Contribución al estudio del precolágeno

EMILIO LA MATA

Ayudante Técnico del Instituto de Anatomía Normal e Histología de la Facultad de Veterinaria

Trabajo realizado en el laboratorio de Histología de la Facultad de Veterinaria y en el laboratorio de Anatomía Patológica Comparada de la Facultad de Medicina.

Trabajo presentado a la Sociedad de Anatomía Patológica del Uruguay "Sesiones Técnicas". Fac. de Medicina.

I. — CONSIDERACIONES

Es curioso observar cómo en trabajos aún recientes, se emplea la denominación de reticulina y precolágeno en forma indiferente continuando con ello en una verdadera confusión de términos para designar elementos fibrilares que en nuestro concepto son completamente diferentes.

Las técnicas de simple y doble impregnación de Río Hortega para el tejido conjuntivo, permitieron a este ilustre maestro desdoblar dentro del tejido reticular dos tipos de fibras, las de reticulina y las precolágenas. Estos hechos no fueron aceptados en forma universal por los histólogos, aun cuando el método rápido de Río Hortega para macrófagos daba resultados casi definitivos.

Siguiendo aquel concepto, encaminamos el trabajo por el lado de los colorantes de anilina, llegando a componer una técnica que demuestra en forma evidente las propiedades tintoriales distintas de la reticulina y el precolágeno y la necesidad de mantener dentro de la nomenclatura histológica las denominaciones de "reticulina", "precolágeno" y "colágeno".

Con esta técnica recorrimos muchos capítulos de la Histología Normal y Patológica, dedicando mucho tiempo al estudio de la trama fabrilar de los tumores, con resultados siempre seguros.

Tenemos que hacer no obstante una advertencia: seguimos por ahora empleando el nombre de "precolágeno" para no crear un nuevo término, porque este tipo de fibras bien puede corresponder a un estado especial de la materia, transitorio, reversible, a cambios del pH de la sustancia fundamental, tiñéndose entonces, con nuestra técnica, en azul, un estado determinado de esos procesos, una faz de estados reversibles en tre colágeno y "precolágeno".

II. — MATERIAL Y TECNICA

El material empleado ha sido sumamente variado, aplicando la técnica a una gran cantidad de órganos normales y patológicos. La fijación fué hecha empleando en todos los casos el formol comercial al 10 %, en unos casos cortados por congelación y en otros incluídos en parafina. Se emplearon las técnicas de uso corriente, además la simple y doble impregnación de Río Hortega y la que describimos. Los resultados con todas ellas han sido absolutamente concordantes llegando a superponer a la técnica de Río Hortega la nuestra con resultados positivos, tal como lo muestra la fotomicrografía adjunta.

Colorante nuclear.

Solución A	Agua destilada	10 c. c.
	Ziehl	6 gotas
	Formol comercial	1 c. c.
	Acido acético	1 gota

Colorante citoplasmino y fibrilar.

Solución B	Azul de metilo	0 grs. 20
	Acido pícrico a sat.	100 c. c.

TECNICA

1) Desparafinar.
2) Solución "A" 5 minutos.
3) Lavado abundante en agua.
4) Acido oxálico al 2 % 1 minuto, luego lavado en agua
5) Picroazul de metilo (Solución B) de 1 a 2 minutos.
6) Alcohol de 96°, al cohol absoluto, xilol, bálsamo y montaje.

No debe confundirse el azul de metilo (azul de anilina) con el azul de metileno.

Fotomicrografía. — Fibras precolágenas entre las trabéculas hepáticas. — Superposición de carbonato de plata y picro azul de metilo, para identificar al mismo elemento. — La impregnación se realizó en forma ténue, reforzándola notablemente el picro-azul de metilo.

Resultados. — Buenas imágenes en el cartílago, núcleos en rojo, fibras precolágeneas en azul, colágenas en verde amarillento, músculo en amarillo, mucus en rojo violáceo, fibras elásticas en amarillo claro, eritrocitos verde claro.

III. — ESTUDIO DEL ELEMENTO FIBRILAR

Las discrepancias de opiniones sobre la naturaleza de las fibras reticulares, radica en criterios divergentes, sobre el origen del colágeno. En cualquiera de las variedades del tejido conectivo, desde la más sencilla hasta la más complicada, poseen fibras argentófilas más o menos anastomosadas en retículo. Estas fibras aparecen semejantes entre sí con los métodos de impregnación fuerte, seguida de reducción enérgica o precedida por el empleo de mordientes. Las fibras reticulares del bazo fueron teñidas selectivamente por Río Hortega, empleando métodos rápidos de impregnación y reducción débil. Fué este hecho el que sirvió de base a Río Hortega y Jiménez de Azúa, para poner en evidencia dos tipos de fibras reticulares, las que se tiñen con la impregnación fuerte y reducción enérgica, relacionadas al colágeno y que denominaron "precolágeno" y las que se tiñen selectivamente con impregnación rápida y reducción débil, siendo estas últimas llamadas de reticulina.

Estos métodos de simple y doble impregnación, constituyen un elemento valiosísimo de trabajo en el estudio del tejido conectivo, pero quisimos no obstante apartarnos de ellos y seguir por el camino de los colorantes de anilina para corroborar así aquellas ideas con imágenes coloreadas y que corresponden exactamente a la visión dada por los métodos de impregnación argéntica.

Los resultados comparativos, entre preparados histológicos de un mismo órgano, tratados por la doble impregnación y nuestra técnica nos hacen pensar en lo mucho que queda por hacer aún en el terreno de los colorantes sintéticos.

Con el material estudiado nos formamos un concepto terminante en este problema. Por razones que iremos exponiendo, reservamos el nombre de "reticulina" para las formaciones fibrilares de los órganos linfoides, que se impregnan selectivamente con los métodos rápidos de Río Ortega para macrófagos, con reducción débil, pero que no lo hacen con el picro-azul de metilo. Damos a su vez el nombre de precolágeno a las fibras del resto del organismo que toman el carbonato de plata en impregnación fuerte seguida de reducción enérgica, y aparecen en azul con el pricro-azul de metilo.

Existe así una diferencia fundamental entre ambos tipos de fibras, con caracteres propios y hasta opuestos entre sí. La identidad que pudiera aparecer con los métodos argénticos, desaparece ante los colores de anilina y a tal punto que con nuestra técnica la reticulina no se tiñe, haciéndolo en cambio en azul fuerte el precolágeno y en verde amarillento el colágeno.

Es notable la circunstancia de que exista siempre dentro de la terminología científica una palabra que pretende explicar lo que aún no tiene explicación. Uno de los términos más usados con ese fin ha sido

el del "enmascaramiento" de ciertas estructuras, que podrá tener razón de ser en muchos casos, pero no en todos. En los tratados de Histología Normal y Patológica y en numerosas descripciones, se afirma que la reticulina o el precolágeno (que toman como una misma sustancia) no se tiñen con los colores de anilina por el hecho de hallarse enmascarados. Se utilizan entonces técnicas a base de reacciones químicas violentas tales como acción de enzimas, ácidos diluidos, para luego aplicar los colorantes sintéticos y poner en evidencia fibras como las del bazo por ejemplo.

Cremos que estos procederes deben ser desechados de la técnica histológica, cuando se emplean con ese fin. Esas reacciones químicas traen como consecuencia una modificación de las afinidades tintoriales de las estructuras, con desfiguración de sus verdaderas propiedades y casi siempre cambiando la selectividad. Solamente deben aceptarse aquellas técnicas que emplean reacciones químicas en toda la extensión de sus tiempos, sin la intervención posterior de sustancias coloreadas.

Es harto sabido que la coloración o impregnación de sustancias enmascaradas es mucho más difícil de lograr que aquellas que no lo están. En cambio la impregnación de la reticulina del bazo y en general de todos los órganos linfoides, se logra más fácilmente que en las fibras precolágenas del resto del organismo. El método rápido de Río Hortega para macrófagos, pone en evidencia las fibras de reticulina y no las de precolagena. Existe pues una marcada selectividad en la reticulina que pone de manifiesto el error de considerarla como sustancia enmascarada. Tenemos pues que admitir, por fuerza, que estas fibras son puramente argentófilas, y que el precolágeno, a más de argentófilo, con las diferencias señaladas, se tiñe también con los colores de anilina, cosa que no sucede con la reticulina.

En el hígado, en estado normal y mucho más fácilmente en procesos patológicos, hemos teñido siempre con el picroazul de metilo en forma clara, esa red de fibras, tomadas como de reticulina, cuando en realidad se trata de fibras precolágenas.

En el estudio que efectuamos en los órganos linfoides, con nuestro método, nunca pudimos teñir la reticulina, cuando esos órganos se encuentran en estado normal. Lo hemos logrado siempre y en cualquier circunstancia con el precolágeno del resto del organismo.

Si bien es cierto que en el bazo normal no aparecen elementos febrilares con el picroazul de metilo, basta que una alteración se instale para que las cosas cambien fundamentalmente. En ese mismo órgano, pero en una zona de infarto, logramos teñir una abundante red de precolágeno en azul fuerte y fibras colágenas en verde amarillento.

En órganos normales y alterados, forma el precolágeno una abundante red que acompaña muchas veces al colágeno. En ocasiones es posible ver como esas fibras precolágenas aumentan de calibre, toman el

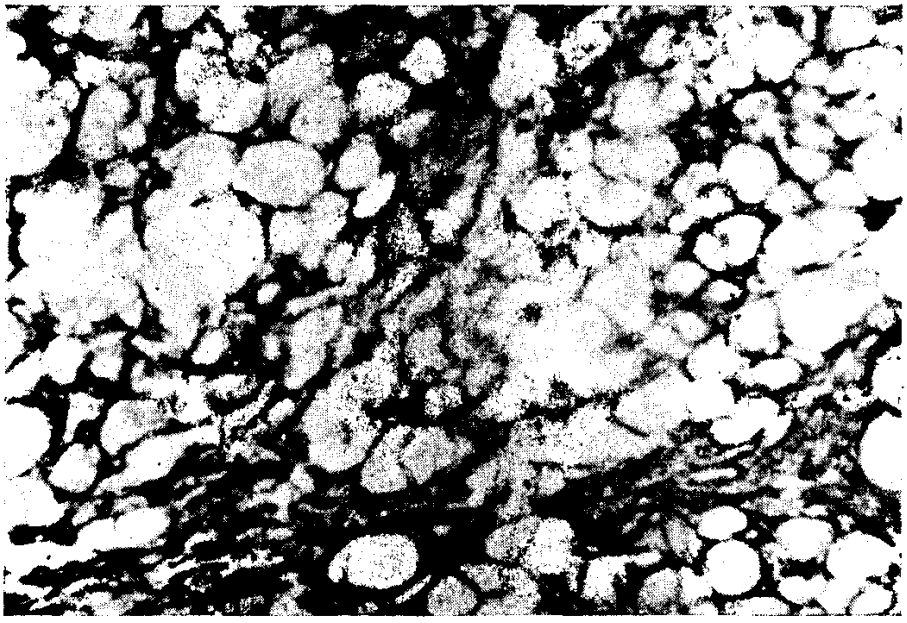
aspecto de estriación longitudinal, por agregado de fibrillas, y experimentan un cambio progresivo de sus afinidades tintoriales, pasando del azul puro, propio del precolágeno, al verde amarillento característico del colágeno.

"El tejido conjuntivo reticular del hígado, el de la mucosa gastro intestinal, el del endometrio y el de las glándulas endocrinas, carecen de reticulina propiamente dicha, y las relaciones entre las fibras reticulares y las células estrelladas, son muy difíciles de apreciar aún en las coloraciones más completas; en estos casos el tejido conjuntivo se presenta,

Fotomicrografía. — Fibras precolágenas en la mucosa gástrica. Obsérvese la diferencia de espesor entre las fibras "A" y la delicada malla formada por delgadas fibras "B". Fuc. Picroazul.

pues,, como una transición entre el reticular genuino de los órganos hematopoyéticos, desprovistos de fibras colágenas y el intersticial laxo del resto del organismo". Este concepto del Profesor Isaac Costero, ha sido plenamente comprobado y demostrado con el método que describimos. En este sentido, creemos más terminante el resultado del picroazul de metilo que el del carbonato de plata.

La relación constante del precolágeno y el colágeno, el cambio de diámetro y de la afinidad tintorial del primero, la selectividad marcada y exclusiva de la reticulina por los métodos rápidos de impregnación, su carácter negativo ante las anilinas, hacen absolutamente necesaria una

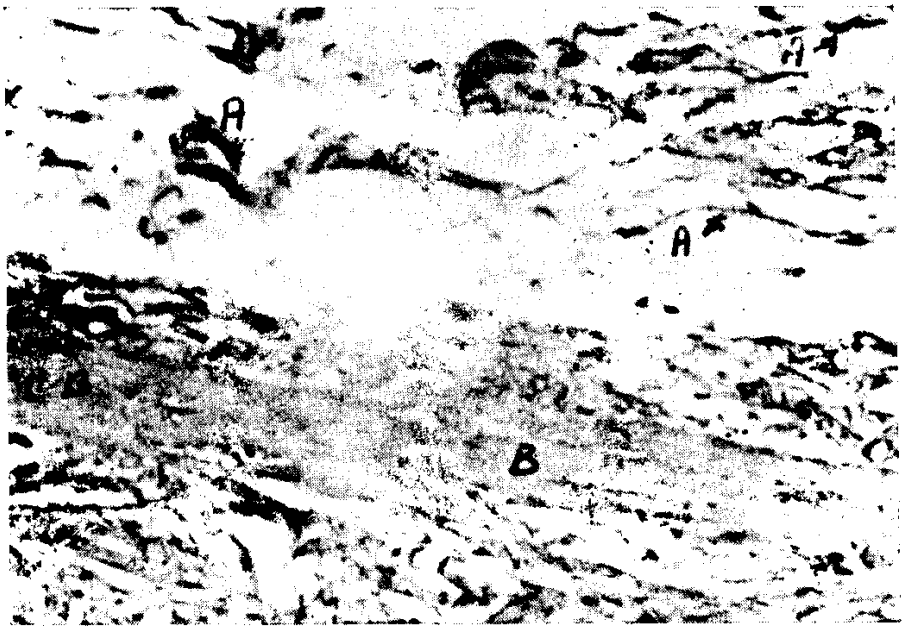


Tejido Adiposo. Red de precolágeno. Picro-azul de metilo. Inclusión en parafina

Fibras precolágenas en torno a un vaso. Picro-azul de metilo.

separación definitiva entre las fibras de reticulina, las precolágenas y el colágeno.

En otro orden de investigaciones, hemos comprobado la sospecha de Costero al decir que la trama reticular del sarcoma estaría formada por precolágeno; logramos teñirlo en forma nítida con nuestra técnica.



Fibras precolágenas "A" y colágenas "B". En el preparado histológico, en verde claro las últimas y en azul las primeras. — Prico-azul de metilo.

IV. — RELACIONES

Cuando en órganos del tipo linfoide, en los que normalmente no existen fibras precolágenas ni colágenas, toma asiento un proceso patológico, formándose gran cantidad de estas últimas, es fatal la presencia simultánea del precolágeno. No sólo esta presencia es simultánea, sino que hemos podido seguir en los distintos preparados microscópicos, la presencia del precolágeno con anterioridad al colágeno. Esto nos lleva creer que la génesis del colágeno tiene una relación íntima con el precolágeno, sobre todo cuando se comprueba, como en nuestro caso, ese cambio de calibre y de afinidad titorial que hacen sospechar una marcha gradual por diferencias de coloración, del precolágeno al colágeno.

V. — RESUMEN

1º — Consideramos a las fibras de reticulina, precolágenas y colágenas, como tipos distintos que es necesario diferenciar.

2º) Atribuímos a los órganos linfoides, la cualidad exclusiva de poseer fibras de reticulina, siendo las del resto del organismo, fibras precolágenas.

3º — Proponemos en lugar de precolágenas, la designación de fibras "azulófilas" por estar de acuerdo más exactamente con las afinidades tintoriales y con las ideas modernas que han surgido del estudio químico de estos elementos fibrilares.

4º — Damos una nueva técnica con colores de anilina, que demuestra estas afirmaciones.

ABSTRACT

1º — The A. considers as different and necessary to distinguish the reticulin, precolagen and colagen fibers.

2º — The A. states that linfoid organs have exclusively reticulin fibers while the rest of the organism has precolagen fibers.

3º — The A. proposes to designate "Azulófilas" fibers the precolagen ones, because of the concordance of this domination with tintorial affinity and the modern conception of chemical study these elements.

4º — The A. describes a new technique with anilin colors, which proves his statement.

V. — RÉSUMÉ

1º — Nous considérons les fibres de la réticuline precolagenas et colágenas comme étant des types distincts qu'il est nécessaire de différentier.

2º — Nous attribuons aux organes lymphoides, la qualité exclusive de posséder des fibres de réticuline, calles du reste de l'organisme étant de fibres precolágenas.

3º — Nous proposons au lieu de precolágenas, la désignation de "azulófilas", parce qu'étant plus exactement d'accord avec les affinités teinturielles et avec les ideés modernes qui ont surgi de l'étude chimique de ces éléments fibrilaires.

4º — Nous donnons une technique nouvelle avec des couleurs d'aniline qui démontre ces affirmations.

Beitrag zur Untersuchung der leimgebenden Substanz

ZUSAMMENFASSUNG

1º — Wir betrachten die Fasern des reticulierten Bindegewebes, die praekollagenen und kollagenen Fasern als besondere Typen, die unterschieden werden muessen.

2º — Wir schreiben den Lymphorganen die ausschliessliche Eigenschaft zu, reticulaere Fasern zu besitzen, waehrend die andern Koerperorgane nur praecollagene Fasern haben.

3º — Wir schlagen vor, diese Fasern anstelle von "praecollagenen" als "Fasern mit Vorliebe fuer Blau" zu bezeichnen, um besser mit den Faerbemetoden den modernen Ideen, die sich aus der chemischen Untersuchung dieser Faserelemente gebildet haben, im Einklang zu sein.

4º — Wir veroeffentlichen eine neue Anilinfaerbetechnik, welche unsere Behauptung beweist.

VI. — DATOS BIBLIOGRAFICOS

Aschoff, L. — Tratado de Anatomía Patológica, Vol. I-II. — 1934.

Celener, D. — El tejido conjuntivo estudiado en bola de edema con el método del carbonato de plata. — Arch. de Hist. Normal y Pat. Vol. I, pág. 131. — 1942.

Costero Isaac. — Tratado de Anatomía Patológica. — Vol. I-II. — 1946.

Dominich, H. — Estudio sobre el tejido conjuntivo y los órganos hematopoyéticos de los mamíferos. — Arch. de Anat. micr. 17 - pág. 811 — 1921.

Douthat, A. y **Pardiñas, R.** — Observaciones acerca de la naturaleza y extensión de los reticulos del timo. — Arch. de Hist. Nor., y Pat. Vol. I, Fasc. IV, pág. 415. — 1943.

Ferrio, C. — El tejido reticular, consideraciones, crítica y observaciones. Monit. Zool, ital, N. 37, pág. 213. — 1926.

Polak, M. — Contribución al estúdio histológico de las amigdalas faringeas y palatina. — Arch. de Hist. N. y Pat. Vol. II, Fasc. I-II, pág. 171. — 1943.

Río Ortega y **Jiménez de Azúa.** — Naturaleza y caracteres de la trama reticular del bazo. — Bol. de la Soc. Esp. de Hist. Natural, Año XXI, pág. 1. — 1921.

Río Ortega, P. - Prado, J. M. y **Polak.** — Sincitio y diferenciaciones citoplásmicas de los meningoexoteliomas. — Arch. de Histl. Norm. y Pat., Vol. II, Fasc. I-II, pág. 126. — 1943.

En cada uno de estos trabajos se encontrará una extensa bibliografía sobre el tema.