

T.  
611.8  
Ø 83c  
1964  
F. Med.

5 ejemplares

081534

EJ:1

# UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

FACULTAD DE MEDICINA

## CONSIDERACIONES SOBRE LA METACROMASIA DEL TEJIDO NERVIOSO ADULTO NORMAL

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR

CELIA OSORIO DE SALAZAR

PREVIA OPCION AL TITULO DE

DOCTOR EN MEDICINA



DICIEMBRE DE 1964

SAN SALVADOR

REPUBLICA DE EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10123716

U N I V E R S I D A D   D E   E L   S A L V A D O R

RECTOR:

Dr.Fabio Castillo

SECRETARIO GENERAL

Dr.Mario Flores Macall

F A C U L T A D   D E   M E D I C I N A

DECANO:

Dr.Juan José Fernández

SECRETARIO GENERAL

Dr.Alberto Morales Rodríguez

JURADOS QUE PRACTICARON LOS EXAMENES  
DE DOCTORAMIENTO PRIVADO

Primer Doctoramiento Privado

CLINICA QUIRURGICA

Dr. Fernando Alvarado Piza

Dr. Mario Reni Roldán

Dr. Jorge Sánchez Arauz

Segundo Doctoramiento Privado

CLINICA MEDICA

Dr. Luis Edmundo Vásquez

Dra. Adela Cabezas de Allwood

Dr. Guillermo Rivera Palomo

Tercer Doctoramiento Privado

CLINICA OBSTETRICA

Dr. Raul Argüello Escolán

Dr. Tomás Mariano Cáceres

Dr. Armando Vaquerano Nuila

JURADO QUE PRACTICO EL DOCTORAMIENTO  
PUBLICO

Dr. Juan Héctor Berríos

Dr. Manuel Francisco Sigarán

Dr. Ovidio Antonio Duarte.

## A G R A D E C I M I E N T O

Al Departamento de Anatomía  
por las facilidades presta\_  
das para el desarrollo del  
presente trabajo y al Dr.  
Ovidio Antonio Duarte por  
su valiosa orientación.

D E D I C A T O R I A

A MIS PADRES

A MI ESPOSO

A MI HIJA

- I. INTRODUCCION
- II. HISTORIA Y GENERALIDADES
- III. COLORANTES METACROMATICOS
- IV. MATERIAL Y METODO
- V. RESULTADOS
- VI. DISCUSION Y CONCLUSIONES
- VII. RESUMEN
- VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

## I N T R O D U C C I O N

Con el trabajo presente se procura perfeccionar una de las técnicas histoquímicas más sencillas y objetivas empleadas en el estudio del tejido nervioso. De acuerdo con el tiempo de maduración de este tejido y el uso adecuado de los colorantes básicos es posible demostrar cualitativa y cuantitativamente los principales fenómenos de interacción bioquímica que se suceden en el proceso de desarrollo biológico.

Es sabido que cuando ciertos elementos tisulares como el cartílago, se colorean con derivados anílicos como el azul de Toluidina O, el tono azul del colorante en el tejido cambia a otro de tonalidad púrpura o violeta-rojizo. Este cambio de color es lo que se denomina METACROMASIA. Al elemento tisular que provoca el cambio se le denomina CROMOTROPO y al colorante capaz de sustentar tal cambio, colorante o tinte metacromática.

Desde 1875 que se tiene la primera noticia de las coloraciones metacromáticas, se han venido empleando en el estudio las anilinas buscando su purificación para el uso comercial y su aplicación en el desarrollo de la histoquímica en la demostración de las características tintoriales de los varios elementos tisulares. El tejido nervioso es el que menos ha sido empleado en esta clase de observaciones.

Según BERGERON y SINGER, 1958 aparecen con Corvil en 1875 los primeros reportes acerca de los cambios en la tonalidad de los colorantes cuando se emplean en el estudio de las preparaciones histológicas; este mismo autor reconoce la importancia de utilizar colorantes puros, aprecia el efecto de su concentración, observando que la coloración es más estable en el agua que en glicerina. Del mismo año se encuentran los trabajos de Ranvier, Jürgens y de Heschl, quienes realizan observaciones específicas sobre el comportamiento de la sustancia amiloide y el tejido conectivo. Sostenían que los cambios de color dependen de ciertos fenómenos de interacción entre algún sustrato tisular especial y el colorante utilizado.

Ehrlich introduce el término "metacromático", sin darle ninguna explicación particular a su significado propone que la coloración por las tinturas anilínicas se deba a la formación de sales dobles atípicas entre la molécula básica del colorante y ciertos gránulos de los elementos celulares del tejido conectivo y en especial las células cebadas. Observó que ciertos colorantes tiñen "las granulaciones metacromáticas de las células".

Bouma (1883) es uno de los primeros en considerar el aspecto químico de las modificaciones de la coloración. Realizó estudios espectroscópicos sobre la caracterización del color rojo de una dilución de safranina al 1:2000 que colorea de amarillo

el cartílago, concluyendo que el tono amarillento depende de la combinación de la safranina con la condrina presente en la matriz del cartílago. Estas observaciones en dicha época no se evaluaron debidamente y se descontinuaron. Adamkiewicz(1884) introduce el término genérico de "sustancia cromoléptica" para aquellas que colorean metacromáticamente a los tejidos. Paneth (1888) es el primero que habla de "metacromasia" refiriéndola a un fenómeno químico entre el colorante y el tejido. Por este entonces Hoyer(1890) y Hardy(1891) entreven una confusión en la apreciación de las reacciones químicas por la similitud observada entre la tonalidad metacromática y el color de las tinturas en solución alcalina. Observan que el color azul o el rosado de las estructuras teñidas con el azul de metileno se desarrollaban por una alteración química del colorante, sugiriendo que no era más que por acción del álcali.

Pappenheim y Michaelis(1902-1903), continuadores del trabajo de Ehrlich proyectan con más vigor los estudios del maestro, parece ser que Michaelis introdujo los términos de "cromotropo" y "ortocromático". Además interpretó la metacromasia como el fenómeno de la sustancia cromotrópica al reaccionar de una manera intensamente alcalina, sugiriendo que en la constitución química de un tautómero se libera una base imina por el tratamiento del álcali. Cita el ejemplo de que en las tiazinas, un grupo HCl puede migrar del N terminal al central y formar un -

tautómero rojo, dependiendo la coloración metacromática de la selección de dicho tautómero por el cromotrofo.

En las dos décadas siguientes se estudió mucho mejor el fenómeno coloidal del proceso. Ostwald(1910) observa que los cambios de la coloración pueden ser debidos al grado de la dispersión del colorante. Möllendorff (1924) fué quien atrajo la atención de los histólogos hacia el fenómeno coloidal de la reacción tintorial. Según el comportamiento de los colorantes, los agrupó en: (1) de penetración y (2) de precipitación; al primero pertenecen los colorantes básicos y ácidos más corrientes, en el segundo se caracterizan los básicos propiamente dichos. Puesto que estos últimos son los que sustentan las modificaciones en la coloración, la metacromasia expresa la precipitación en superficie de los colorantes básicos .

Pischinger(1926-1927) ataca el concepto de Möllendorff y sostiene que la coloración por los tintes ácidos o básicos dependen de la naturaleza e intensidad de las cargas eléctricas de las proteínas. Sugiere que dicho fenómeno es función del punto isoeléctrico de las proteínas y de la solución ambiente, principalmente el pH; considera que la coloración es debida a las cargas del tejido y a los cambios de dichas cargas. La metacromasia sería debida a la formación de un compuesto de un color intrínsecamente diferente.

Czaja(1930-33) combina el aspecto coloidal con el de base libre. Atribuye la metacromasia a una ionización de las bases libres, suponiendo un fenómeno de capa adsorbente rica en iones hidróxílicos con aniones asociados que luego pasan al exterior elevando el pH. De esta manera la sustancia basofílica podría tener un efecto alcalino sobre los cationes del colorante.

Los conceptos actuales histoquímicos de la metacromasia se basan en los estudios de Lison que datan de 1933, quien describe cuidadosamente los grupos imino-carbinol y las bases amonio de los colorantes, sostiene que todos los colorantes metacromáticos son capaces de formar bases imina y que lo inverso no es necesariamente verdadero. Reafirma que la metacromasia depende de la concentración del colorante, de la temperatura y de que es un fenómeno reversible. Observa que la metacromasia se desarrolla con soluciones bastante diluídas en presencia de pequeñas cantidades de la sustancia cromotrópica y de que dicho color, en estas circunstancias, es reversible con la temperatura y con el alcohol.

Es preciso reportar que el fenómeno básico de la absorción metacromática es el ser invariablemente "isocrómica" ( para corta longitud de onda) y de que es esencial el agua, rechazando el concepto de polímero, puesto que ya es regla de que el cambio de color es debido a la agrupación coloidal es batocrómica (para larga longitud de onda). Rechaza el concepto de Pischinger por la

reversibilidad de la metacromasia. También descarta el concepto del tautómero, puesto que su curva muestra un desplazamiento general mejor que un campo limitado en el espectro. Concluye que la demostración de los cambios de coloración es una prueba específica para la localización de los ésteres sulfato de los polisacáridos de elevado peso molecular. Además para que la metacromasia tenga un valor significativo, deben cumplirse algunas condiciones: la solución acuosa debe ser débil, el pH bajo (alrededor de 3), la temperatura un poco elevada, debe persistir la coloración en un medio no acuoso como la glicerina, jarabe de levulosa, bálsamo del Canadá.

Scheibe (1937-1938) demuestra que los cambios de la coloración en las soluciones acuosas concentradas dependen de la formación de micelios. Bank y Bungerberg de Jong (1939) caracterizan a la metacromasia como el apareamiento de una nueva banda de 550 m  $\mu$  y la ausencia o disminución de las dos bandas características de una solución acuosa débil de azul de Toluidina; interpretan la metacromasia como el resultado de la electroadsorción del colorante a los sitios inorgánicos del biceluloide negativo. Robinowitch y Epstein (1941) interpretan los estudios cuantitativos del comportamiento del azul de metileno y la timina en soluciones alcohólicas y acuosa, sostenidos por la hipótesis dimérica y la agrupación bajo las fuerzas de Van der Waal complementadas por las fuerzas Heitler-London, de acuerdo a es

tas fuerzas han calculado una distancia equilibrio de  $3.12 \text{ \AA}$ . Shippard y Goddes(1944) explican las dificultades para aceptar la hipótesis dinérmica, pero no pueden sostener una mejor para demostrar los efectos de la dilución.

Syiven(1941) había conseguido una técnica rápida para determinar la "metacromasia falsa" empleando soluciones alcohólicas más concentradas y una deshidratación en alcohol durante un tiempo arbitrario. Por este mismo tiempo se reportó que normalmente las sustancias no cromotrópicas (secreción mucosa, glicógeno, almidón), podría colorearse metacromáticamente después de tratarles con ácidos fuertes y sostuvieron que la metacromasia "negativa y positiva" se desarrollaba en condiciones apropiadas de coloración.

Flax y Himer(1952) estudiaron las diferencias tintóreas de los dos tipos de ácido nucleico y determinaron que el RNA se tiñe más metacromáticamente que el DNA; esta diferencia se atribuyó a las diferencias en la densidad de los grupos fosfato considerados.

La mezcla en proporción baja del colorante con el ácido nucleico era de tonalidad verde, lo mismo ocurría cuando se teñía debilmente el núcleo, calentando la solución se revertía el color al azul ortocromático. A este fenómeno le llamaron "metacromasia negativa" para diferenciarla de la "metacromasia positiva" (cambio del color hipsocromico). También explican el término "semi metacromático" ya citado por Möllendorf(1924), para -

aquellas sustancias que como el ácido nucléico muestran una metacromasia positiva bajo ciertas condiciones óptimas, distintas a las requeridas por los ésteres sulfátidos que la desarrollan con mucha rapidez.

LANE-SMEER(1951) utilizó el efecto de los cationes en la metacromasia como medio para determinar si la tinción con un colorante básico es debida a los grupos de carboxilo, sulfato o fosfato. SILVER(1954) ha expresado el concepto de que la metacromasia se desarrolla en un enlace ordenado del colorante con una serie repetida de sitios aniónicos, el efecto del cambio de color lo explica por la formación de nuevos puentes intermoleculares que requieren un gasto energético de cerca de 8 calorías y una mínima distancia de intercargas de aproximadamente  $5 \text{ \AA}$ . Recalca la importancia del agua y de que el comportamiento del colorante se favorece si las moléculas presentan partes hidrofílicas e hidrofóbicas.

BERGERON y SINGER(1958) confirman experimentalmente que la metacromasia se desarrolla con base a la distribución de los sitios de enlace del colorante, que la destrucción del color es lo característico del fenómeno y que las moléculas de agua entre los iones del colorante son las responsables de los cambios y pérdida de la coloración.

Con AUSTIN(1947) se inicia una serie de experiencias importantes que por medio del estudio de la metacromasia del tejido nervioso, brindan un excelente medio laboratorial para diagnós

tico en vida de un grupo específico de procesos degenerativos - del sistema nervioso. Desde 1910 Alzheimer y Nissl demostraron la presencia de sustancias metacromáticas en la sustancia blanca de los casos de esclerosis difusa (material de autopsia). En 1925 Scholz establece las bases genéticas de ese proceso familiar desarrollando aún más el concepto patológico de la metacromasia encontrada en el tejido degenerado. Posteriormente se introduce a la literatura médica el término de leucodistrofia Metacromática, grupo específico de esclerosis difusa; a ella están ligados los nombres de Kaltenbach, Bielchowsky, Henneberg, van Bogaert, Greenfield, Brain, White y otros. El resultado de estos estudios ha ampliado considerablemente el campo de estudio de la metacromasia y especialmente su comportamiento a lo largo del desarrollo biológico del tejido nervioso.

Se han desarrollado técnicas específicas para la demostración de las sustancias metacromáticas en el parénquima del tejido nervioso y otros órganos sistémicos, así como en el sedimento de los líquidos biológicos (AUSTIN, 1957-1959; GREENFIELD, 1958; CUMMINGS, 1960; FOLCHI-PI y BAUER, 1963). Con las técnicas de cromatografía, electroforesis y espectrografía ha sido posible determinar la naturaleza química de ese material metacromático. Se trata de los ésteres sulfúricos de cerebrósidos en mezclas complejas con los polisacáridos (SVENNERHOLM, 1959; HAGBERG y SVENNERHOLM, 1960; CUMMINGS, 1960. FOLCHI-PI y BAUER, 1963; CANELAS y Col., 1963, 1964).

Los últimos trabajos han demostrado que los cambios de tonalidad en la metacromasia, determinan en la degeneración del tejido nervioso la presencia de sustancias metacromáticas en varias fases de reacción bioquímica, pudiendo realizarse un esquema entre el grado de desarrollo de la degeneración tisular y el correspondiente producto metacromático encontrado (DUARTE-ESCALANTE y Col. 1964).

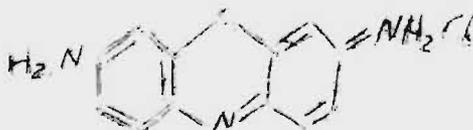
COLORANTES METACROMATICOS

La tinción de un tejido por un colorante ácido o básico, sobre todo la unión de éste a la proteína, está determinada específicamente por la concentración de los iones hidrógeno y la temperatura del reactivo, las propiedades del colorante y del tejido considerado, la naturaleza de la asociación entre el colorante y el sustrato y el producto de fijación o preparación del tejido.

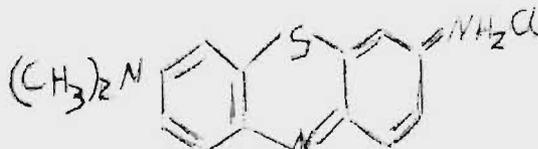
En histoquímica se emplean algunos métodos de tinción selectiva con colorantes básicos (verde de metilo, pironina, azul de metileno, galocianina, etc.), para el estudio de los ácidos nucleicos. Colorantes metacromáticos para los mucopolisacáridos (CASSELMAN, 1962; FOLCHI-PI y BAUER, 1963; GOMORI, 1952; LILLIE, 1954; LISON, 1953; PEARSE, 1960).

Los colorantes metacromáticos más conocidos son:

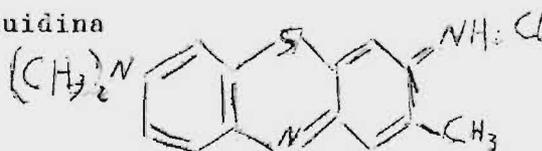
Tionina



Azur A



Azul de Toluidina



En todos los colorantes orgánicos el color va asociado a un grupo especial de átomos llamado grupo cromofórico; éste es una secuencia de átomos con una alteración ininterrumpida de ligaduras dobles y sencillas; la secuencia puede ser una cadena abierta o ramificada o puede seguirse de un ovillo. Al final de estos sistemas puede haber átomos de nitrógeno que pueden ligarse de manera simple o doble. En tal grupo cromofórico la estructura puede representarse en varias formas, difiriendo tan sólo en la posición de los enlaces sencillos o dobles. Este es el denominado sistema de resonancia. No todos los electrones de la molécula pueden cambiar su posición estructural, solamente lo hace una pareja por cada enlace doble; éstos son los electrones más abiertamente implicados en este fenómeno, siendo denominados como electrones  $\pi$ . El cambio que estos electrones experimentan para aquellos niveles de energía bastante intensa, se debe a la absorción de la energía radiante de las ondas de larga longitud siendo ellas las responsables del desarrollo del color en las moléculas del colorante (SYLVEN, 1954; SCHUBERT y HALBERMAN, 1956; SCHUBERT y LEVINE, 1955; CARNES y FORKER, 1956; CASSELMAN, 1962).

Una de las propiedades más importantes de los colorantes meta-cromáticos es el estado del coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ - $\lambda$ ) que es constante e independiente de la concentración de la solución de la sustancia de una longitud de onda determinada ( $\lambda$ ). Por ejemplo, si la cantidad de la sustancia en estudio es  $D$ , la densidad óptica se ecuaciona así:

$$Dl = \epsilon cl$$

donde  $c$  es la concentración molar de la sustancia y  $l$  es la longitud en  $cm$  del paso de la luz al través de la solución, donde tiene lugar la absorción de la energía radiante. Dos postulados se derivan;  $\epsilon l$ , es una constante independiente de la concentración, y  $Dl$  es directamente proporcional a la concentración (SYLVEN, 1954; SCHUBERT y HAMERMAN, 1956).

Se ha observado que cuando la concentración del colorante aumenta, el nivel de absorción del espectro visible parece cambiar para las ondas de corta longitud; este cambio se ha encontrado que no es gradual, sino progresivo y en relación a la altura de dos bandas cercanas entre sí y que poseen una longitud de onda fija. También se ha observado que aunque las soluciones acuosas de muchos colorantes sustenten dichos cambios, las soluciones alcohólicas de los mismos colorantes los experimentan en poca intensidad o no realizan ningún cambio en la absorción del espectro.

Todos los colorantes catiónicos muestran alguna variación en la extinción del coeficiente en algunas longitudes de onda en algunos niveles de concentración; las longitudes de onda generalmente son del espectro visible, pero también pertenecen al campo ultravioleta.

Las bandas alfa, beta y gamma (de longitud de onda A, B, G) representan respectivamente las formas monomérica, dimérica y polimérica del colorante catiónico y cada valor de una banda es la medida de la concentración de la correspondiente especie molecular (SCHUBERT y HAMERMAN, 1962).

El cromotropo es una sustancia que puede inducir el color meta cromático en un colorante capaz de sustentar este cambio de co lor. Todos los cromotropos conocidos son aniónicos, o de carga negativa, en solución acuosa, de alto peso molecular, o si son de bajo peso molecular que sean capaces de asociarse para formar - compuestos de peso molecular elevado. Entre los productos ani\_ males están la heparina, el condroitin sulfato, el hialuronato y los nucleatos. Entre los productos vegetales: el agar y el al\_ ginato; entre las sustancias inorgánicas: los silicatos y los - polifosfatos; entre los productos sintéticos: el sulfato de qui\_ tina, la carboximetilcelulosa, el sulfato-alginato, el sulfato de pectina y los poliacrilatos.

El jabón y los detergentes sintéticos aniónicos son ejemplo de cromotropos de bajo peso molecular (SCHUBERT y HAMERMAN, 1956; GEMORI, 1952; PEARSE, 1960; CASSELMAN, 1962).

#### COLORACION METACROMATICA EN LOS TEJIDOS

La mayoría de los estudios se realiza en tejidos tratados con determinados fijadores químicos y luego seccionados; o bien fi\_ jados, luego congelados y cortados; con esta última técnica se ha logrado conservar la estructura tisular casi al estado natu\_ ral. El alcohol, la formalina o sales de metales pesados, solos o en mezcla, son los fijadores químicos más corrientemente uti\_ lizados para la desnaturalización y precipitación del material

rico en polisacáridos y proteínas; la formalina reacciona con las proteínas, pudiendo fijar a cualquier polisacárido ligado a ellas; al alcohol generalmente precipita a los mucopolisacáridos, pudiendo ser también el mejor precipitante de las mucoproteínas: Las sales de metales pesados pueden precipitar tanto a los polisacáridos como a las proteínas, especialmente en presencia del alcohol (SCRUBERT y HAMERMAN, 1956; GOMORI, 1962; PEARSE, 1960).

Los colorantes metacromáticos más regularmente empleados en las preparaciones tisulares son del tipo catiónico, en solución acuosa del 1% al 0.5%, ó alcohólica débil al 0.1 ó 0.001%, con un pH de 3 a 5 y tampones formados por mezclas de ácido cítrico y fosfato de sodio, ácido tartárico, acetato o el tartrato ácido-potasio. Como ejemplo de colorantes metacromáticos están: Azul de Toluidina O, Tionina, Azul de Metileno, Azur A y B, Cristal Violeta, Violeta de Cresilo, Galocianina.

Casi todos los reportes concuerdan en que el azul de metileno es el prototipo de los colorantes no metacromáticos y que el cambio metacromático que pueda exhibir se debe a su contaminación con alguno de los Azules.

Corrientemente se deshidrata a las preparaciones histológicas después de colorearlas, este paso representa la mayor dificultad en la preservación de la metacromasia. El paso del corte por el etanol favorece la remoción del agua, provocando que el colorante se revierta a su color ortocromático; y en el momento de sellar-

la preparación el colorante se difunde en el medio de montaje decolorando la preparación histológica, por lo que se ha sugerido el hacer la deshidratación final en acetona en vez de alcohol absoluto con miras a conservar la metacromasia y obtener preparaciones más permanentes y también usar para este mismo fin soluciones acuosas para su montaje como jarabe de apatay, aceite de cedro, resinas sintéticas como clarita, picolita en tolueno.

En los estudios clásicos de LISON se concluye que la reacción metacromática es una propiedad exclusiva de los ésteres del ácido sulfúrico de elevado peso molecular, que la reacción es específica solamente si se lleva a cabo bajo condiciones desfavorables al desarrollo del color metacromático.

Estos conceptos han sido criticados por Wiame (1946-1947), quien ha demostrado en trabajos in vitro, que los ácidos nucleicos y el hexametáfosfato de sodio pueden producir la reacción metacromática, también Michaelis ha producido la reacción con el fosfato de amonio, oleato de sodio y la carboximetilcelulosa de sodio, así como en una gran variedad de alcoholes sulfatados y otros altamente sulfonados; este último demuestra que la reacción puede obtenerse con todos aquellos detergentes que poseen una cadena larga de hidrocarburos con un grupo amoniacal al final, ya sea carboxilo, sulfato o sulfonato. Por lo tanto no es correcto afirmar de que una sustancia reaccionará metacromáticamente siempre que sea o contenga un éster sulfúrico de elevado peso

molecular. En la práctica histológica, los mucopolisacáridos sulfatados son las sustancias que más importantemente desarrollan la metacromasia (LISON, 1953; KRAMER y WINDRUM, 1954; SCHUBERT y HAMERMAN, 1956; BERGERON y SINGER, 1958; PEARSE, 1960; CASSELMAN, 1960). Por el análisis químico se ha probado que en la reacción metacromática de los tejidos participa una cantidad variable - de hialuronatos (del 1 al 2 ó 5%), este grupo es uno de los cromotropos más débiles. Se ha descrito un sustrato metacromático en el tejido nervioso normal, atribuyéndose esto a la presencia de ésteres de fosfato, o a los grupos de ésteres de sulfato; algunos solamente han reportado el hallazgo de pocos gránulos metacromáticos en el citoplasma de los cuerpos neuronales (WISLOCKI y SINGER, 1950; LANDSMEGEER, 1951; HESS, 1953; BOOIJ y Col., 1958).

Numerosas sustancias no cromotrópicas pueden influenciar en la coloración metacromática de los tejidos. Con LANDSMEER (1951), se ha demostrado el efecto inhibitorio de las sales catiónicas en la tinción de las células cebadas. Las elevadas concentraciones de los cromotropos pueden inhibir la metacromasia en los cationes con los grupos aniónicos. Uno de los efectos inhibitorios más importantes, es el de la proteína, la albúmina y la gelatina en concentraciones de 1 mg. por ml. inhibe la metacromasia del hialuronato en una solución débil del colorante ( $10^{-5}M$ ).

La proteína inhibe la metacromasia del azul de Toluidina y la de la solución de heparina cuando se agrega la tripsina. Este fenómeno podría interpretarse como un cambio del catión po

livalente que posee un efecto inhibitorio sobre la metacromasia de un grupo numeroso de cationes de valencia baja que podrían tener un efecto inhibitorio.

## MATERIALES Y METODO

El material sometido al estudio histoquímico es: cerebro, cerebelo, tallo encefálico, médula espinal y nervio periférico del humano y algunos animales de laboratorio (ratón, conejo, gato, perro, perico). Las piezas se dividieron en tres grupos de preparación (1) fijación en formalina al 10% con inclusión en parafina; (2) fijación en formalina al 10% y congelación y (3) congelación del material al fresco. Los colorantes empleados: Azul de Toluidina O de la G. Güber y Co. (Leipzig) y Violeta de Cresilo de Allied Chemical & Dye Corporation (New York), en soluciones acuosas entre el 2 y 0,5%. Como vehículos de clarificación se usó el alcohol absoluto, la acetona, el xilol, y como medio de montaje: aceite de cedro, bálsamo del Canadá, permount y glicerina.

El espesor de los cortes preparados osciló entre 5 a 10 micras, El tiempo de coloración varió de uno a cinco minutos hasta una y tres horas. Cuando las piezas resultaron ser más gruesas y más intensamente coloreadas, fueron clarificados con dos o tres pasos en alcohol absoluto o acetona.

## R E S U L T A D O S

La reacción metacromática se desarrolló, como se esperaba, con algunas diferencias en las preparaciones congeladas en estado fresco de las previamente fijadas en formalina y luego incluidas en parafina. Con la congelación al fresco se procuró con

servar al máximo el estado natural de la estructura tisular y la menor dilución de las grasas en el alcohol, para conservar en su mayor integridad las vainas de mielina principalmente en aquel material que no estaba completamente mielinizado. No obstante - los hallazgos revelan una metacromasia que oscila del color rosado pálido al rojo amarillento, correspondiendo a aquellas áreas de desmielinización o a aquellos productos metacromáticos de desmielinización reportados por algunos autores.

La coloración no es permanente, la tonalidad metacromática - ha sido más prolongada en el tejido fresco que en el previamente fijado, más en el tejido animal adulto que en el de joven, un poco más sostenida en las preparaciones teñidas con el Azul de Toluidina que con el Violeta de Cresilo, y más sostenida en cortes de parafina cuando fueron montados en aceite de cedro. Esta reversibilidad también ha variado con el tipo de deshidratación y el montaje empleado; siendo más permanente cuando se ha utilizado la acetona. Es recomendable por este motivo, guardar las preparaciones bien selladas y al abrigo de la luz.

Con el empleo de los alcoholes para la deshidratación, se ha observado que en las preparaciones desaparece abundante cantidad de material metacromático teñido de rosado o rojo púrpura que correspondería a los componentes amiloides y hialurónicos (SYLVEN y MALMGREM, 1952; LEVINE y SCHUBERT, 1952; CARNES y FORKES 1956, CANELAS y Col., 1963; CUMMINGS, 1960; BAKER y NELSON, 1959; GREENFIELD, 1958; WEIL, 1945).

CORTES HISTOLOGICOS

Cerebro de perico joven, inclusión en parafina. Tinción: Azul de Toluidina 0 al 5%.

Trama reticular de tonalidad rojo púrpura con magnífica diferenciación de todos los estratos fibrosos. Neuronas bien individualizadas, con una tonalidad más oscura y en el citoplasma la disposición de un componente granular fino de color amarillo rojizo, de características birrefringentes. La neuroglia bien definida; completa individualización de la oligodendroglia y astroglia y el componente de sus prolongaciones.

Violeta de Cresilo al 5%:

La metacromasia amarillo rojiza se evidencia con más intensidad en la trama reticular y prolongaciones fibrosas; las neuronas se oscurecen y se arrugan cuando la concentración del colorante es de 1% y el tiempo de exposición pasa de los 30 minutos. La neuroglia presenta los mismos detalles bien diferenciados.

Médula espinal de gato. Tinción: Azul de Toluidina 0 al 5%.

En el corte transversal es perfectamente diferenciable la trama reticular de la sustancia gris y la blanca. La metacromasia del tejido es rojizo púrpura, variando la tonalidad para el amarillo rojizo en las áreas donde la mielinización no se ha completado. Es notable la birrefringen

cia de las fibras bien coloreadas, pudiendo seguirse en una larga extensión. Los trayectos fibrosos de las comisuras blanca y gris son perfectamente diferenciables en manojos que se entrelazan en superficie y profundidad. Estos manojos con un tiempo de coloración de 30 minutos a una hora, cambia la tonalidad a un violeta-azulado que a mayor aumento x 400, da un aspecto de fajas calcinadas con la metacromasia rojiza de los gránulos finos birrefringentes a lo largo de todo el componente fibrilar.

Las motoneuronas bien diferenciadas con todas sus prolongaciones con múltiples colaterales, presentando los mismos cambios de tonalidad ya expresados. La neuroglia con sus elementos celulares de citoplasma vacuolar rojizo-amarillento y núcleo también vacuolado cargado de gránulos finos más oscuros.

#### Violeta de Cresilo al 5%

Los detalles microscópicos son tan diferenciados como con el Azul de Toluidina, la tonalidad de las granulaciones finas es más oscura hacia el rojo en las áreas de metacromasia más intensa y cuando lo es menos hacia el amarillo o rojizo.

#### Cerebro Humano. Tinción con Azul de Toluidina 0 al 0.5%.

La estructura fibrilar está notablemente diferenciada sin las características tintoriales descritas en los tejidos

ya señalados. Se observa que la metacromasia es más firme en los tejidos de mielinización completa; la tonalidad es de un rojizo púrpura más oscuro, con birrefringencia de los gránulos finos más evidente, mejor definida hasta en las prolongaciones más distantes y finas. Los cuerpos neuronales bien delineados en su morfología protoplasmática; la granulación fina metacromática se observa bien completa y enlazada con la estructuración granular de todas sus prolongaciones. El núcleo vacuolar con una granulación más gruesa y de tonalidad azul violeta más oscura. La neuroglia bien diferenciada, con una metacromasia rojiza-amarillenta más encendida, de birrefringencia evidente. El componente global deja observar un campo fibroso bien delineado y los cuerpos celulares ordenados en los diferentes estratos que definen la citoarquitectura de las regiones corticales.

#### Violeta de Cresilo al 0.5%

Se observan los detalles microscópicos con una tonalidad metacromática más intensa rojo amarillenta, así también se destaca mejor la birrefringencia de la granulación fina citoplásmica de las neuronas y elementos neuróglícos. Es interesante la observación de que en las preparaciones al fresco la coloración metacromática se desarrolla bien con todos los detalles microscópicos señalados, más en bre

ve (pocas horas, de 1 a 5), la estabilidad de su presencia, pues decolora con mayor rapidez que aquellas otras previamente fijadas y después cortadas en congelación, y las fijadas e incluidas en parafina. Además la coloración es magnífica para el estudio de la trama fibrilar y las relaciones morfológicas de la neuroglia con las neuronas, como de la neuroglia con los elementos vasculares; así - también el aspecto de la composición bioquímica de los elementos intracelulares e intranucleares; desde este punto de vista, es importante señalar la elevada concentración de sustancia mucopolisacáridas en las prolongaciones protoplásmicas neuronales y neuróglícas; de carbohidratos y lípidos en el citoplasma de los mismos elementos. Esto puede observarse de acuerdo a la intensidad de la coloración metacromática; estos componentes bioquímicos se encuentran más abundantes en la sustancia gris de la corteza cerebral y cerebelosa, luego en la médula y núcleos diencefálicos y luego en el tejido fibroso de los hemisferios cerebrales, tallo encefálico, cerebelo, tractos medulares y nervios periféricos (WISLOCKI y SINGER, 1950; LANDSMEER, 1951; BOOIJ y Col., 1953; HESS, 1953).

Observaciones bastante similares en el comportamiento de los colorantes Azul de Toluidina y Violeta de Cresilo en estudios realizados sobre tejidos animales para destacar

la infiltración de bacterias y hongos y en otros con aplicaciones en microscopía electrónica, en donde se evidencia con detalle el aspecto granular que el colorante básico adopta en disposición intracitoplasmática (PUCHTLER y SWEAT 1964; CHANDRA y SKELTON, 1964).

## DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El fenómeno de la coloración metacromática depende de la intensidad de las cargas electronegativas del agrupamiento cromotrópico y de la orientación de las moléculas del colorante cuya determinación también depende de la distribución de las -cargas ya dichas. Para el desarrollo de la reacción es necesaria que la distancia entre los aniones oscile alrededor de -5 Å, y la intensidad aumenta cuando disminuye esta distancia. La reacción del colorante con el cromotropo es particularmente sensible a la acción de las sales y de las proteínas; si el producto coloreado está presente en una concentración muy baja, las sales agregadas en una concentración elevada, pueden inhibir -casi completamente la metacromasia de aquel. La inhibición debida a los cationes de la sal aumenta en razón directa a su -valencia y probablemente, dependa de una competición entre los cationes del colorante y de la sal en los sitios aniónicos del cromotropo.

Las proteínas pueden actuar de tres maneras: por acción competitiva, como los cationes inorgánicos formando ligaduras de valencia con los grupos aniónicos, o reaccionando con los polilisacáridos bloqueando sus grupos aniónicos por adaptación esteárica. Así se ha demostrado que la metacromasia del ácido hialurónico es más sensible a la inhibición de las proteínas que a la de los mucopolisacáridos (KRAMER y WINDRUM, 1954; SCHUBERT y HAMERMAN, 1956; CASSELMAN, 1962).

La persistencia de la metacromasia en tejidos deshidratados con alcohol, es una evidencia específica de los ésteres sulfúricos polisacáridos de elevado peso molecular (metacromasia "verdadera"; siendo que el alcohol destruye la "falsa" metacromasia dada posiblemente por los cromotropos libres de sulfato. En PEARSE 1960 se ha empleado una definición espectrográfica para sustentar un criterio visual de la coloración histológica; éste sostiene que la metacromasia roja o ( $\gamma$ ), relativamente resistente al alcohol, es debido a los ésteres sulfúricos, mientras que la metacromasia violeta ( $\beta$ ), de menor resistencia al alcohol, es debido a carbohidratos altamente polimerizados o a compuestos mixtos conteniendo fosfatos. Estos conceptos se corresponden al criterio de algunos autores recientes (FOLCHI-PI y BAUER, 1963-1964).

El control del pH en el trabajo histológico con los colorantes utilizados, es necesario e importante que oscile alrededor de 3 a 4, pues con estas características se obtienen los mejores resultados del fenómeno metacromático (SINGER, 1952; KRAMER y WINDRUM, 1954-1955; BERGERON y SINGER, 1958).

El grado de coloración de las preparaciones histológicas, varía de acuerdo a la acidez de la solución colorante; este fenómeno se debe principalmente, a la disociación característica de las proteínas por la alteración del medio en solución.

El hecho primordial es, que las proteínas en solución se comportan del modo anfotérico, es decir, que conteniendo a la vez

grupos ácidos y básicos por la disociación de las moléculas proteícas puedan dar aumento de las cargas negativas o positivas según sea el grupo ácido o básico respectivamente, el más concentrado después de la disociación. La capacidad de las proteínas para tomar un colorante ácido o básico, de acuerdo a la acidez de la solución, es una característica de las propiedades anfotéricas y de la carga de los iones del colorante. Los colorantes básicos generalmente son sales de cloruro de una base colorante, mientras que los ácidos generalmente son sales de sodio de un ácido colorante (LANDSMEER, 1951; SINGER, 1952; KLAMER y WINDRUM, 1954 1955). Las experiencias se han desarrollado con el Azul de Tolidina 0 y Cresil Violeta en soluciones cuyo pH ha oscilado entre 3 y 4, observándose que los resultados de la metacromasia del tejido nervioso, siguen el mismo orden de los trabajos de otros autores.

La atracción del colorante por las proteínas particularmente efectiva por las fuerzas electrostáticas que actúan, proporcionalmente, sobre grandes distancias. La consideración del punto eléctrico es otro aspecto condicional para la reacción colorante que deban desarrollar los cromotropos bajo la influencia de la solución tintorial. El punto isoeléctrico se define como la concentración de iones hidrógeno, por la cual existe un equilibrio en la retención de cationes y aniones. El punto crítico del enlace de las curvas del pH de los colorantes básicos y ácidos

como el nivel mínimo de absorción de los mismos, es el criterio utilizado en la condición del punto isoelectrico en el estudio histoquímico de las células y tejidos (SINGER, 1952; LISON, 1953; KLAMER y WINDRUM, 1954-1955; BERGERON y SINGER, 1958).

Es del conocimiento general que la diferencia en la intensidad de la coloración de los tejidos depende de la condición bioquímica de los componentes tisulares como, también de la concentración de la solución colorante; se ha demostrado en experiencias referidas por SINGER (1952), que la facilidad de multiplicar los enlaces del colorante con el cromotrofo, se aumentan con la concentración de la solución tintorial. A este respecto, el tejido nervioso manifiesta considerable avidez por el colorante en elevada concentración, así también por el colorante en baja concentración cuando se expone por largo tiempo.

Por afinidad se trata de expresar la tendencia de un colorante a combinarse con una estructura tisular determinada; en este fenómeno existe cierta especificidad de tinción entre determinados colorantes y las estructuras celulares, la mayoría de los autores se refieren a esta condición con el nombre de "afinidad específica". En la metacromasia del tejido nervioso no puede hablarse de afinidad específica del colorante, pues el fenómeno se desarrolla de acuerdo a la composición química del cromotrofo, las condiciones tisulares del material en estudio, el pH del ambiente, etc., aunque estos factores determinan cierta

mente una verdadera "afinidad química específica" para poder manifestarse en las varias tonalidades metacromáticas conocidas.

La preparación de los cortes histológicos por medio de las sustancias fijadoras influencia importantemente el desarrollo del fenómeno metacromático. La célula viva presenta una afinidad selectiva para algunos colorantes, siendo este fenómeno una actividad vital intrínseca del elemento celular. Los fijadores corrientemente utilizados (alcohol, formol, líquido de Zenker, etc.) desnaturalizan los compuestos protéicos, precipitan las proteínas, barren los lípidos, sueltan las cadenas de polisacáridos y lípidos, etc., con lo que se altera la estructura íntima del tejido en estudio. Este hecho es importante de omitirse cuando se necesita estudiar la condición más o menos al natural de los compuestos enzimáticos aislados o en reacción con los compuestos protéicos, carbohidratos y lípidos. Esta es la situación del estudio del fenómeno metacromático, sobre todo cuando el material en preparación es patológico, pues en estas circunstancias, existen algunos compuestos anormales (productos degenerados de los componentes básicos) que revelan su presencia por una metacromasia específica (WEIL, 1955; BAKER y NELSON, 1959; GREENFIELD, 1958; HAGBER y SVENNERHOLM, 1960; SVENNERHOLM, 1959; FOLCHI-PI y BAUER, 1963; LILLIE, 1954; CUMINGS, 1960; CANELAS y Col., 1963; DUARTE-ESCALANTE y Col., 1964; HESS, 1953; WISLOCKI y SINGER, 1950).

La temperatura de la solución colorante de varias maneras - ejerce su influencia sobre el desarrollo del fenómeno de la co

loración; una de las principales es en la difusión o movimiento de las moléculas del colorante hacia los componentes tisulares; con el aumento de la temperatura disminuye la facilidad de multiplicación de las moléculas del colorante. En este aspecto - las preparaciones realizadas se trabajan manteniendo la solución colorante a la temperatura ambiente. Los cortes histológicos congelados se secaron sobre una lámina de vidrio y después eran sometidas a la acción del colorante. Los cortes histológicos en frío se colorean más intensamente, favoreciéndose una deformación en la estructura por la saturación del colorante (esto se ha observado en el material al fresco como en el material fijado cuando se hacen secciones por congelación). Los cortes a una temperatura de 30 a 37<sup>0</sup>, absorben muy debilmente el colorante y lo sueltan con facilidad provocando el aumento de la difusión del colorante sobre y entre los componentes tisulares, con lo que en la preparación se desarrollan campos manchados y borrosos (SINGER, 1952 ; KRAMER y WINDRUM, 1954-1955; BERGERON y SINGER, 1958; LISON, 1953).

La reversibilidad de la reacción metacromática es un hecho observado por todos los autores, particularmente se ha demostrado que la metacromasia con el Violeta de Cresilo se revierte más rápidamente que la del Azul de Toluidina, y la de éste es un poco más permanente (varios días), cuando las preparaciones se tratan con xilol y se montan en aceite de cedro. Indudablemente en este fenómeno están presentes las condiciones del

pH, el cambio de la concentración del colorante dentro del componente tisular, influyendo la cantidad de enlaces del colorante, las cargas aniónicas y catiónicas, como también la labilidad de la solución colorante a los cambios de la temperatura ambiente (SINGER, 1952; SYLVEN, 1954; SCHUBERT y LEVINE, 1955; KRAMER y WINDRUM, 1954-1955; BERGERON y SINGER, 1958).

Concordando en muchos aspectos con las consideraciones de SCHUBERT y HAMERMAN (1956), la metacromasia es un fenómeno que detecta aquellas sustancias de elevado peso molecular, conteniendo numerosos grupos aniónicos libres; estas sustancias incluyen a los mucopolisacáridos aniónicos y ácidos nucleicos de elevado peso molecular y algunos lípidos aniónicos capaces de polimerizarse en núcleos de elevado peso molecular. Las sales catiónicas manifiestan un efecto inhibitorio de la metacromasia, probablemente por reemplazamiento en los mismos grupos aniónicos del cromotopo; esta condición puede salvarse si la preparación histológica se lava abundantemente para barrer las sales, o si se emplean soluciones moderadamente concentradas del colorante (los resultados que ahora se reportan se han logrado con concentraciones del 0.5%).



Fig.No.1-A

Cerebro Humano. Motoneurona y células neuróglícas vecinas mostrando la reacción metacromática por los depósitos citoplasmáticos de los ésteres sulfúricos enlazados a los polisacáridos y lípidos de su composición. Obsérvese la granulación fina bi refringente intracelular (compuesto lipoprotéico), la diferencia de coloración.

Colorante Violeta de Cresilo. Aumento x 1000 (inmersión)

Filtro Verde



Fig.No.1-B

Filtro Azul

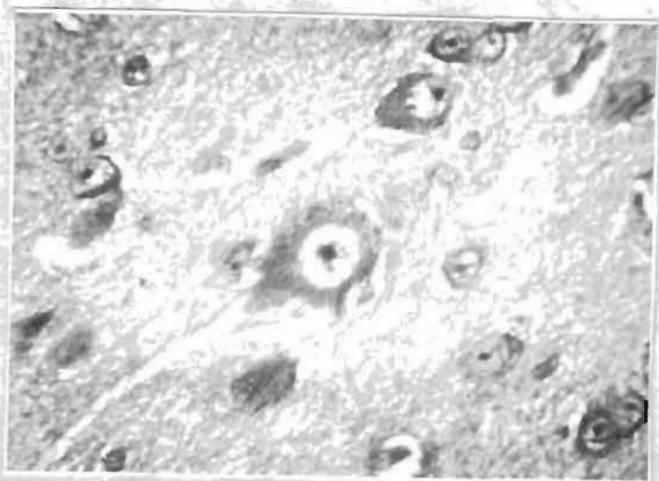


Fig.No.2

Cerebro de gato. Neurona de los ganglios basales con sus células de sostén. La trama fibrosa muestra buen contraste con el colorante. Las células gliales son diferenciables.

Colorante: Azul de Toluidina  
Sol. al 0.5%. Aumento x 320.

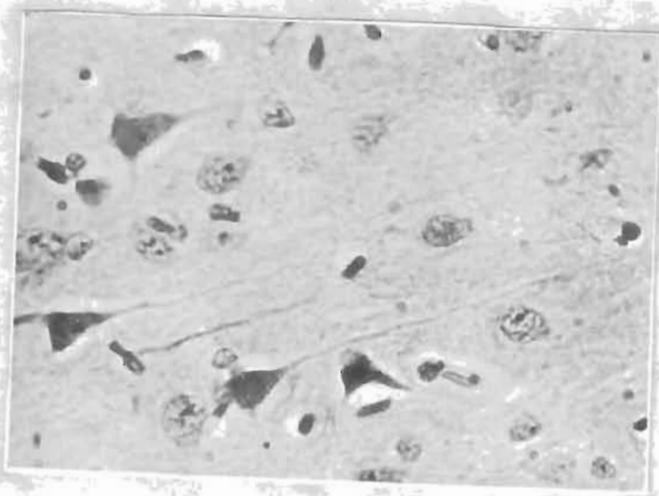


Fig.No.3

Cerebro de gato. Motoneuronas con sus prolongaciones axónicas. Células intersticiales muy evidentes.

Colorante: Azul de Toluidina.  
Sol. al 0.5%. Aumento x 100

R E S U M E N

Con este trabajo se presenta una revisión del concepto teórico y de laboratorio de la metacromasia, aplicándose al estudio de este fenómeno tintorial en una serie de experiencias realizadas con tejido nervioso humano (cerebro y cerebelo), y de animales de laboratorio.

El material fué repartido en tres grupos: (1) fijado en formalina al 10% e incluido en parafina (2) fijado en formalina al 10% y cortado por congelación y (3) material fresco en secciones por congelación.

Las secciones fueron coloreadas unas en Azul de Toluidina O y otras con Violeta de Cresilo, variando el tiempo de exposición entre un minuto y tres horas. Se obtuvo la esperada metacromasia que no fué reversible al alcohol, pero que desapareció en pocas horas en el material fresco. Ella fué más evidente en las neuronas, las cuales demostraron en su citoplasma un aspecto granular birrefringente y el núcleo de aspecto vacuolado con fondo metacromático. La exposición prolongada es útil para observar el aspecto fibrilar de la sustancia gris, pero principalmente de la sustancia blanca ya que las células presentan en esas condiciones un aspecto arrugado y sin ningún detalle.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AUSTIN, J.H. Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis  
Diagnosis during life by urine sediment  
examination. Neurology, 7:415-426, 1957.
2. AUSTIN, J.H. Metachromatic form of diffuse cerebral sclerosis  
during life by isolation of metachromatic lipids  
from urine. Neurology, 7:716-723, 1957.
3. AUSTIN, J.H. Metachromatic sulfatides in cerebral white matter  
and kidney. Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.), 100:361-364  
1959.
4. BAKER, A.B. and NELSON, E. An outline of Neuropathology.  
W.M.C. Brown Book Co. Dubuque, Iowa, pp.197, 1959
5. BERGERON, J.A. and SINGER, M. Metachromasy: An Experimental  
and Theoretical Reevaluation. J. Biophys. Biochem.  
Cytol. 4:433-457, 1958.
6. BOOIJ, H.L., DEIERKAUF, F.A. and HEGNAUER-VEGELENZAG, M.  
Colloid chemical aspects of metachromasia. II  
Metachromatic staining of lipid fractions from  
beef brains. Acta. Physiol. Pharmacol. Neurol. 3:  
113-125, 1958.
7. CANELAS, H.M., DUARTE-ESCALANTE, O.A.; IRIYA, K. y De JORGE, F.B.  
Leucodistrofia Metacromática. Estudio Clínico  
laboratorial de cinco casos na mesma familia. Rev.  
Paul. Med., 63:355-376, 1963.

8. CANELAS, H.M., DUARTE-ESCALANTE, O.A.; IRIYA, K. y De JORGE, F.B.  
The Diagnosis of Metachromatic Leucodystrophy during life. (Metachromatic lipids in saliva and CSF sediments, and in the parotid glands). Arg. Neur. Psiquiat., 22:122-128, 1964.
9. CARNES, W.H. and FORKES, B.R. Metachromasy of Amyloid. A Spectrophotometric Study with particular reference to the Dye-Chromotrope Bound. Lab. Invest. 5:21-43 1956.
10. CASSELMAN, W.G.B. Histochemie. Dunod, Paris, 1962.
11. CHANDRA, S. and SKELTON, F.R. Staining Juxtaglomerular Cell Granules with Toluidine Blue or with Basic Fuchsin for Light Microscopy after Epon Embedding. Stain Technol., 39:109-111, 1964.
12. CUMMINGS, J.N. Modern Scientific Aspects of Neurology. Arnold London, 1960.
13. DUARTE-ESCALANTE, O.A.; AMARAL, A.D. y CANELAS, H.M. Metachromatic Leucodystrophy: study on the free amino-acids in blood, urine, saliva and CSF. Comunicación personal.
14. FOLCHI-PI, J. and BAUER, H.G. Brain Lipids and Lipoproteins in the Leucodystrophics. Elsevier, Amsterdam, 1963.
15. GOMONI, G. Microscopy Histochemistry. Principles and Practice. Chicago, The University of Chicago Press, 1952.

16. GREENFIELD, J.G. Neuropathology. Arnold, London, 1958.
17. HAGBERG, B., SVENNERHOLM, L. Metachromatic Leucodystrophy; a generalized lipidosis: determination of sulfatide in urine, blood plasma and CSF. Acta Paediat. (Upsala), 49: 690-694, 1960.
18. HESS, A. The ground substance of the central nervous system revealed by histochemical staining. J. Comp. Neurol., 98: 69-91, 1953.
19. KRAMER, H. and WINDUM, G.M. Sulphation Techniques in Histochemistry with special Reference to Metachromasia. J. Histochem. Cytochem. 2: 196-208, 1954.
20. KRAMER, H. and WINDUM, G.M. The Metachromatic Staining Reaction. J. Histochem. 3: 227-237, 1955.
21. LANDSMEER, J.M.F. Some Colloid Chemical Aspects of Metachromasia; influence of pH and salts on Metachromatic Phenomena evoked by Toluidine blue in animal tissue. Acta Physiol. Neerl. 2: 112-128, 1951.
22. LEVINE, A. and SCHUBERT, M. Metachromasy of thiazine dyes produced by chondroitin sulfate. J. Am. Chem. Soc. 74: 91-97, 1952.
23. LILLIE, R.D. Histopathologic Technic and practical Histochemistry. N.Y., The Blakiston, Co., 1954.
24. LISON, L. Histocinie et Cytochimie Animales, 2e.éd. (Paris, Gauthier-Villars), Chap. XIX, 1953.

25. PEARSE, A.G.E. Histochemistry. Theoretical and Applied. 2nd. ed. Little, Brown & Co., Boston, 1960.
26. PUCHTLEM, H. and SWEAT, F. A cresyl Fast Violet Stain for Bacteria and Fungi in Tissue. Stain Technol. 39:1-6, 1964.
27. SCHUBERT, M. and LEVINE, A. A Qualitative Theory of Metachromasy in Solution. J. Am. Chem. Soc., 77:4197-4201, 1955.
28. SCHUBERT, M. and HAMERMAN, D. Metachromasia; Chemical Theory and Histochemical use. J. Histochem. 4:159-189, 1956.
29. SINGER, M. Factors which control the Stain of Tissue Sections with Acid and Basic Dyes. Intern. Rev. Cytol. 1:211-255, 1952.
30. SVENNERHOLM, L. Laboratory diagnostic tests in Metachromatic Leucodystrophy. Acta Paediat. (Upsala), 48:632-645, 1959.
31. SYLVEN, B. and MALMGREN, H. On the Alleged Metachromasia of Hyaluronic Acid. Lab. Invest. 1:413-431, 1952.
32. SYLVEN, B. Metachromatic Dye-Substrate Interactions. Quart. J. Micr. Sci., 95:327-358, 1954.
33. WEIL, A. Textbook of Neuropathology. 2nd. ed. pp. XVI-356, Greene & Stratton, N.Y., 1945.
34. WISLOCKI, G.B., BUNTING, M. and DEMPSEY, E.W. Metachromasia in mammalian tissue and its relationships to mucopolysaccharides. An. J. Anat. 81:1-37, 1947.
35. WISLOCKI, G.B. and SINGER, M. The basophilic and metachromatic staining of myelin sheaths and its possible association with sulfatide. J. Comp. Neurol., 92:71-91, 1950.