

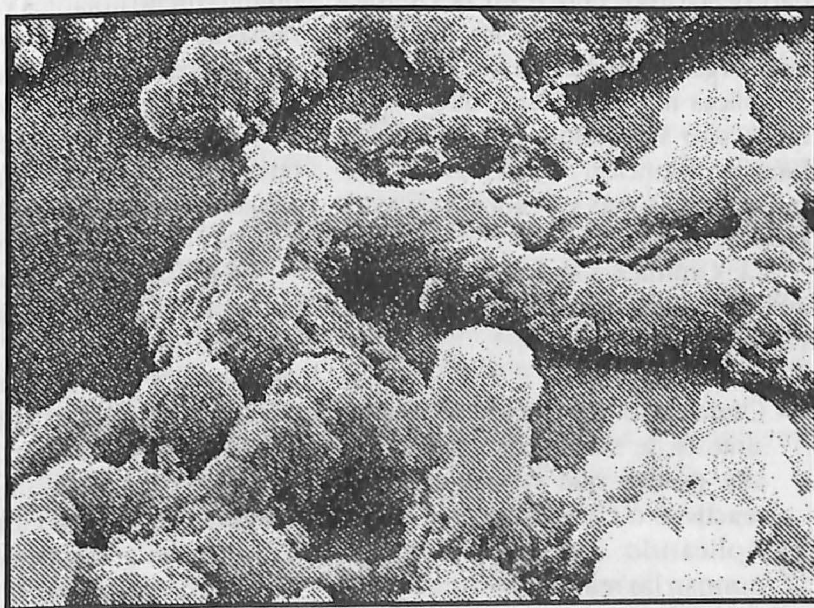


## CONTRIBUCION DE LA QUIMICA ORGANICA AL DESARROLLO DE LA CITOQUIMICA E HISTOQUIMICA

DR. JUAN PAZ CASTILLO B.

*La aplicación de la Química Orgánica a las Ciencias Biológicas ha venido a trocar el carácter puramente descriptivo y observacional de la Histología, sentando las bases para su transformación en una ciencia dinámica y funcional, complementaria y paralela de la Fisiología y de la Bioquímica. A través de la Histoquímica se beneficia así la Histología directamente del extraordinario desarrollo alcanzado por la Bioquímica, sin duda una de las ciencias de más rápido crecimiento en el siglo actual.*

*Reacción  
Histoquímica  
de Fosfatasa  
Alcalina.*



**E**l estudio de la estructura celular y de los tejidos, gracias a los adelantos científicos ha progresado en forma superlativa.

Con la microscopía electrónica se ha llegado al dintel molecular. Las reacciones químicas que tienen lugar en el ámbito celular son susceptibles de ser revelados por la Microquímica, la Histoquímica y la Citoquímica.

Especialmente las dos últimas ciencias nombradas, hacen que la Fisiología y la Bioquímica entren en íntima conexión con las estructuras químicas de células y tejidos.

No se vaya a creer que todo se reduce a la formulación de ecuaciones y al revelado de mecanismos de acción. Algo más se logra con la marcación de sustancias metabolizadas por la célula.

La Citoquímica y la Histoquímica, las dos nuevas ciencias Biológicas que han destacado, tienen en la Química Orgánica una de sus bases. De la síntesis orgánica obtienen las sustancias orgánicas más complejas que requieren como substratos. Así como también la obtención de productos químicos en sus más elevados índices de pureza.

La Química Orgánica resulta un auxiliar indispensable en el trabajo Histoquímico:

- 1.- Ofreciendo los métodos para la síntesis de sustancias químicas de alta pureza que se exigen como reactivos o como sustratos.
- 2.- Aplicando los principios que norman las reacciones químicas or-

gánicas, las que tienen lugar en el seno mismo de las células y tejidos.

- 3.- Explicando los mecanismos de acción y dinámica de las reacciones histoquímicas.
- 4.- Tiende a la depuración de las técnicas de fijación de tejidos.
- 5.- Pretende llegar a la perfección de los métodos de coloración.

El Citoquímico y el Histoquímico deben estar en condiciones de poder aprovechar los mejores recursos de las ciencias físicas y químicas. No se requiere que sea un especialista de la Histología, Patología, Biología, Bioquímica o la Química Orgánica. Todas estas ciencias se complementan armoniosamente, el ideal está en la colaboración entre sí, sea mediante el trabajo en colaboración entre dos o más investigadores.

Desde luego, hay que tener presente que en la actualidad el trabajo histoquímico tiene notables variaciones, sus ramas se van ampliando cada vez más, y los horizontes se van extendiendo día a día. Así la Histoenzimología se va convirtiendo en un capítulo tan importante, que por si sola ya puede considerarse como una de las ramas más valiosas de la Histoquímica.

De todos los métodos Histoquímicos sobresalen los que se refieren a enzimas Deshidrogenásicas que gracias al uso de las sales de Tetrazolium han permitido un profundo conocimiento de las enzimas y la acción enzimática de este sistema. A tal punto, que se puede asegurar que la reacción con las sales Tetrazolium y sus derivados nitrados han hecho progresar la Citoquímica e

Histoquímica en grado que no se había logrado con otros reactivos.

Seligman y Rutemburg en 1971 y más tarde Pearson y Defenti en 1974 utilizan el INT: 3(p-iodo fenil)-2-(p-nitro fenil)-5- fenil tetrazolium y lo recomiendan para secciones delgadas de 5 a 10 micras en condiciones aeróbicas.

Psou y Col. en 1975, introdujeron el uso del nuevo tetrazolium: 2,2 di(p-nitro fenil)-5-5' difenil-3-3'..dimetoxi..4..4' difenilentetrazolium, que resultó hasta la fecha la sal de tetrazolium ideal para los propósitos histoquímicos de investigación de las enzimas oxidativas que exigían un aceptor de electrones más sensible.

El nitro BT fue sintetizado por la necesidad de obtener una rápida reducción anaeróbica en secciones muy delgadas de tejidos y que reuniera las ventajas del BT y del INT.

Entre las ventajas de la sal sintetizada por Psou mencionaremos las siguientes:

- 1.- Tamaño del producto final: formarán finalmente granulado, cristalizado, aunque con tendencia al crecimiento.
- 2.- Solubilidad de lípidos: en menor proporción que las otras sales de Tetrazolium.
- 3.- Sustantividad: tendencia para la adherencia a proteínas.
- 4.- Estabilidad del producto final.

Haciendo una confrontación de métodos y técnicas histoquímicas se llega a la conclusión que no todos poseen en el mismo grado las condi-

ciones que se exigen a la reacción histoquímica:

- 1.- Que el método sea capaz de establecer identidad química definida.
- 2.- Especificidad.
- 3.- Sensibilidad de la reacción.
- 4.- Poder de localización adecuada y exenta de poder de difusión.

Es obvio que la identidad química es indispensable en el método histoquímico. Sin ella carece de valor, pues lo que se reputa a determinada sustancia, también corresponde a otras sustancias diferentes.

No hay que olvidar que el método Histoquímico tiende a revelar la imagen química como preconiza Lisón.

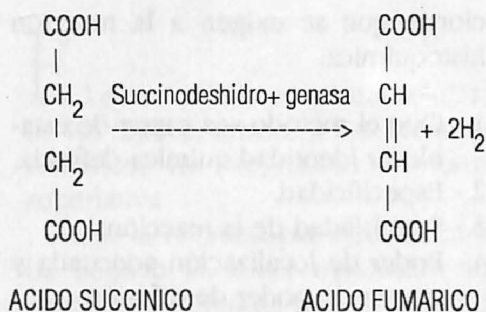
En cuanto a la especificidad y sensibilidad deben ser excelentes lo que depende de la calidad de las sustancias orgánicas empleadas como reactivos y substratos.

El poder de localización permite la investigación de detalles morfológicos a nivel de los organelos Celulares como mitocondrias, sistema de Golgi, y aún más allá, si se dominan los inconvenientes derivados de la difusión de colorante generado en lípidos celulares.

Tratándose de las sales de tetrazolium estas condiciones se cumplen. El mecanismo de acción se basa en la capacidad de funcionar como aceptores de hidrógenos, más propiamente, como captosres de electrones.

Esquemáticamente representamos el caso del ácido Succínico:





Este desarrollo de la Citoquímica y de la Histoquímica no ha sido repentino, sino por el contrario, ha tenido lugar en etapas sucesivas.

En el caso de la investigación de las deshidrogenasas, en un inicio se revelaban por la reacción de SEMENOFF, que consistía en la reducción del azul de metileno y su conversión en leuco-derivado.

Con las sales de tetrazolium que propusieron Seligman y Rutenburg, también la acción enzimática provoca un proceso de reducción, pero con diferentes resultados visibles. La hidrogenación en el azul de metileno lleva a la génesis del leuco-derivado incoloro; en la sal de tetrazolium a formazán coloreado.

Además, el electrón que será liberado por la acción enzimática deshidrogenásica para llegar a ser captado por la sal de tetrazolium debe ser transportado por intermediarios: los Citocromos b, c, a, las flavinas, las diaforasas.

Está demostrado por Nachlas, Margulies y Seligman, por Faber y Col., que las sales de tetrazolium no captan directamente el electrón liberado, sino que mas bien se trata de una transferencia a través de pasos intermediarios, uno de los cuales es a través de las dia-

forasas existentes en los tejidos. En el laboratorio uno de los pasos se reemplaza con el metasulfato de fenazina.

Con la aparición del tetranitro-tetrazolium TNBT, las ventajas logradas con el nitro BT han sido ampliamente superadas.

La localización intramitocondrial de las deshidrogenasas consigue detalles hasta de la integridad morfológica de la mitocondria. Si la mitocondria está sana el granulado del formazán es fino y perfectamente localizado; si la mitocondria ha sufrido daño, el contenido enzimático se escapa y difunde alrededor y la reacción se presenta difusa.

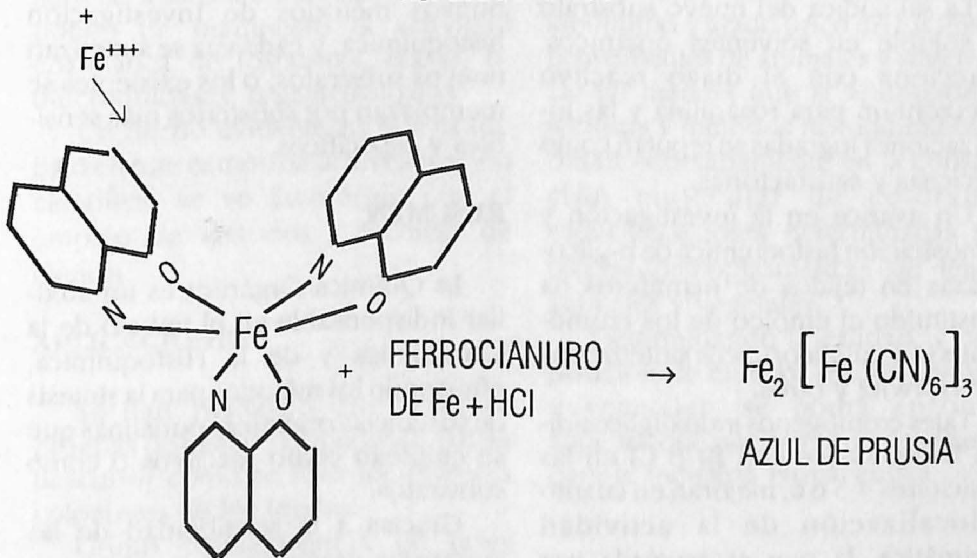
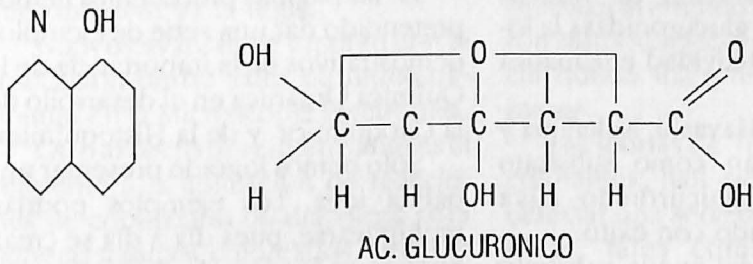
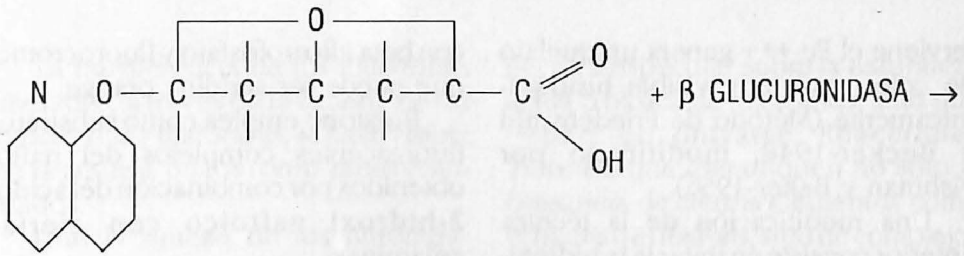
Una de las ventajas logradas con las sales de nitrotetrazolium es la posibilidad de revelar histoquímicamente enzimas de difícil manejo, como las diaforasas ligadas a sistemas enzimáticos tales como LDH, MDH, IDH, 3b-enzima, y otros.

En caso de la 3b-enzima, o sea, la 3 beta hidroxiesteroide deshidrogenasa, la acción enzimática se revela en forma magnífica con la sal tetra nitrotetrazolium.

Con el esquema de la página 71, referido a 3b-hidroxiesteroide deshidrogenasa, veremos claramente la conducción de la reacción.

Otro caso en que la Química Orgánica es la base necesaria para investigación histoquímica se tiene en la enzima b-glucuronidasa, que para ser identificada se aprovecha de la reacción que cataliza la enzima consiste en desdoblar el glucurónido de la b-hidroxiquinoleína en b-hidroxiquinoleína y glúcido.

Una reacción posterior en que in-



terviene el Fe  $+++$  genera un quelato de color azul muy visible histoquímicamente (Método de Friedenwald y Becker-1948, modificado por Fishman y Baker-1956).

Una modificación de la técnica anterior consiste en tratar la b-hidroxi-quinoleína por un diazoderivado como o-dianisidina o Diazo Bue, que genera un colorante azoico de color azul.

Con la preparación de nuevos substratos para b-glucuronidasa la localización de la actividad enzimática va mejorando.

Ultimamente Hayashi, Nakajima y Fishman, emplean como substrato naftol-AS-BI-b-D-glucurónido cuya síntesis han logrado con éxito.

La sal sódica del nuevo substrato es soluble en solventes orgánicos. Reacciona con el diazo reactivo hexazonium para rosanilina y las localizaciones logradas se reputan como preciosas y satisfactorias.

Un avance en la investigación y demostración histoquímica de b-glicosidasas en tejidos de mamíferos ha constituido el empleo de los cromógenos indoxilglicosídicos sintetizados por Horwitz y otros.

Tales cromógenos indoxilglicosídicos halogenados con Br o Cl en las posiciones 4-5 ó 6, mejoran en cuanto a localización de la actividad enzimática, la que es revelada por granulaciones más finas.

En el curso de la investigación de las fosfatasa se adelanta con la utilización de diversos substratos fluorescentes.

La técnica de Gomori de admirable simplicidad, consiste en incubar

con beta glicerofosfato y fluorocromo, que puede ser acridina orange.

Burstone, emplea como substratos fluorescentes complejos del naftol obtenidos por combinación del ácido-2-hidroxi naftoico con ciertas arilaminas.

Excelentes resultados se reportan con el complejo fluorocrómico resultante de la amino antraquinona.

En las páginas precedentes hemos pretendido dar una serie de ejemplos demostrativos de la importancia de la Química Orgánica en el desarrollo de la Citoquímica y de la Histoquímica.

Sólo hemos logrado presentar una pálida idea. Los ejemplos podrían multiplicarse, pues día a día se crean nuevos métodos de Investigación histoquímica, y cada vez se sintetizan nuevos substratos, o los existentes se reemplazan por substratos más sensibles y específicos.

## RESUMEN

La Química Orgánica es un auxiliar indispensable en el trabajo de la Citoquímica y de la Histoquímica, ofreciendo los métodos para la síntesis de sustancias orgánicas purísimas que se emplean como reactivos o como substratos.

Gracias a la sensibilidad de las sustancias orgánicas es posible perfeccionar los métodos de investigación de la actividad enzimática.

El empleo, por ejemplo, de las sales de tetrazolium como aceptores de hidrógeno permite revelar la acción de las enzimas de los sistemas oxidativos.

La transferencia de los electrones liberados, a través de la cadena de los citocromos y diaforasas, se hace visible en la génesis de los formazanes coloreados.

Con la síntesis de los nitrotetrazolium se logra un perfeccionamiento no alcanzado aún en el campo de otros sistemas enzimáticos. La localización mitocondrial con el microscopio óptico es ya la regla.

Nuevos avances se esperan con la aplicación de las sales de nitrotetrazolium en la Microscopía Electrónica.

Otro aspecto muy interesante es el referente a la aplicación de reacciones de copulación de diazoicos para generar azoicos coloreados, "in situ" ponen de manifiesto la actividad enzimática de fosfatasas, erasas, b-blucoronidasas, b-galactosidasas.

Un hecho evidente es que el trabajo en este campo de la investigación científica, se ve favorecido con el empleo de métodos y técnicas de ciencia.

## APLICACIONES

Se han analizado diversidad de pruebas de ensayo con la finalidad de descubrir como se fijan los diversos colorantes de los tejidos.

Como consecuencia de tales pruebas se propusieron teorías, que establecen que el objeto de la tinción es determinar hechos morfológicos y de conocer microquímicamente la existencia y distribución de sustancias.

Es importante señalar que no es suficiente limitarse al empleo de colorantes ácidos y básicos, que con-

lleven a especular sobre la naturaleza ácida o básica de los tejidos, sino que deben encontrarse Reacciones Tintorias que identifiquen no sólo la presencia de ciertos elementos como el hierro o el fósforo, sino de complejos orgánicos, tales como mucinas, protaminas, mucopolisacaridos, glucógeno y otros.

Algunas de las reacciones que precisan el empleo de colorantes fueron histoquímicos, pero su importancia quedó interpretada equivocadamente.

Las teorías de Tincion de materias colorantes, han sido utilizadas para detectar una serie de sustancias orgánicas, tales como: aminoácidos, albúminas y ácido úrico en los tejidos provenientes de animales y vegetales. De tal manera que la aplicación de técnicas y métodos histoquímicos, se basan necesariamente en la constitución molecular de colorantes específicos, para determinadas sustancias protoplasmáticas de tejidos animales y vegetales.

Determinando la calidad, y composición de muchos tejidos animales y vegetales, se podrá encontrar aquellos que puedan venir de insumos para la industria farmacéutica. ●