-Azul alcián pH 2.5. - Kernechtrot. Nótese la persistencia del material alcianofílico, resistente a la ribonucleasa, en el citoplasma de una neurona mesencefálica. 1260X. Ampliación fotográfica 1.5X.

Fig. 18. Hialuronidasa-verde de metilo-pironina Y. Neurona de un núcleo profundo del cerebelo, en la cual la digestión enzimática, por 4 horas, no modificó las características tintoriales del material pironinofílico. 1008X.