

EL AZOCARMIN Y LA HEMATOXILINA PLUMBICA EN LA TINCION DE CELULAS DE LA PARS DISTALIS DE LA HIPOFISIS DE CONGRIO, SAPO Y GATO

Por MARIO A. RESTELLI Y FERMIN C. ITURRIZA *

R E S U M E N

Se estudiaron hipófisis de congrio, sapo y gato con las técnicas de azocarmín, hematoxilina plúmbica y ácido peryódico-reactivo de Schiff.

En el congrio se observó que las células azocarminófilas son hematoxilina plúmbica positivas y ácido peryódico-Schiff negativas.

En el sapo y gato las células azocarminófilas son ácido peryódico-reactivo de Schiff positivas y hematoxilina plúmbica positivas.

Se realiza una descripción detallada del método de tinción con el azocarmín preconizado por los autores argentinos.

Se asume que la hematoxilina plúmbica no es un colorante específico para células corticotropas en otras especies distintas a los teleosteos.

A B S T R A C T

**Lead hematoxylin and azocarmine in the staining of cells of the
pars distalis of the hypophysis of conger, toad and cat.**

Pituitary glands of conger, toad and cat were stained with azocarmine, periodic acid-Schiff reactive, and lead hematoxylin in order to determine the affinity of the cells for the different stains. It was observed in conger that azocarminophil cells are the only ones which are stained with lead hematoxylin; these cells are periodic acid-Schiff reactive negative.

In the toad and cat azocarminophil cells are lead hematoxylin positive and periodic acid-Schiff reactive positive.

It is assumed that lead hematoxylin is not a specific stain for evidencing corticotrophic cells in species other than teleosts.

In view of the differences existing in the use of azocarmine between the european authors and argentinian ones, a detailed methodological description of the azocarmine technique used by us is done.

El método de tinción con hematoxilina plúmbica (HP), originalmente introducido por Mac Conaill (8) en el arsenal de coloraciones histológicas, ha sido utilizado por Olivereau (11) como colorante

* Laboratorio de Neuroendocrinología Comisión de Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires, La Plata, Argentina.

especifico para las células productoras de adrenocorticotrofina en algunos peces teleosteos, incluyendo anguiliformes.

Como el significado funcional de las diversas células de la pars distalis de la hipófisis de anfibios (16, 7, 10) y del gato (1) parecieran estar en la actualidad esclarecidas, se consideró de significación observar qué células son las HP positivas en las glándulas de estas dos especies y comparar estos resultados con aquellos obtenibles en el congrio.

MATERIAL Y METODOS

Fueron utilizados 8 hipófisis de gato, 20 de sapo (*Bufo arenarum*) y 5 de pez anguiliforme (*Conger orbignyanus*). Todos los animales eran adultos y pertenecían a ambos sexos.

El material fue fijado en líquido de Elftman (5) durante tres horas, con ulterior deshidratación e inclusión en parafina según el método de rutina. Se hicieron secciones de 5 micrones de espesor, las que fueron coloreadas con las tres técnicas más abajo detalladas. En todos los casos los cortes fueron colorados con una técnica dada, fotografiados, decolorados, recolorados, y refotografiados, de forma tal que las tres coloraciones distintas fueron sucesivamente aplicadas a un mismo corte.

A los efectos de establecer si la utilización previa de una tinción afectaba en algo a la otra tinción posteriormente aplicada, se siguieron las distintas secuencias de coloración según un orden de posibilidades.

Las coloraciones utilizadas fueron las siguientes:

- a) Acido peryódico - reactivo de Schiff (PAS), según Gomori (6).
- b) Hematoxilina plúmbica (HP), según Mac Conaill (8).
- c) Azocarmin, según Prieto - Díaz y Echave - Llanos (12).

Como hemos podido observar a través de diversos artículos, especialmente aquellos referentes a hipófisis de anfibios (16, 7, 9) aparecidos en los últimos tiempos, que diversos autores no utilizan la técnica del azocarmin tal como ha sido preconizada por Prieto-Díaz y secuaces (12, 13, 14) en sus estudios sobre hipófisis, nos ha parecido oportuno volver a detallar esta técnica.

1. Los cortes son colorados durante una hora a 56°C. en la siguiente mezcla, que se halle ya a esa temperatura.

| | |
|----------------------|---------|
| Azocarmin G. | 2 gr. |
| Acido acético | 5 gotas |
| Agua destilada | 100 ml. |

2. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.

3. Este paso consiste en la diferenciación y es un paso crítico en la tinción utilizada por nosotros; se realiza en una solución de aceite de anilina 1 por mil en alcohol 96, en **absoluto reposo y con el portaobjeto horizontal** en una caja de Petri, como lo indica la fig. 1. La diferenciación se realiza a temperatura ambiente en un tiempo variable entre 12-24 horas y debe ser controlada periódicamente al microscopio, sin previo lavado de la preparación y sin permitir que

ella se seque durante la observación. Si a los efectos de acelerar la diferenciación se agita el portaobjeto o se agrega agua a la solución, las células que resultarán coloradas no serán exclusivamente las azocarminófilas de nuestras previas publicaciones (ver discusión).

4. Detener la diferenciación en 1 por ciento de ácido acético en alcohol 96, durante 1 minuto. La diferenciación se suspende cuando los gránulos de las células azocarminófilas continúan intensamente rojos, mientras que los citoplasmas de otros tipos celulares deben observarse incoloros y los núcleos de todas las células ligeramente rojizos.

5. Luego de haber detenido la diferenciación, si se desea observar únicamente las células azocarminófilas los especímenes serán deshidratados en alcoholes de graduación creciente, clarificados en xilol y montados en bálsamo o medios sintéticos; si por el contrario, se desea completar la técnica de Azán para la coloración de otros tipos celulares, se tratarán los cortes de ácido fofotúngstico y posterior coloración en la mezcla orange G-azul de anilina, según Prieto-Díaz y col. (14).

OBSERVACIONES

Gato. Las células azocarminófilas del gato han sido detalladamente estudiadas por Bade y Echave-Llanos (1) quienes han destacado la PAS positividad de estos elementos. En el presente trabajo hemos podido comprobar que ellas son el único tipo celular de la pars distalis de este animal que se colorea con la HF (Fig. 2).

Congrio: En la pars distalis rostral de esta especie, en íntimo contacto con las digitaciones que envía la pars nervosa y separadas de ellas por una delgada membrana basal, pudieron observarse células alargadas con granulaciones intensamente azocarminófilas que mediante una delgada protrusión se aplican sobre la antedicha membrana basal. Estas células de distribución tan peculiar fueron las únicas azocarminófilas halladas en la pars distalis rostral y mostraron una reacción negativa con el PAS, pero resultaron ser intensamente positivas con la HP (Fig. 3).

Sapo: La morfología y distribución de las azocarminófilas del sapo fueron ampliamente descritas en trabajos anteriores (12, 14). En el presente estudio se corroboró que este tipo celular da reacción intensamente positiva con el PAS y se halló que es el único que se colorea con la HP (Fig. 4).

DISCUSION

En este trabajo se describe detalladamente la técnica que los autores argentinos hemos utilizado para teñir las células que nosotros denominamos azocarminófilas. Deseamos poner especial énfasis en destacar los detalles de **diferenciación** de los cortes teñidos con azocarmin, pues este paso es decisivo para la tipificación de dichos elementos. Según lo han establecido Bade y Echave-Llanos (1) las células azocarminófilas de la hipófisis del gato referidas en su trabajo y en el presente, **no** son homologables con aquellas definidas como tales por Dawson (4) en esta misma especie. El método de

diferenciación aquí usado ha decolorado totalmente a los elementos de Dawson, mientras que si se hubiese deseado ponerlos en evidencia habría que haber agitado los cortes en la diferenciación o haber añadido discreta cantidad de agua a la mezcla diferenciadora (Echave-Llanos, comunicación personal). Es también importante destacar que si los cortes son diferenciados con el portaobjeto colocado verticalmente y agitando, por causas ignoradas, las células ubicadas en la periferia de la sección se decoloran mucho más rápidamente que las centrales, determinando, cuando la tinción del azocarmin va seguida de la mezcla orange-azul de anilina, que las células periféricas captan el azul constituyendo de esta forma elementos púrpura (rojo del azocarmin + azul del azul de anilina). Este último mecanismo, dicho sea de paso, podría proveer explicación al hallazgo de células púrpura en la pars distalis del sapo *Bufo vulgaris*, por parte de Zuber-Vogeli (17). Bade y Echave-Llanos (1) han demostrado la función gonado-tropa de las células azocarminófilas del gato y aquí demostramos que ellas son las únicas HP positivas; por o tanto, en esta especie la HP no colorea las células corticotropas, interpretación que coincide con los hallazgos de Carlon (3) en el perro.

En el congrio nuestros hallazgos son coincidentes con los de Ball y Oliveréau (2) en la anguila europea *Anguilla anguilla* y en *Poecilia latipinna* en lo referente a la localización y morfología de las células HP positivas. En la especie aquí estudiada estas células resultaron ser azocarminófilas y PAS negativas. Estos autores (2) parecen haber demostrado consistentemente que las células HP positivas de los dos teleosteos antes mencionados son corticotropas. Dada la identidad morfológica, topográfica y tintorial entre las células HP positivas del congrio y la anguila, existen bases como para pensar que en el congrio las células azocarminófilas también representan elementos corticotropos.

En el sapo las células azocarminófilas comparten idénticas afinidades tintoriales que aquellas del gato, es decir, son PAS positivas y HP positivas; sin embargo, desde el punto de vista funcional, parecen no ser similares las de ambas especies, pues existen fuertes evidencias de que las azocarminófilas del sapo son tirotropas (14).

Dadas las condiciones de diferenciación del azocarmin utilizadas por nosotros, que difieren de las de investigadores europeos, se puede asumir que las azocarminófilas del *Bufo arenarum* no son homologables con las de aquellos. Para establecer un parangón entre la tipificación celular por nosotros empleada y la de otros autores se puede consultar Prieto-Díaz y col. (14). Posteriormente a este trabajo han aparecido diversos estudios sobre la citología de la pars distalis de otros anfibios, de ellos concluimos que las azocarminófilas de *Bufo arenarum* pueden ser homologables con: a) las células gamma de van Oordt (16); b) las células basófilas tipo III de Kerr (7); c) las células basófilas tipo II de Mazzi y col. (10), las que según este autor son HP positivas. Ninguno de éstos ha asignado función corticotropa a las células homologables con las azocarminófilas de *Bufo arenarum*; por lo tanto, se puede sostener que la HP no es una técnica específica para células corticotropas, concepto referido, al menos, a especies diferentes a los teleosteos.

Por último, deseamos destacar el hecho de que ciertas células hipofisarias poseen idéntica afinidad para el azocarmin como para la HP, lo que, teniendo en cuenta las distintas estructuras químicas de las hormonas que ellas contienen, no hablaría de una afinidad específica determinada por la calidad del material hormonal, sino, tal vez, de su cantidad o de un estado físico químico del material almacenado (15). La conjunción entre PAS positividad—HP positividad—azocarminofilia que caracteriza a las células del sapo y gato se ve disociada en el congrio, donde las células que nos ocupan no evidencian ser PAS positivas; esto indicaría que la substancia/s responsable de la PAS positividad no es la misma que determina la afinidad por el azocarmin y la HP en las diferentes células.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean destacar su agradecimiento al Prof. Dr. J. M. Echave-Llanos por haberles proporcionado detalles de la técnica del azocarmin; a la Prof. M. Olivereau por similares datos con respecto a la hematoxilina plúmbica; a la Prefectura Nacional Marítima del Puerto de Mar del Plata por facilitarles la obtención de los peces; y a R. Raña por su asistencia técnica.

OBRAS CITADAS EN EL TEXTO

1. BADE, E. G. y ECHAVE-LLANOS, J. M. (1962). *Citología de la pars distalis de la hipófisis del gato*. Rev. Soc. Argent. Biol. 38: 184.
2. BALL, J. N. y OLIVIEREAU, M. (1966). *Identification of ACTH cells in the pituitary of two teleosts, Poecilia latipinna and Anguilla anguilla: Correlate changes in the intercell and in the pars distalis resulting from administration of metopirone (SU 4885)*. Gen. Comp. Endocr. 6: 5.
3. CARLON, N. (1966). *Sur la possibilité d'identifier les cellules à LH-ICSH dans l'adenohypophyse du Chien par l'hématoxyline au plomb*. Comp. Rend. Soc. Biol. 160: 136.
4. DAWSON, A. B. (1946). *Some evidences of specific secretory activity of the anterior pituitary gland of the cat*. Am. J. Anat. 78: 347.
5. ELFTMAN, H. (1957). *A chrome-alum fixative for the pituitary*. Stain Technol. 32: 25.
6. GOMORI, G. (1958). *Microscopic Histochemistry*, pag. 58. The University of Chicago Press, Chicago (USA).
7. KEER, T. (1965). *Histology of the distal lobe of the pituitary of Xenopus laevis Daudin*. Gen. Comp. Endocr. 5: 232.
8. MAC CONAILL, M. A. (1947). *Lead hematoxylin*. J. Anat. 81: 371.
9. MAZZI, V. (1949). *La citología dell'ipofisi del tritone crestato*. Arch. Ital. Anat. Embriol. 54: 3.
10. MAZZI, V.; PEYROT, A.; ANZALONE, M. R. y TOSCANO C. (1966). *L'histophysiologie de l'adenohypophyse du triton crêté (Triturus cristatus carnifex Laur)*. Z. Zellforsch. 72: 597.
11. OLIVIEREAU, M. y BALL, J. N. (1964). *Contribution à l'histophysiologie de l'hypophyse des téléostéens, en particulier de celle de Poecilia species*. Gen. Comp. Endocr. 4: 523.
12. PRIETO-DÍAZ, H. E. y ECHAVE-LLANOS, J. M. (1947). *Citología de la porción distal de la hipófisis del Bufo arenarum (H)*. Arch. Histol. Norm. Patol. 3: 541.
13. PRIETO-DÍAZ, H. E.; ITURRIZA, F. C. y GÓMEZ-DUMM, C. L. A. (1959). *Estudio citológico de la hipófisis del Bufo arenarum Hensel*. Actas y Trabajos del Primer Congreso Sudamericano de Zoología 5: 239.

14. PRIETO-DÍAZ, H. E.; ITURRIZA, F. C. y THEA, J. P. (1963). *Azocarmophil cells of the toad adenohypophysis after mercaptoimidazol or radioiodothyroidectomy*. Gen. Comp. Endocr. 3: 569.
15. PURVES, H. D. (1961). *Sex and Internal Secretions*, pag. 161. W. C. Young edit., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (USA).
16. VAN OORDT, P. G. W. J. (1961). *The gonadotropin-producing and other cell types in the distal lobe of the pituitary of the common frog, Rana temporaria*. Gen. Comp. Endocr. 1: 364.
17. ZUBER-VOGELI, M. (1953). *L'histophysiologie de l'hypophyse de Bufo vulgaris L.* Arch. anat. histol. Embriol. 35. 77.

L A M I N A S

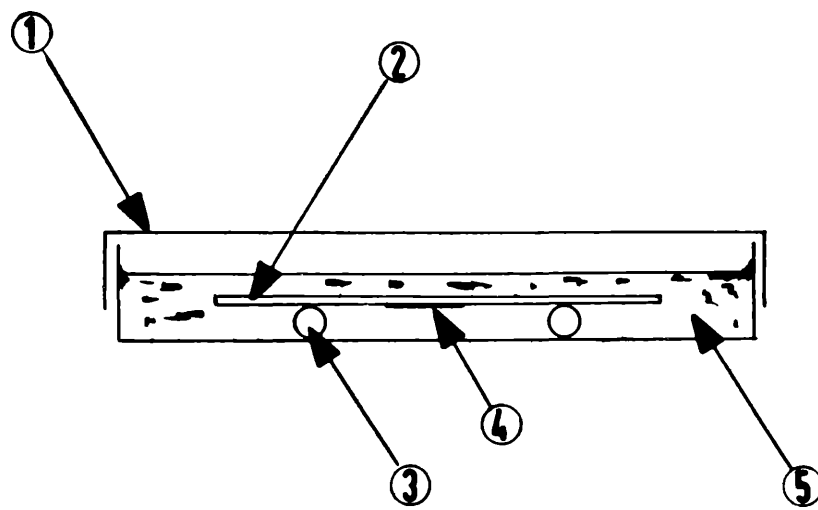
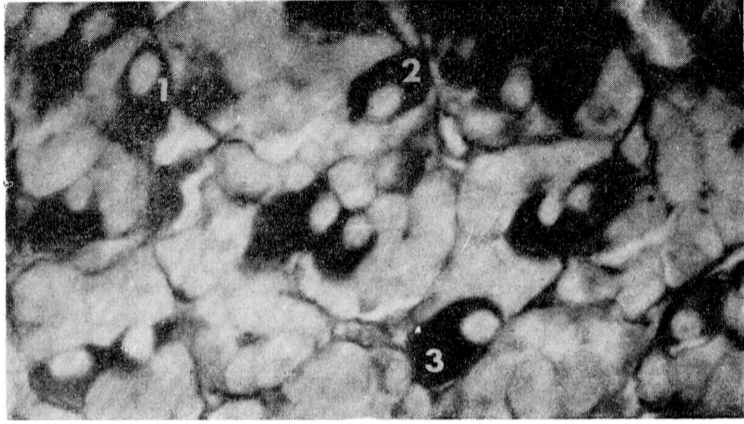
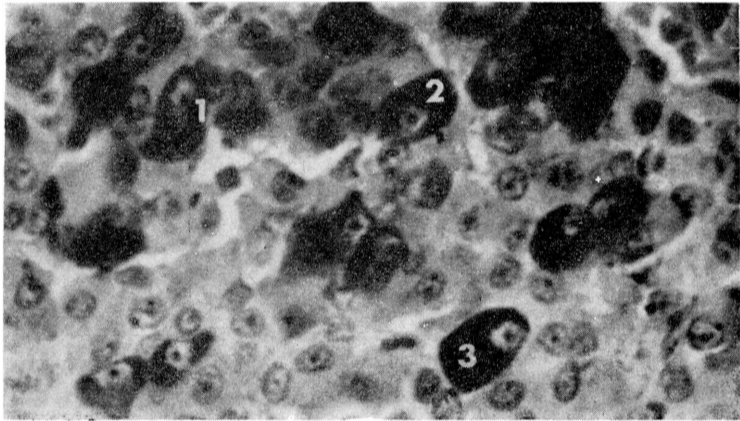


FIG. 1. — Posición del portaobjetos durante la diferenciación en alcohol-acéite de anilina en el método de azocarmín. 1, caja de Petri; 2, portaobjetos; 3, varilla de vidrio; 4, espécimen; 5, solución diferenciadora (Alcohol-acéite de anilina).

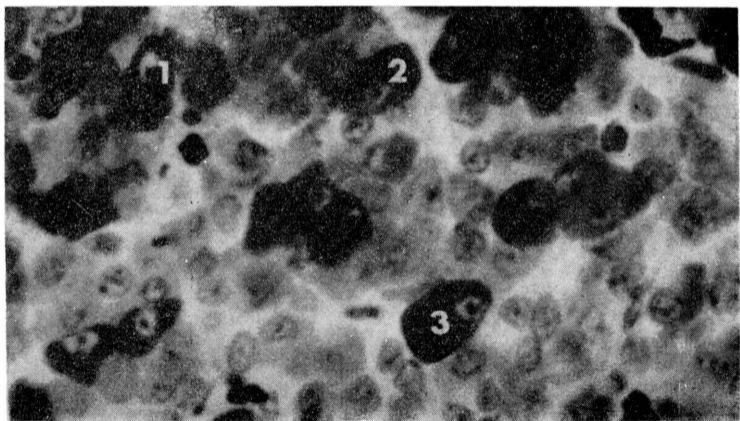
FIG. 2. — Hipófisis de gato. Las células señaladas con idénticos números son las mismas. A, PAS; B, HP; C, azocarmín. Obsérvese la afinidad de las mismas células por las tres coloraciones. $\times 1600$.



A .

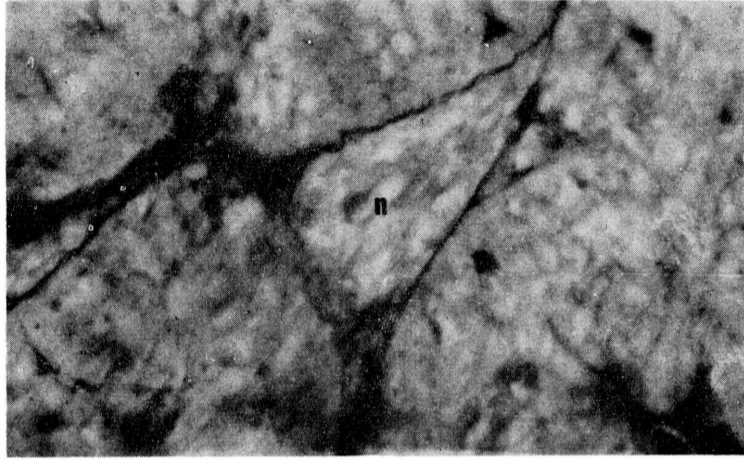


B

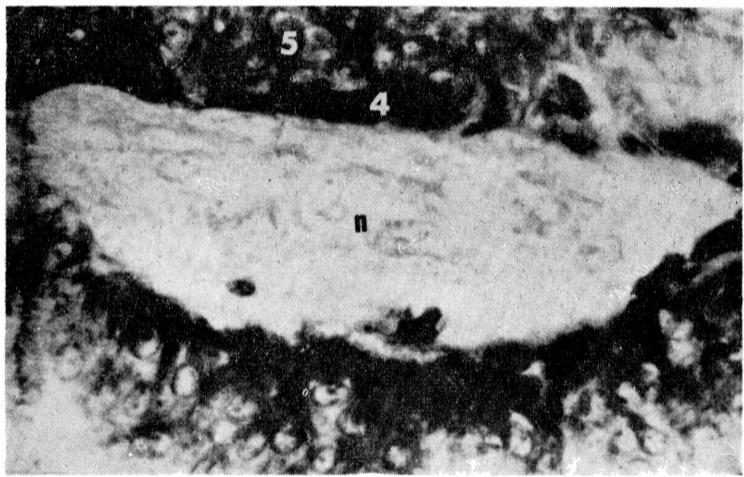


C

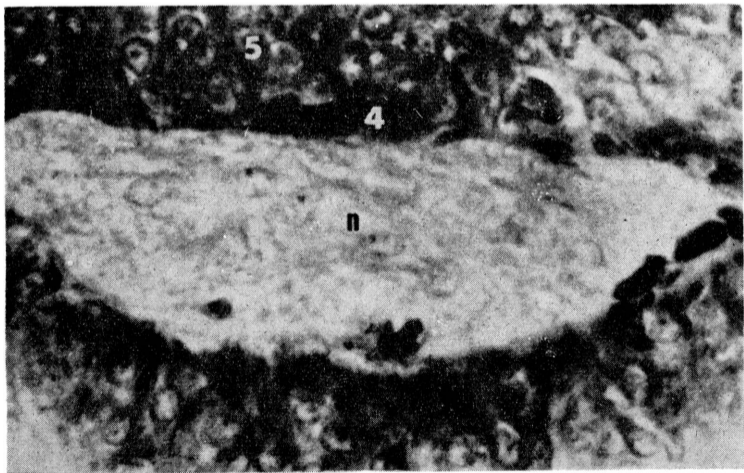
FIG. 3. — Hipófisis de congrio. Las técnicas de coloración son iguales que en fig. 2. *A* es un corte distinto a *B* y *C* que son el mismo corte; *n*, digitación seurohipofisaria. Se aprecia que las células "en empalizada" (4,5), son HP positivas (*B*) y azocarminófilas (*C*) pero no son PAS positivas (*A*). × 1600.



A

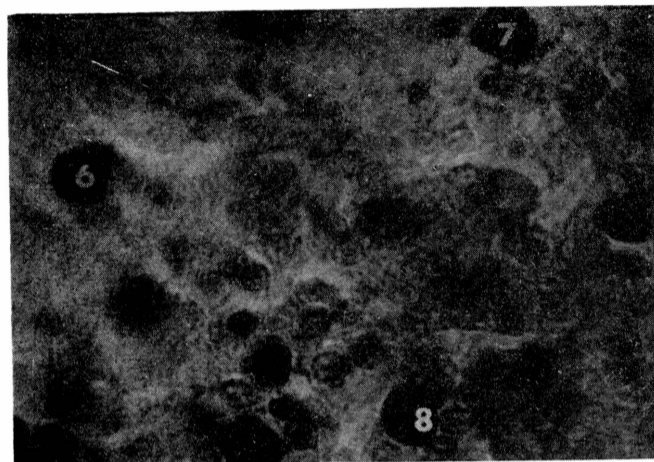


B

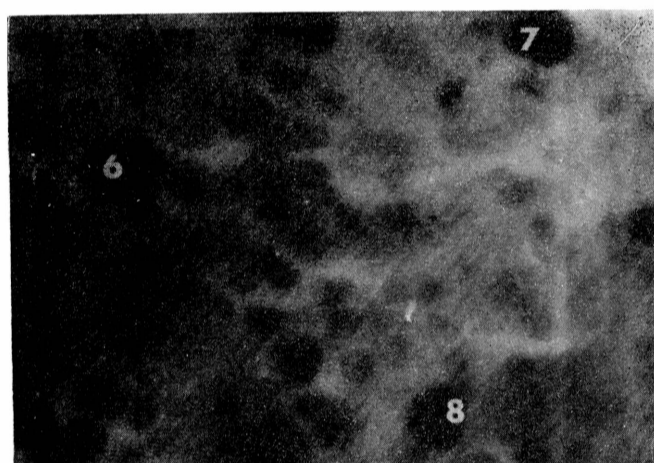


C

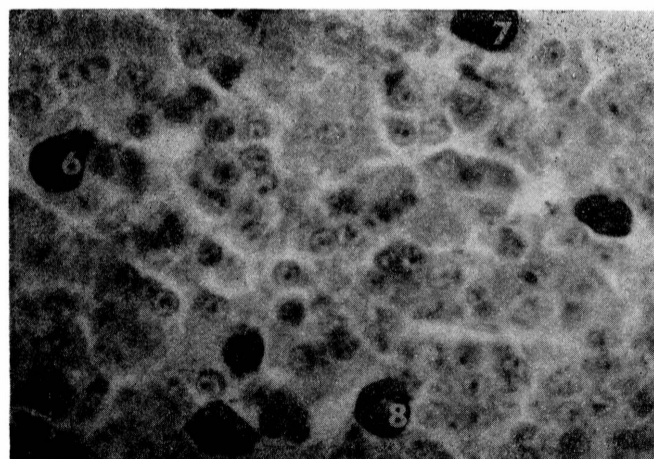
FIG. 4. — Hipófisis de sapo. Idéntica explicación que para fig. 2. $\times 1600$.



A



B



C