

Estudio y detección de colágena de la matriz extracelular (MEC) mediante técnicas de tinción específicas

Angélica Dehesa De Gante y Claudia Karina Torres Villaseñor
Universidad Simón Bolívar

Resumen

La colágena es la proteína estructural más importante de la matriz extracelular; realiza varias funciones, por lo cual es un indicativo de la fisiología del tejido, ya sea en estados patológicos o en procesos de regeneración. Por tal motivo, es indispensable en estudios histológicos reconocer a la colágena y su estado fisiológico. Se compararon los resultados de dos técnicas de tinción específicas para colágena (Elástica de Van Gieson y Herovici) con una técnica básica (Hematoxilina-Eosina) en diferentes tejidos conectivos (laxo, denso y mesenquimático), así como en hueso implantado con el xenoinjerto Nukbone. La técnica que permite una mayor definición estructural de las fibras es la Elástica de Van Gieson; sin embargo, la técnica de Herovici revela no sólo su estructura sino también su fisiología en un proceso de neoformación.

Palabras clave: colágena, H-E, Elástica de Van Gieson, Herovici, piel, mesénquima, xenoinjerto, hueso.

Abstract

The collagen is the most important structural protein of the extracellular matrix. It carries out several functions, that is why it is an indicative of the physiology of the tissue, either in pathological states or in regeneration processes. Due to this fact it is indispensable in histology studies to recognize the collagen and its physiological state. The results of two specific tincture techniques were compared (Elastic of Van Gieson and Herovici) with a basic tincture technique (H-E) in different connective tissues (lax, dense and mesenquimal), as well as in implanted bone with the xenograft Nukbone. The technique that allows a better structural definition of the fibers is the one called elastic of Van Gieson. However, Herovici's technique not only reveals the structure but also the physiology in a neoformation process.

Keywords: collagen, H-E, Elastic of Van Gieson, Herovici, skin, mesenquimal, xenograft, bone.

Introducción

La colágena es el componente principal fibroso de la dermis. Esta proteína estructural representa en los mamíferos el 30 % de las proteínas totales del organismo y comprende el 77% del peso seco sin grasa de la piel (Valadez, 1998). La función de la colágena en la dermis es la de proporcionar masa y fortaleza mecánica, para soportar la epidermis

y unir la dermis, permitiendo así la oposición a las tracciones ejercidas desde múltiples direcciones (Geneser, 2000).

La colágena también participa en el proceso de remodelación tisular; ésta es sintetizada por los fibroblastos en la cicatrización de una herida y actúa como soporte del nuevo tejido en desarrollo. Por lo anterior, la colágena es considerada como

uno de los materiales más utilizados en medicina para reparar daños o traumas químico-mecánicos, ya sea en piel o mucosas, debido a su biocompatibilidad y su capacidad para promover la cicatrización de heridas especialmente en el tejido epitelial (Bernaes et al., 2004; Bello et al., 2004).

La estructura molecular de las fibras colágenas presenta entrecruzamientos por puentes de hidrógeno (uniones covalentes) entre las cadenas, las cuales se incrementan con la edad. Estos puentes se forman por la acción inicial de la enzima lisinoxidasa, que transforma en aldehídos a la lisina o a la hidroxilisina, aldehídos que posteriormente se pueden condensar mediante reacciones químicas espontáneas con otros grupos (Lehninger, 1993; Cordero, 1997).

Actualmente existen 19 tipos de colágeno, de los cuales 16 han sido encontrados en los tejidos humanos, siendo los más abundantes y por lo tanto los más estudiados los de tipo I, presente en hueso y en la dermis reticular; los de tipo II, presente en cartilago hialino y los de tipo III, presente en la dermis papilar (Cordero, 1997; León, 2001).

Asimismo, las fibras se disponen espacialmente de diferentes maneras, de acuerdo con la función que habrá de cumplir cada tejido: en paralelo (tendones), como placas en distintas direcciones (piel) o en forma de fibras continuas (dientes), dependiendo de las diferentes direcciones de las fuerzas que deban soportar (Lehninger, 1993).

Objetivo

Comparar técnicas básicas de tinción como Hematoxilina – Eosina y específicas para colágena como son Herovici y Elastica de Van Gieson, que permitan describir e identificar dichas fibras. Asimismo, determinar cuáles son las técnicas que permiten analizar características específicas de la colágena relacionadas con su estructura y función.

Método

Se utilizaron muestras frescas de piel de anfibio, hueso y piel de conejo, embrión de hámster y el xenoinjerto *Nukbone*, las cuales se fijaron en for-

mol amortiguado al 37% con pH 7.4, durante 18 hrs.; posteriormente se lavaron con agua corriente y se deshidrataron con alcoholes graduales, se aclararon en xilol y finalmente fueron incluidas en parafina con un punto de fusión de 54 °C.

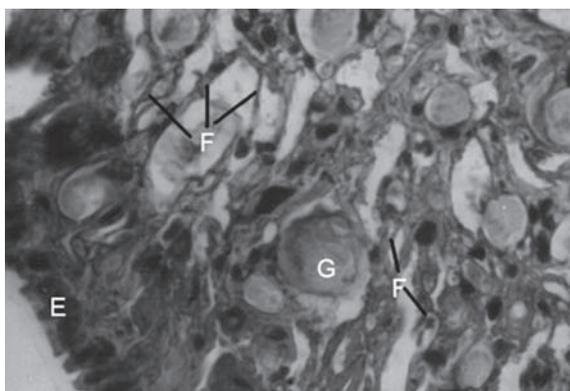
Posteriormente se realizaron cortes utilizando el microtomo por rotación con un grosor de 7 mm y se tiñeron con las técnicas de Hematoxilina-Eosina (H-E) (Estrada, 1984), Tricrómica de Van Gieson (TVG) (UAM, 2008) y Tinción de Herovici (TH) (Herovici, 1963).

Por último, se observaron al microscopio óptico (Zeiss Modelo Axiostar), con el fin de evaluar la presencia, distribución, tipo y morfología de las fibras colágenas.

Resultados

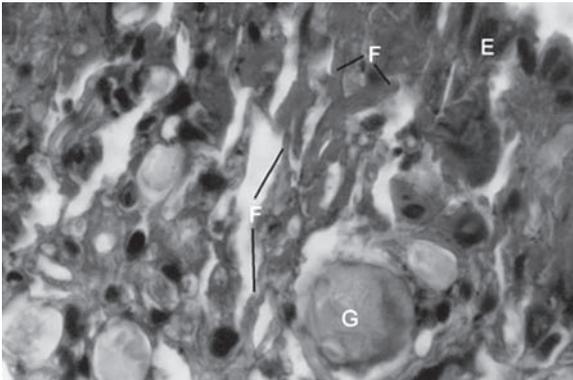
Las fibras de colágena en la piel de rana, con la técnica H-E, a menor aumento se distinguen como una red densa y fibrosa que sustenta a las células sin proporcionar rasgos particulares de su estructura (ver figura 1); a mayor aumento se distinguen paquetes fibrilares indefinidos y esoinófilos, destacándose del resto de los componentes tisulares (ver figura 2).

Figura 1. Piel de anfibio.



Se observa la presencia de las fibras de colágena (F), glándulas exócrinas (G) y epitelio cilíndrico simple (E). H-E, 400x.

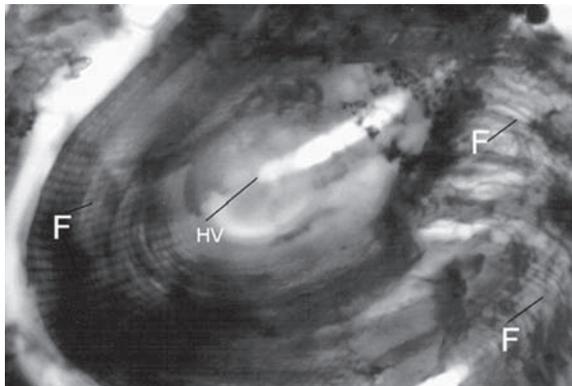
Figura 2. Piel de anfibio.



Se distinguen las fibras de colágena (F), glándulas exocrinas (G) y el epitelio cilíndrico simple (E). H-E 1000x.

En el hueso compacto en regeneración, con la técnica de Elástica de Van Gieson, se distinguen las fibras de colágena que forman el soporte para la osificación y también las fibras que se encuentran en la matriz extracelular del hueso (ver figura 3).

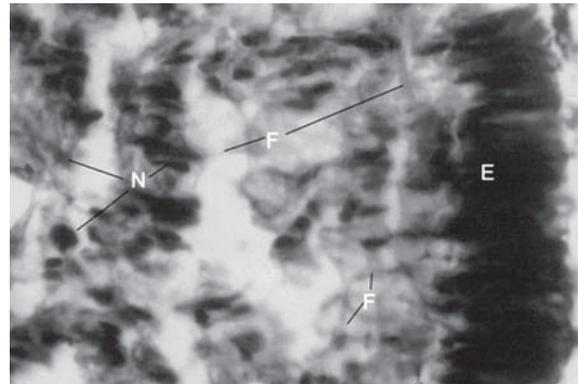
Figura 3. Hueso compacto en regeneración.



Se observa la presencia de fibras de colágena (F) y el canal de Havers (Hv). Van Gieson. 1000 x.

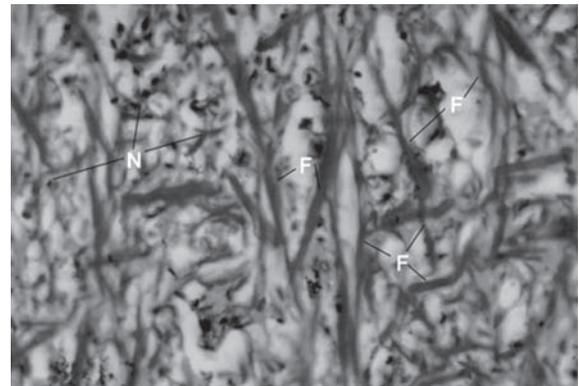
En la piel de rana teñida con la técnica Elástica de Van Gieson, a menor aumento se observa una red de sostén definida por fibras paralelas unidas (ver figura 4); a menor aumento se observa con detalle haces de fibras formados a su vez por fibrillas dispuestas en paralelo (ver figura 5).

Figura 4. Piel de anfibio.



Se distingue la presencia de fibras de colágena (F), los núcleos de células del tejido conectivo (N) y el epitelio cilíndrico simple (E). Van Gieson 400x.

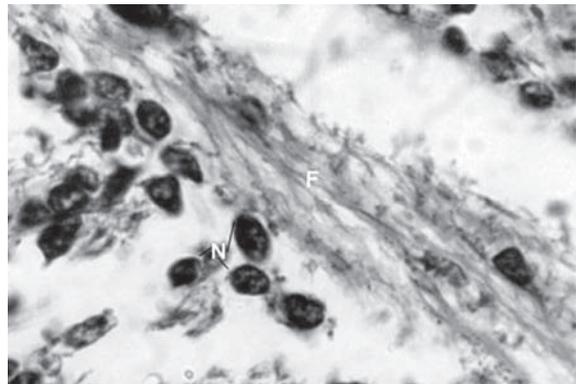
Figura 5. Dermis de anfibio.



Se aprecian las fibras de colágena (F) y los núcleos de las células del tejido conectivo (N) Van Gieson, 1000x.

En el tejido embrionario se distingue, por la técnica Elástica de Van Gieson, la presencia de fibras de colágena en paralelo y ramificadas, que darán el soporte para el desarrollo de los tejidos diferenciados (ver figura 6).

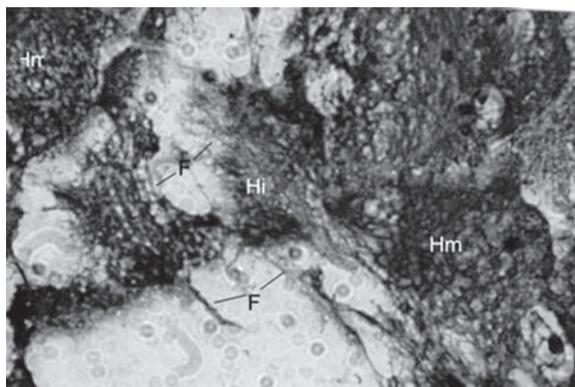
Figura 6. Tejido mesenquimático de embrión de hámster.



Se observan las fibras de colágena (F) y los núcleos de las células mesenquimáticas (N). Van Gieson. 1000x.

Finalmente en el hueso implantando con el Xenoinjerto Nukbone, teñido con la técnica de Herovici, se aprecia la diferencia entre dos estadios de la colágena: su fase inmadura de color rojo y su fase madura de color azul. Esta última se observa ramificada (ver figura 7).

Figura 7. Xenoinjerto Nukbone implantado en hueso de conejo.



Se distinguen las fibras de colágena (F), diferenciándose las fibras maduras (Hm) de las inmaduras (Hi). Herovici 1000x.

Discusión

La colágena es el principal componente fibrilar de la matriz extracelular (MEC), cualquier alteración en su entrelazamiento puede resultar en un deterioro de la fibra y este hecho se encuentra asociado a procesos patológicos, por lo anterior, es fundamental identificarlas mediante un análisis histológico adecuado utilizando técnicas de tinción específicas relacionadas con los objetivos de estudios determinados.

La colágena no sólo es importante en procesos patológicos sino también en procesos de regeneración tisular de manera natural o utilizando xenoinjertos (*Nukbone*), porque son el soporte para las células que migran a la zona dañada, las cuales son responsables de la reparación del mismo (León, 2001; Brady, 1979). Por tanto, consideramos que es importante describir su estructura relacionada con su comportamiento en dicho proceso.

Las fibras colágenas son fáciles de reconocer en los cortes histológicos, debido a sus características físico-químicas, ya que son birrefringentes y anisótropas. Estas características también permiten reconocer la orientación longitudinal de las fibrillas cuando se les aplica luz polarizada porque aparecen dotadas de birrefringencia uniaxial positiva (Iglesias y Rodríguez, 2001).

En la mayoría de los estudios realizados sobre regeneración tisular, la colágena es identificada a través de las tres técnicas analizadas en el presente trabajo (León, 2001; Suárez et al., 2004; Vásquez y Del Sol, 2001; Levame y Mayer, 1987).

Al inicio de todo estudio es importante localizar e identificar a la colágena, por medio de una técnica básica como es la de la hematoxilina y eosina. La hematoxilina es un colorante aniónico y actúa como un pigmento básico, por lo cual se asocia a estructuras aniónicas (que posean fosfatos, sulfatos y/o carboxilos ionizados) como cromatina y núcleos, tiñéndolos de color azul. Por su parte, la eosina es un colorante ácido (predomina densidad de carga negativa), por lo cual se asocia a estructuras catiónicas del citoplasma y matriz extracelular, tales como: filamentos citoplasmáticos (como los de células musculares), membranas intracelulares y fibras colágenas, tiñéndolas de un tono rosa intenso, logrando una diferenciación de la colágena con respecto a los demás componente titulares (Iglesias y Rodríguez, 2001).

La técnica de Elástica de Van Gieson se utiliza para la coloración de fibras colágenas y elásticas. La colágena reacciona con un colorante ácido que la tiñe de rojo, núcleos y fibras elásticas de negro y citoplasma de amarillo (Stevens y Steven, 2006). Es una técnica más especializada porque nos proporciona una mejor definición de la morfología y distribución de las fibras de colágena gracias a los contrastes que proporcionan los colorantes de dicha técnica.

El método de Herovici no sólo define la disposición de fibras colágenas sino que las tiñe de diferente color según su fase de maduración: azul, si la colágena se encuentra en una etapa inmadura (precolágeno) y roja si se encuentra en su forma madura, esto debido a la afinidad que tienen las fibras con el azul de metilo y la fuccina ácida. Al igual que en la técnica de Van Gieson, el citoplasma se colorea en un tono amarillo y finalmente los núcleos se tiñen de color negro.

Una de las ventajas principales de este método es su aplicación en muestras que no han sido procesadas por la técnica histológica como son los xenoinjertos hechos a base de colágena (*Nukbone*), con el objetivo de estudiar además de la microestructura del material la interacción entre éste y el tejido, lo cual revela la biocompatibilidad del injerto. Por lo tanto, es ideal para este tipo de estudios.

Conclusión

Aunque todos los métodos utilizados en este trabajo mostraron elementos importantes de los tejidos estudiados, consideramos que el método de Herovici es el que nos ofrece mayores ventajas no sólo desde el punto de vista técnico, sino que nos permitió observar con mayor nitidez la estructura de las fibras colágenas en tejidos epiteliales, óseos e incluso en materiales como el *Nukbone*; asimismo, permiten identificar dos tipos del tejido colágeno: la fibrosis de tipo reparativa (inmadura) y reactiva (madura). 

Referencias

- Bernales, M., Caride, F., Lewis, A. y Lagens, M. (2004). Membranas de colágeno polimerizado: consideraciones sobre su uso en técnicas de regeneración tisular y ósea guiadas. *Revista Cubana de Investigación Biomédica*, 23(2): 65-74.
- Brady, R. (1979). *La piel*. México: Limusa. 19-20.
- Cordero, A. (1997). *Biología de la piel. Estructura y Funciones*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 48-49.
- Estrada, E., Peralta, L. y Rivas, P. (1984). *Manual de Técnicas Histológicas*. México: AGT Editor. 63-66, 111.
- Geneser, F. (2000). *Histología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 455.
- Herovici, C. (1963). *Stain Technology. Laboratory of pathology III*. France: Institute Gustav Roussy, Villejuif . Vol. 38: 204-205.
- Iglesias, B. y Rodríguez, I. (2001). *Estudio de los tejidos básicos o primarios*. La Habana, Cuba: Departamento de Histología ICBP Victoria de Girón. 15- 16. [versión electrónica]. Recuperado el 15 de junio de 2008 en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/tejidoconectivo1_1.pdf
- Lehninger, A. (1993). *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*. Barcelona: Omega. 137-138.
- León, B. (2001). *Caracterización del pulverizado de hueso de bovino desmineralizado y evaluación de su capacidad regenerativa en piel de ratas*. Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México D.F. 16, 25- 26.
- Levame, M. y Meyer, F. (1987). *Herovici's picropolychromium. Application to the identification of type I and III collagen*. Paris: Pathologie Biologie. 35(8):1183-8.
- Stevens, A. y Steven, J. (2006). *Histología humana*. España: Elsevier. 4- 6.
- Suarez, A., Salgado, R., Apis, A. y Krötzsch, E. (2004). Inducción del tejido de granulación por pasta de Lassar vs Colágena- Polivinilpirrolidona en úlceras por insuficiencia venosa. *Revista de la Asociación Mexicana de Cirugía Plástica, Estética y Reconstructiva, A.C.* 14 (1):5- 13.
- Técnicas de Anatomía Patológica* (2008). Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Anatomía Patológica. [versión electrónica]. Recuperado el 15 marzo de 2008 en <http://www.uam.es/departamentos/medicina/patologia/Tecnicas.htm>
- Tecnología médica, mención morfofisiopatología y citodiagnóstico (2008). Central de Apuntes. *Técnicas Histológicas*. [versión electrónica]. Recuperado el 2 de julio de 2008 en <http://morfoudec.blogspot.com/2008/07/metodologa-de-la-tnica-histologica.html>
- Valadez, A. (1998). Envejecimiento prematuro de la piel: Causas, efectos y tratamiento cosmético. *Revista de Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. México: Universidad Simón Bolívar. p. 10- 11.
- Vasquez, B. y Del Sol, M. (2001). Estudio morfológico de la glándula bulbouretral de conejo (*Oryctolagus cuniculus*). *Rev. chil. anat.* 19 (2): 221-228.