

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LA CITOLOGIA DE LA
HIPOFISIS

Julian M.Echave Llanos

Padrino de Tesis Dr Heriberto Prieto Diaz.

1952

MINISTERIO DE EDUCACION

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA CIUDAD EVA PERON

AUTORIDADES

RECTOR:

Ing Carlos Pascali

SECRETARIO GENERAL:

Dr.Carmelo Pucciarelli

SECRETARIO ADMINISTRATIVO:

Don Jose Muñoz

PROSECRETARIO GENERAL:

Dr.Juan Carlos Nievas

CONTADOR GENERAL:

Don Enrique Jorge Mateo Barbier

CONSEJO UNIVERSITARIO:

Prof.Dr.Alberto Gazcón

Prof.Dr.José P.Uslenghi

Prof.Dr.Pedro G.Paternosto

Prof.Dr.José F.Molfino

Prof.Dr.Carlos M.Arispe

Prof.Dr.Nicolás Gelormini

Ing.Manuel Ucha Udabe

Ing.Agripino R.Spampinatto

Ing.José M.Castiglione

Ing.José J.Vidal.

.....

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

AUTORIDADES:

DECANO:

Prof.Dr.Alberto Gazcon

VICEDECANO:

Prof.Dr.Jose P.Uslenghi

SECRETARIO:

Dr.Flavio J.Briasco

PROSECRETARIO

Don Rafael G.Rosa

CONSEJO DIRECTIVO:

Prof.Dr.José P.Uslenghi

Prof.Dr.Carlos Floriani

Prof.Dr.Fidel A.Maciel Crespo

Prof.Dr.Enrique C.Baldasarre

Prof.Dr.Valentin C.Girardi

Prof.Dr.Ernesto L.Othaz

Prof.Dr.Pedro A.Crocchi

Prof.Dr.Aldo E.Imbriano

Prof.Dr.Francisco Martone

Prof.Dr.Manuel M.del C.Torres.

.....

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA CIUDAD EVA PERON

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

PROFESORES HONORARIOS

Dr. Rophille Francisco

Dr. Greco Nicolás V.

Dr. Soto Mario L.

PROFESORES TITULARES

Dr. Arguello Diego M.-Cl. Oftalmológica.-

"

" .Baldassarre Enrique C.-Farmacología y Te^{ca}rapeuti

" Bianchi Andrés C.-Anatomía Y F. Patológicas.-

" Caeiro José A.-Patología Quirúrgica.-

" Canestri Inocencio F.-Medicina Operatoria.-

" Carreño Carlos V.-Higiene y Medicina Social.-

" Cervini Pascual R.-Cl. Pediatría y Puericultura.-

" Corazzi Eduardo S.-Patología Médica Ia.-

" Christmann Federico E.B.-Cl. Quirúrgica IIa.-

" D'Ovidio F.R.E.-Pat. y Cl. de la Tuberculosis.-

" Echave Dionisio.-Física Biológica. -

" Errecart Pedro L.-Cl. Otorrinolaringológica.-

" Floriani Carlos.-Parasitología.-

" Gandolfo Herrera R.I.-Cl. Ginecológica.-

" Gascon Alberto.-Fisiología y Psicología.-

" Girardi Valentin C.-Ortopedia y Traumatología.-

" Irigoyen Luis.-Embriología e Histología Normal.-

" Lambre Romulo R.-Anatomía Ia.-

" Lyonnet Julio H.-Anatomía IIa.-

" Maciel Crespo F.A.-Semiología y Cl. Propedéutica.

" Manso Soto Alberto E.-Microbiología.-

" Martinez Diego J.J.-Patología Médica IIa.-

" Mazzei Egidio S.-Clínica Médica IIa.-

" Montenegro Antonio.-Cl. Genitourrológica.-

- Dr. Monteverde Victorio.-Cl. Obstetrica.-
- " Obiglio Julio R.A.-Medicina Legal.-
- " Othaz Ernesto L.-Cl. Dermatosifilografica .-
- " Rivas Carlos I.-Cl. Quirurgica Ia.-
- " Rossi Rodolfo.-Cl. Medica Ia.-
- " Sepich Marcelino J.-Cl. Neurologica.-
- " Uslenghi José P.-Radiologia y Fisioterapia.-
- " Arditi Rocha R.J.-Cl. Psiquiatrica.-

.....

PROFESORES ADJUNTOS

- Dr. Acevedo Benigno S.-Quimica Biológica. (A cargo de Catedra).-
- " An rieu Luciano M.-Cl. Medica Ia.-
- " Barani Luis Teodoro.-Cl. Dermatosifilografica.
- " Bach Victor E.A.-Cl. Quirurgica Ia.-
- " Baglietto Luis A.-Medicina Operatoria.-
- " Belingi Jose.-Pat. y Cl. de la Tuberculosis.-
- " Bigatti Alberto.-Cl. Dermatosifilografica.-
- " Briasco Flavio J.-Cl. Pediatrica y Puericultura.
- " Calzetta Raul V.-Semiologia y Cl. Propedeutica.-
- " Carri Enrique L. Parasitologia.-
- " Cartelli Natalie.-Cl. Genitourológica.-
- " Castedo Cesar.-Cl. Neurologica.-
- " Castillo Odena I. Ortopedia y Traumatologia.-
- " Ciafardo Roberto.-Cl. Psiquiatrica. -
- " Conti Alcides L.-Cl. Dermatosifilográfica.-
- " Correa Bustos H.-Cl. Oftalmologica. -
- " Curcio Francisco I.-Cl. Neurológica.-
- " Chescotta Nestor A.-Anatomia Ia.-
- " Crocchi Pedro A.-Radiologia y Fisioterapia.-
- " Dal Lago Hector.-Ortopedia y Traumatologia.-
- " De Lena Rogelio E.A.-Higiene y Medicina Social.
- " Dragonetti Arturo R.-Higiene y Medicina Social.-
- " Dussaut Alejandro.-Medicina Operatoria.-

Dr. Dobric Beltran B.L.-Pat. y Cl. de la Tuberculosis

" Fernandez Audicio J.C.-Cl. Ginecológica.-

" Fuertes F.-Cl. Enf. Infecciosas y P. Tropical.-

" Garibotto Roman C.-Patologia Medica IIa.-

" Garcia Olivera M.A.-Medicina Legal.-

" Giglio Irma C.de.-Cl. Oftalmológica.-

" Giroto Rodolfo.-Cl. Genitourológica. (A cargo de
catedra)

" Gotusso Guillermo O.-Cl. Neurológica.-

" Guixá Hector Lucio.-Cl. Ginecológica.-

" Gorostarzu Carlos M.C.-Anatomia IIa.-

" Ingratta Ricardo N.-Cl. Obstetrica.-

" Imbriano Aldo E.-Fisiologia y Psicologia.-

" Lascano Eduardo F.-Anatomia y F. Patológicas.-

" Logascio Juan.-Patologia Medica Ia.-

" Loza Julio C.-Higiene y Medicina Social.-

" Lozano Federico S.-Cl. Medica Ia.-

" Mainetti Jose M.-Cl. Quirúrgica Ia.-

" Martini Juan L.-Cl. Obstetrica.-

" Manguel Mauricio.-Cl. Medica IIa.-

" Marini Luis C.-Microbiologia.-

" Martinez Joaquin D.A.-Semiologia y Cl. Propedeutica
ca

" Matusевич José.-Cl. Otorrinolaringológica.-

" Meilij Elias.-Pat. y Cl. de la Tuberculosis.-

" Michelini Raul T.-Cl. Quirúrgica IIa.-

" Morano Brandi J.F.-Cl. Pediatrica y Puericultura.

" Moreda Julio M.-Radiologia y Fisioterapia.-

" Nacif Victorio.-Radiologia y Fisioterapia.-

" Naveiro Rodolfo.-Patologia Quirúrgica.-

" Negrete Daniel H.-Patologia Medica.-

" Pereira Roberto F.-Cl. Oftalmológica.-

" Prieto Diaz H.-Embriologia e Histologia Normal.-
(A cargo de catedra.-)

" Prini Abel.-Cl. Otorrinolaringológica.-

- Dr. Penin Raul P.-Cl. Quirurgica Ia.-
- " Polizza Amleto.-Medicina Operatoria.-
- " Ruera Juan.-Patologia Medica Ia.-
- " Sanchez Hector J.-Patologia Quirurgica.-
- " Torres Manuel M. del C.-Cl. Obstetrica.-
- " Trinca Saul E.-Cl. Quirurgica IIa.-
- " Tau Ramon.-Semiologia y Cl. Propedeutica.-
- " Tosi Bruno.-Cl. Oftalmológica.-
- " Tropeano Antonio.-Microbiologia,-
- " Tolosa Emilio.-Cl. Otorrinolaringológica.-
- " Vanni Edmundo O.F.I.-Semilogia y Cl. Propedeutic^a
- " Vazquez Pedro C.-Patologia Medica IIa.-
- " Votta Enrique.-Patologia Quirurgica.-
- " Zabudovich Salomon.-Cl. Medica IIa.-
- " Zatti Herminio.-Cl. Enf. Infecciosas y P. Tropical,
(A cargo de catedra).-
- " Rosselli Julio.-Cl. Pediatrica y Puericultura.-
- " Schaposnik Fidel.-Cl. Medica IIa.-
- " Caino Hector V.N.-Cl. Medica Ia.-
- " Cabarro Arturo.-Cl. Medica Ia.-
- " Martone Francisco.-Higiene y Medicina Social.-

.....

INTRODUCCION.-

La gran importancia que tiene la hipofisis dentro de la constelación endocrina desde el punto de vista fisiológico y la necesidad que tiene la fisiología del conocimiento de las modificaciones estructurales de este organo nos llevó a realizar un analisis de las condiciones en que se produce la tinción de los elementos celulares de esta glandula con el objeto de poder discriminar la presencia, abundancia, variaciones y alteraciones de los distintos "tipos" o "estadios" hasta ahora descriptos, en condiciones normales, patologicas y experimentales.-

Elegimos el gato por ser este un mamifero muy utilizado en el laboratorio fisiológico y de un ciclo sexual con períodos perfectamente definidos, lo cual permite utilizar el largo anestro que va de enero a junio como testigo de las variaciones que se producen en el período de actividad sexual que ocupa el resto del año.-

HISTORIA.-

Desde los trabajos de Schönemann (1892) y Gemelli (1905) se describen en la porción distal de la hipofisis dos tipos de celulas cromófilas, las celulas acidófilas que toman la eosina y las celulas basófilas que presentan una afinidad manifiesta con la hematoxilina y el azul de toluidina segun aquellos autores.

En base a esta nomenclatura se sucedieron las descripciones de esta glandula en los vertebrados hasta que en el año 1933 Wolfe, Cleveland y Campbell describen en la hipofisis anterior del perro un ti-

po de células que presentan una afinidad específica por la eritrosina cuando se las tiñe por el método de Cleveland y Wolfe (1932) con eritrosina, naranja G y Azul de anilina. En el año 1938 Dawson y Friedgood después de aplicar a la porción distal de la hipófisis de conejos hembras y gatos la técnica "azan" de Heidenhain, un tipo celular, la célula por ellos llamada "carminófila" que se tiñe selectivamente con el azocarmin G. En trabajos posteriores estos autores describen con detalle la morfología y comportamiento de estos elementos celulares en el conejo ~~h~~ hembra y gato, relacionándolos con las células acidófilas que toman el naranja y clasificando ~~as~~ como un nuevo tipo celular existente en la porción distal de la hipófisis de estos animales. (Dawson y Friedgood 1938, Dawson 1938, 1939, 1946; Friedgood y Dawson 1938, 1940, 1942.). Este tipo celular ha sido descrito más tarde en la hipófisis de comadreja, hurón y mono por Dawson (1938, 1942), en el armadillo por Oldham (1938), en varios órdenes de pájaros por Rahn (1938, 1939) y Rahn y Painter (1941) en *Triturus Viridescens* por Copeland (1941, 1943-), en una variedad de culebra por Hartmann (1944) y en nuestro país en el sapo *Bufo Arenarum* H. por Masselin (1939, 1940)

La investigación presente ha sido orientada:

- 1°.-A establecer las condiciones en que se realiza la tinción con hematoxilina eosina, método que fue utilizado por los primeros investigadores y sirvió de punto de partida a la designación de basófilas y acidófilas.
- 2°.-A establecer el grado de afinidad entre las células que toman el azocarmin G. y este colorante.

3°.-A estudiar los tipos celulares en cortes vecinos con ambas técnicas con el objeto de poder establecer correlaciones precisas.

4°.-A establecer si el criterio aceptado actualmente para la basofilia (Afinidad del ácido ribonucleico con el azul de metileno. Contrapruema con ribonucleasa) es válido para las células basófilas de la nomenclatura clásica.

MATERIAL Y METODOS.

Se utilizaron 12 gatos, 4 machos y 8 hembras, 1 preña cazados en distintas épocas del año.-

Las hipófisis fueron extraídas inmediatamente de muerto el animal siguiendo la técnica que se detalla a continuación:

Se secciona la piel y la aponeurosis cureteando luego completamente la calota craneana. Una vez levantada esta se extrae el cerebro con un instrumento romo, se seccionan los nervios olfatorios y una vez expuesto el quiasma se secciona horizontalmente hacia atrás de manera que queda en el fondo de la cavidad craneana la zona subtalámica e infundibular con la hipófisis adherida en su cara inferior y ubicada aun en la silla turca. Para extraerla es necesario levantar la masa nerviosa con una pinza por su parte posterior y seccionar la lámina cuadrilátera del etmoides con una cizalla. Se extrae luego la hipófisis de adelante hacia atrás después de seccionar el quiasma y liberándola cuidadosamente de sus adherencias meníngeas con un pequeño bisturí para parpados y una pequeña tijera.

Este material fue fijado por espacio de 6 horas en el fijador de Zenker y las variantes de Helly y

Maximow.

Líquido de Zenker:

Bicromato de potasio	2,5 g
Bicloruro de mercurio	5 g
Sulfato de sodio	1 g
Agua destilada	100 cc
Acido acético	5 cc

Líquido de Helly y de Maximow: Iguales que el Zenker salvo la supresión del acido acético y el agregado de formol en proporción del 5 y 10 % respectivamente.

Una vez fijado, el material fue lavado durante 6 a 12 horas en agua corriente. Se realizó la inclusión en parafina.-

Se utilizaron los siguientes metodos de coloración.
1°.- Con el objeto de establecer las condiciones de tinción con hematoxilina se hicieron variar independientemente el pH de la solución colorante, la temperatura y el tiempo de coloración.-

Se utilizaron tres soluciones de hematoxilina, segun Delafield, segun Ehrlich y segun Meyer preparadas como indica Romeis (1928).

Las variaciones de pH se consiguieron utilizando como sistema buffer el Acido acetico-Acetato de sodio segun tabla de Walpole, Lillie (1948) a pH 2,6 3; 4; 4,9; y 6,5. A 10 cc de la solución buffer a cada pH se agregaron 40 cc de hemalumbre de Meyer, solución elegida para el estudio de estas variaciones.

La temperatura varió para cada pH entre 10 y 60 grados y el tiempo de coloración entre 10 y 60 minutos.

Realizada la tinción los cortes se viraron en agua corriente durante 15 minutos.

3°.-El metodo de Mallory con Floxina y Azul de Metileno se utilizó segun el siguiente modus operandi:

- 1.-Desparafinar e hidratar los cortes.
- 2.-Floxina B. 2,5% a 55°C 1 o mas horas.
- 3.-Lavar cuidadosamente en agua destilada.
- 4.-Azur II 1%
Azul de metileno 1% en sol.borax 1% aa.
5 a 20 min.
- 5.-Agua
- 6.-Diferenciación en colofonia 0,2 a 0,5% en alcohol 95.
- 7.-Deshidratar en 3 cambios de alcohol 100.
- 8.-Alcohol 100 y xilol partes iguales.
- 9.-Xilol 2 cambios y montaje.-

Las referencias a pH que se hacen en el presente trabajo lo son al pH teorico segun la tabla de Walpole ya citada.

OBSERVACIONES

La morfologia de la Hipofisis ya ha sido descrita por Dawson (1937) y Friedgood y Dawson (1940). Poco es lo que podemos agregar. La porción intermedia recubre incompletamente el lobulo posterior y está separada del lobulo anterior por la existencia de una luz residual bien definida. El lobulo anterior cubre a su vez en forma incompleta el lóbulo intermedio y posterior unidos. La porción tuberal, de estructura vesicular aparece como una masa alargada e de tejido que envuelve el tallo infundibular. Sin embargo se adelgaza mucho cuando se une al borde medio anterodorsal de la porción anterior encerrando aquí una masa de tejido compacto que se continúa con un tejido similar en el lóbulo anterior. Este tejido

esta formado principalmente por células basófilas y cromofobas aunque pueden observarse algunas acidófilas. Esta zona basofila ocupa un área irregular de posición anteroventral y media extendiéndose desde aquí hasta casi la luz residual y dividiendo el lóbulo anterior en zonas derecha e izquierda en que predominan las células acidófilas y cromofobas.-

Condiciones de tinción de las basofilas con hematoxilina.

El color que presentan las células del gato después del tratamiento detallado para la tinción con hematoxilina es de tinte ultramar violeta.

Se analizaron, ante variaciones controladas: 1. del pH; 2., de la temperatura; 3., del tiempo de coloración, sus propiedades: a) intensidad o valor lumínico, b) pureza o grado cromático.

1°. - Las variaciones del pH a 20°C durante 20 min. permiten establecer que:

a) La intensidad de este tinte en las células basofilas aumenta de pH 2,6 a pH 6,5. En las demás células la intensidad es débil a cualquiera de los pH citados. (Figs. 1 y 2.).

b) La pureza de este tinte es mayor a pH 4,9 y 6,5 en todas las células.

2°. - Variando la temperatura entre 10 y 60°C para cada pH se observa:

a) La intensidad aumenta en las células basofilas con el aumento de la temperatura. El aumento de intensidad es relativamente mayor en las otras células ante esta variación.

b) Las variaciones de pureza de tinte no son estimables.

3°. - Variando el tiempo entre 10 y 60 min. para cada

pH a 20°C se puede observar que despues de los 15 m no aumenta ostensiblemente la intensidad o pureza e del tinte en las celulas basofilas contrariamente a lo que ocurre en las demas celulas donde el aumento de intensidad es evidente.

4°.-Tiñendo con Hemalumbre de Meyer las celulas presentan el mismo tinte de intensidad y pureza ligamente mayor en las celulas basofilas que en las demas celulas.(Fig.4).-

5°.-La tinción con la solución de Ehrlich da el mismo tinte sin diferenciación de intensidad o pureza entre las celulas basófilas y demas elementos celu-lares.(Fig.3.).

6°.-La tinción con la solución de Delafield da el mismo tinte mas intenso y puro en las celulas basó-filas que en las restantes,no siendo muy marcada es-ta diferencia.(Fig.5).

7°.-Despues de la tinción con eosina,eritrosina o flóxina 1% previa tinción con hemalumbre de Meyer a pH 4,9 y 6,5 el tinte ultramar violeta vira al vio-leta de intensidad y pureza elevadas tiñendo se las celulas acidófilas de color rubí franco de intensi-dad mediana.

Resultados con el "azan" de Heidenhain.-

La aplicación de este metodo en hipofisis fijadas en Zenker Formol (Helly,Maximow)permite observar:

1)Celulas azocarminófilas cuyo citoplasma reacciona fuertemente con el azocarmín G lo cual permite dis-tinguir las claramente de los otros tipos celulares.

Estan ubicadas en la region media de la glandula predominando en la parte anteroventral,se extienden hasta la porción tuberal y dividen la glandula en m

Son células más voluminosas que las restantes, presentan una forma poligonal o globulosa, a veces piriforme y menos frecuentemente alargada o cilíndrica. Su citoplasma presenta granulos que son los que reaccionan con el Azocarmin G siendo abundantes y apretados en algunas de las células pero escaseando en otras que dan la impresión de encontrarse en degranulación. La afinidad de estos granulos por el azocarmin G resistió una diferenciación de 72 hs. La excesiva diferenciación determina la tinción posterior con el azul de anilina.

El núcleo de estos elementos es redondeado u oval ocupando el centro de la célula o situándose en posición polar.

El estudio de cortes inmediatamente vecinos permitió establecer que las células azocarminófilas son las células basófilas de la nomenclatura clásica teñidas en el otro corte con hematoxilina tamponada a pH 6,9 según la técnica ya citada. (Figs. 7 y 8.).

2) Células cianófilas; poseen granulos más finos que se tiñen con el azul de anilina de color azul celeste intenso. Su tamaño es variable, generalmente voluminosas. Su forma es predominantemente poligonal o globulosa. El núcleo, redondeado u oval es más voluminoso que el de las azocarminófilas. El citoplasma se condensa en la periferia de algunas de las células (Fig. 9.).

En lo referente a su distribución topográfica se las encuentra siempre en los mismos campos y en relación con las azocarminófilas.

3) Células orangiófilas. Sus granulos se tiñen con el naranja G. Son de forma predominantemente globulosa

o poligonal y de menor tamaño que las azocarminófilas. (Fig 8.). Se sitúan en acumulos compactos en ambas partes laterales de la glandula en relación con las cromóforas.

4) A la par de estos tipos cromófilos se encuentran las células cromóforas que podemos subdividir de acuerdo con el criterio de Wolfe y Brown (1942). en cromóforas inactivas de protoplasma escaso y cromóforas activas que corresponden a elementos cromófilos degranulados. (Fig. 10.).

Resultados con el Metodo de Mallory

La aplicación del metodo de Mallory en material fijado en Zenker permite observar que el citoplasma de algunas células reacciona con el azul de metileno. (Figs. 11 y 12.). El estudio de cortes vecinos permite establecer que estas células pertenecen tanto a las basófilas como a las acidófilas de la nomenclatura clásica.

DISCUSION

El estudio presente ha sido orientado fundamentalmente a establecer las condiciones de tinción de las células hipofisiarias y realizar, sobre la base del perfecto dominio de los factores que rigen aquel proceso comparaciones en cortes vecinos de 5 micras con el fin de dejar sentada la correspondencia de los cuadros citológicos que dan distintas técnicas como la de la Hematoxilina Eosina, Azan de Heidenhain y la técnica de Mallory con Floxina y Azul de metileno.

El dominio de aquellas condiciones y el estable-

cimiento de estas correlaciones en distintas situaciones fisiológicas (períodos del ciclo por ej.), patológicas y experimentales, es como se comprende de enorme importancia si se considera a la histomorfología e histoquímica como auxiliares de la fisiología y la patología experimentales.

Por otra parte el poder establecer las características de un tipo celular no solo por su morfología sino también porque toma tales o cuales colorantes en determinadas condiciones técnicas bien precisadas y en condiciones precisas y conocidas de la fisiología o patología del animal, tiene enorme importancia desde el punto de vista de la citología de la hipófisis.

Planteado así el problema en términos generales pasaremos a analizar los hechos concretos y a interpretarlos en sus relaciones en la medida en que esto sea posible.

Dawson y Friedgood en diferentes oportunidades y ya consignadas, han descrito en la porción distal del gato fijada en Sublimado Formol y teñida con "azan" de Heidenhain un tipo celular que aparece en las partes laterales de la glándula con marcadas manifestaciones morfológicas de secreción y que da lugar a la que ellos llaman reacción carminófila que aparece en períodos definidos del ciclo sexual (Estro, período preovulatorio después del coito, período preimplantatorio después de la ovulación, embarazo avanzado y lactancia) para declinar luego total o parcialmente por degranulación de las células carminófilas o por regresión de las mismas ocupando su

en las partes laterales las acidófilas comunes que se tiñen con el naranja G.

Describen además las basofilas situadas en la zona media, que en aquellas condiciones de técnica reaccionan con el azul de anilina y estudian sus variaciones en las mismas condiciones fisiológicas.

En el material trabajado por nosotros esta situación no se ha reproducido seguramente debido a las distintas condiciones de técnica; fijación en Zenker Formol y tinción con "azan". En estas condiciones las hipofisis de los distintos períodos del ciclo presentan el siguiente cuadro:

- a) Las células carminófilas descritas por Dawson y Friedgood se tiñen por el naranja G igual que las acidófilas comunes. Solo se distinguen de estas por su disposición alveolar y su polarización secretoria.
- b) Las células basofilas que ocupan la zona media de la glándula y se tiñen con la hematoxilina se tiñen específicamente con el azocarmin G del "azan" resistiendo una diferenciación de 72 hs. Si esta diferenciación elimina el azocarmin G. Estas células reaccionan con el azul de anilina.
- c) En nuestras preparaciones aparecen células cianofilas que se tiñen con el azul de anilina y se relacionan con las células azocarminófilas desde tres puntos de vista; 1.-Topográficamente pues aparecen en la zona media de la glándula en estrecho contacto con aquellas. 2.-Morfológicamente pues con pequeñas variantes su aspecto es semejante al de aquellas células. 3.-Tintorialmente pues reaccionan con el azul de anilina que tiñe las azocarminófilas cuando

han cedido el azocarmin G en un exceso o de diferenciación. En estas condiciones este estadio celular que creemos ser los primeros en diferenciarse tincionalmente estaría incluido en el ciclo de la célula basófila.

d) Se pueden observar además de aquellos tipos celulares células cromofobas activas e inactivas en el sentido de Wolfe y Brown.

Combinando ambas técnicas; Sublimado Formol-"Azan" y Zenker Formol-"Azan" y la técnica de la hematoxilina eosina para hacer referencia a la nomenclatura clásica, tenemos el siguiente cuadro citológico en la hipófisis del gato:

- 1.- Células Azocarminófilas; zona media de la glándula. Zenker Formol-"Azan": Toman la Hematoxilina a pH 4,9 y 6,5, color ultramar violeta. Toman el azocarmin G. Toman el azul de anilina en caso de faltar aquel.
- 2.- Células Cianofilas; zona media de la glándula. Zenker Formol-"Azan": Toman el azul de anilina, color azul celeste intenso.
- 3.- Células carminófilas; zonas laterales de la glándula. Sublimado Formol-"Azan": Toman el Azocarmin G, color rojo brillante. Aparecen en períodos definidos del ciclo. Descriptas por Dawson y Friedgood.
- 4.- Células orangiofilas; zonas laterales de la glándula. Sublimado Formol-"Azan": Toman el naranja G, color naranja brillante. Descriptas como acidófilas comunes por Dawson y Friedgood.
- 5.- Células cromofobas activas. Con cualquier técnica.
- 6.- Células cromofobas inactivas. Con cualquier técnica.

Es evidente que la utilización de esta combinación

da un cuadro citológico mas completo que la utilización de cualquiera de ellos aisladamente y que el empleo de la comparación de cortes in mediatos permite caracterizar mas completamente los tipos celulares de acuerdo a sus diversas afinidades tinctoriales con las distintas tecnicas.

La tecnica de Mallory ha sido utilizada por diversos autores en combinación con la digestión por medio de ribonucleasa como contraprueba para establecer la presencia de acido ribonucleico en el citoplasma sustancia que seria la que determina la afinidad con el azul de metileno. El acido ribonucleico aparece en aquellos lugares de los tejidos donde es intensa la sintesis proteica de ahí la importancia de su determinación en la hipofisis, lugar de intensa y constante síntesis. En nuestros preparados las células que tienen acido ribonucleico en el citoplasma se encuentran tanto entre las basofilas como entre las acidofilas de manera que la basofilia para el azul de metileno no seria correlativa de la basofilia clasica. No obstante es este un problema que requiere una investigación mas detallada.

Es indudable que esto es solo un comienzo y que debe profundizarse en el análisis por este camino pero es evidente que el estudio de los factores que rigen la tinción por medio del metodo experimental es el unico camino que nos permitirá establecer un conocimiento de la porción distal de la hipofisis que sea base firme para los estudios fisiologicos y patologicos, tanto sistematicos como experimentales.

CONCLUSIONES

1.-Se han establecido las condiciones optimas de

tincion con Hematoxilina Eosina de hipofisis de gato fijada en Zenker Formol:

a)El mayor contraste y pureza de tinte ultramar violeta con que se tiñen las celulas basófilas con respecto a los demas elementos se obtiene a pH 4,9 y 6,5 de la solución buffer durante 10 min. a 20°C.-

b)Esta tincion, seguida de tinción de contraste con eosina, eritrosina o floxina permite una perfecta diferenciación entre las celulas basofilas y acidófilas que aparecen con un tinte violeta puro e intenso y rubí franco de mediana intensidad respectivamente.-

2.-La utilización combinada de las tecnicas Zenker Formol-"Azan" y Sublimado Formol"Azan" permite diferenciar en la hipofisis del gato los siguientes tipos o estadios celulares:

A)Celulas azocarminofilas; B)Celulas cianófilas; C) Celulas carminófilas; D)Celulas orangiofilas; E) Celulas cromofobas activas; E) Celulas cromófbas inactivas.- (Ver detalle en el texto).-

3.-La aplicación del metodo de Mallory con azul de metileno y floxina permite establecer:

a)Que aparecen celulas teñidas con azul de metileno en toda la glandula.

b)Que estas celulas tienen correspondencia tanto entre las acidófilas como entre las basófilas.

.....

	Zona lateral	Zona media	Ambas zonas
Zenker Formol "AZAN"	 <p>ORANGIOFILAS</p>	 <p>AROCARMINOFILAS CIANOFILAS</p>	 <p>Cr. Activas</p>  <p>Cr. Inactivas</p>
Sublimado Formol "AZAN"	 <p>Crangiofilas Carminofilas</p>	 <p>Basofilas</p>	 <p>Cr. Activas</p>  <p>Cr. Inactivas.</p>

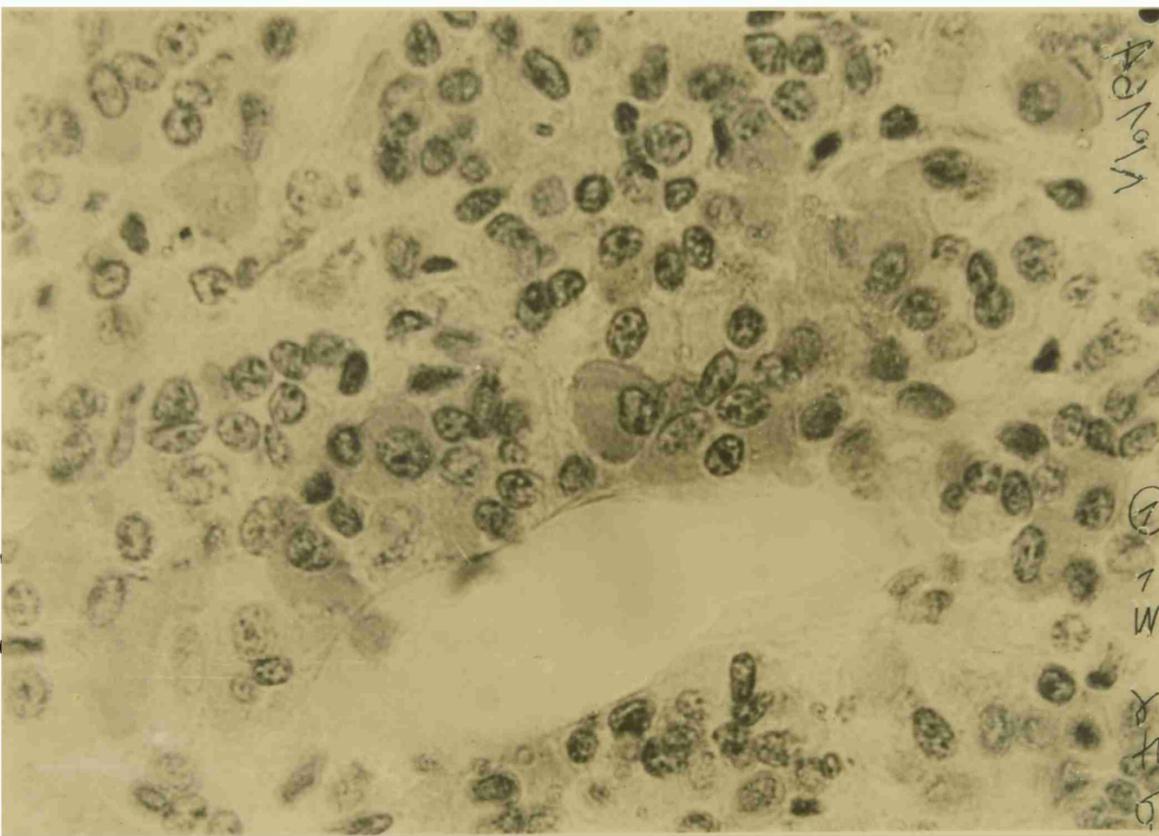


FIGURA 1

Hipofisis de gato. Porción distal. Se observan células teñidas débilmente con hematoxilina. Zenker Formol-Hemalumbre de Meyer pH 2,6.-

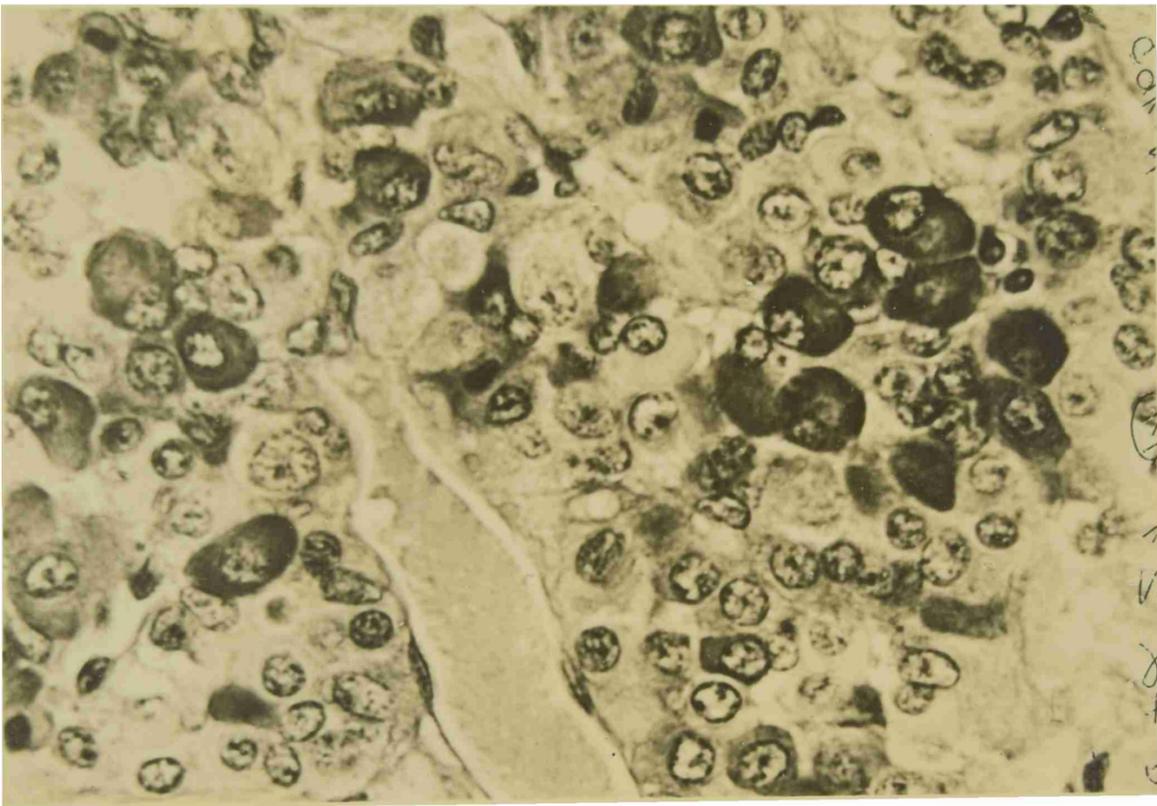


FIGURA 2

Hipofisis de gato. Porcion distal. Se observan celulas teñidas intensamente con hematoxilina. Zenker Formol-Hemalumbre de Meyer pH 6,5.-

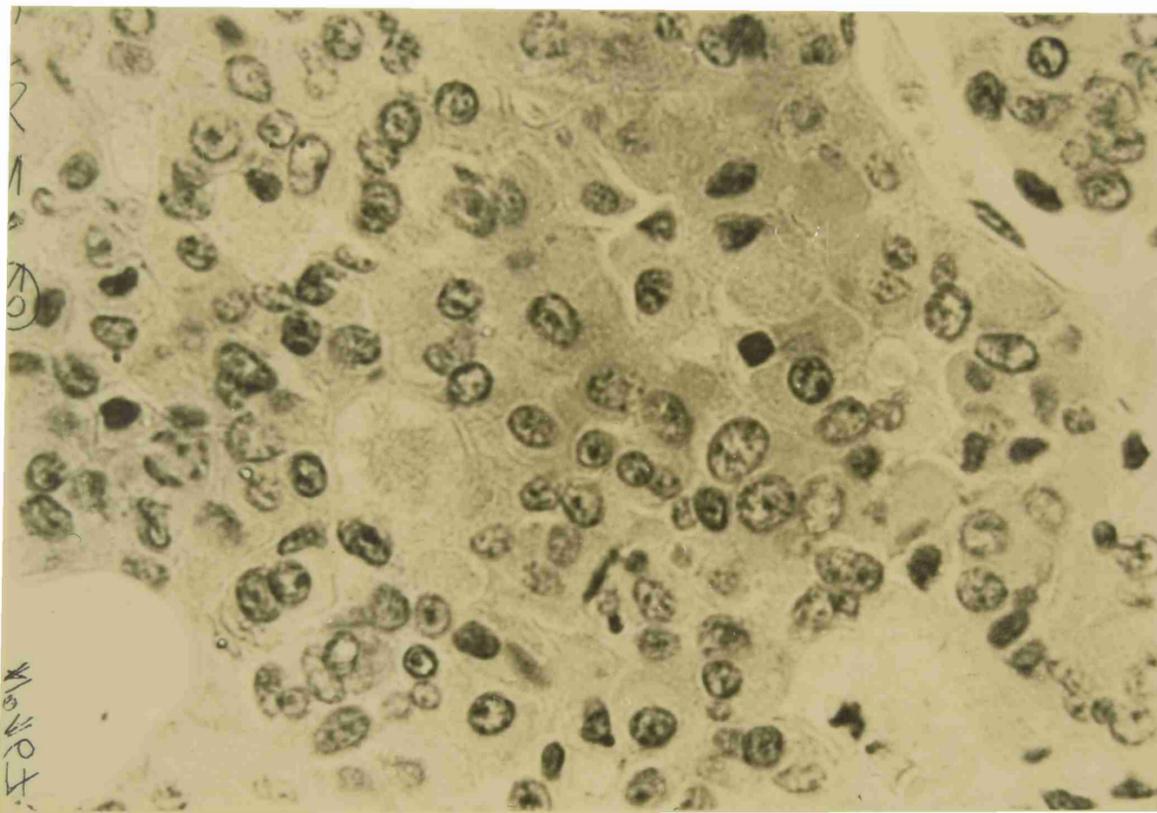


FIGURA 3

Hipofisis de gato. Porción distal. No se observa diferenciación tincorial. Zenker Formol. Hematoxilina segun Ehrlich.-

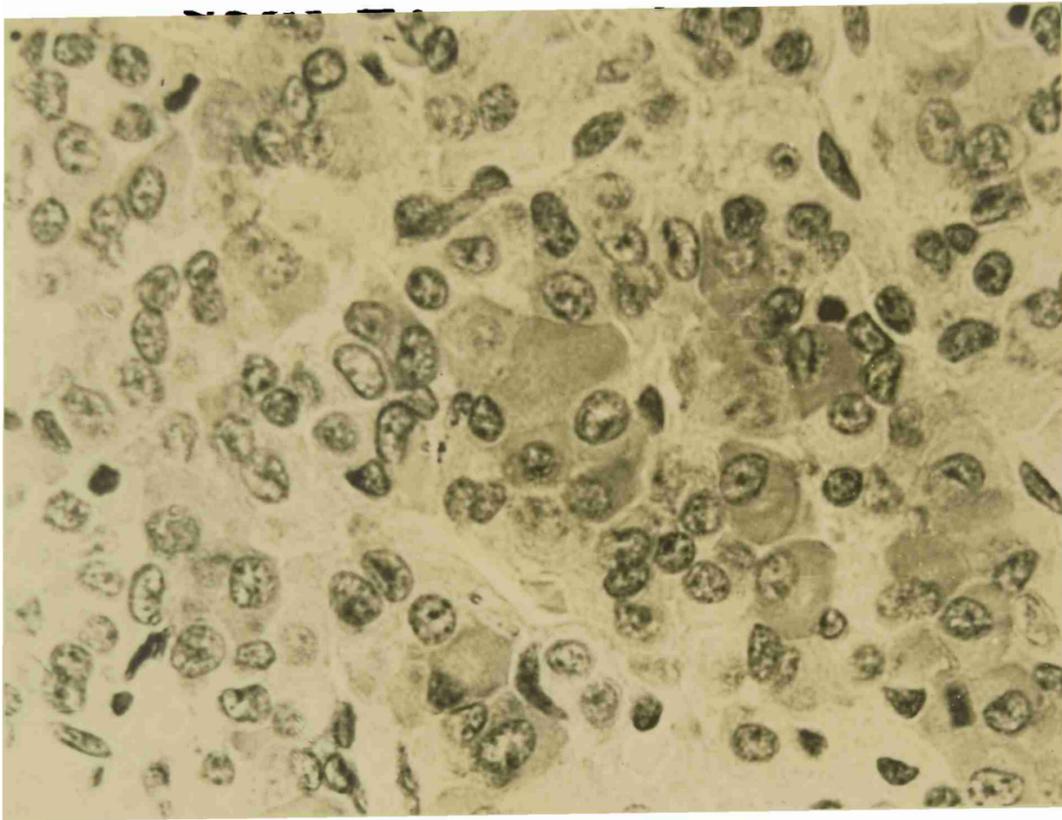


FIGURA 1

Hipofisis de gato. Porcion distal. Se observan celulas teñidas con hematoxilina. El contraste es mucho menor que en la figura 2. Zenker Formol. Hemalumbre de Meyer sin tamponar.

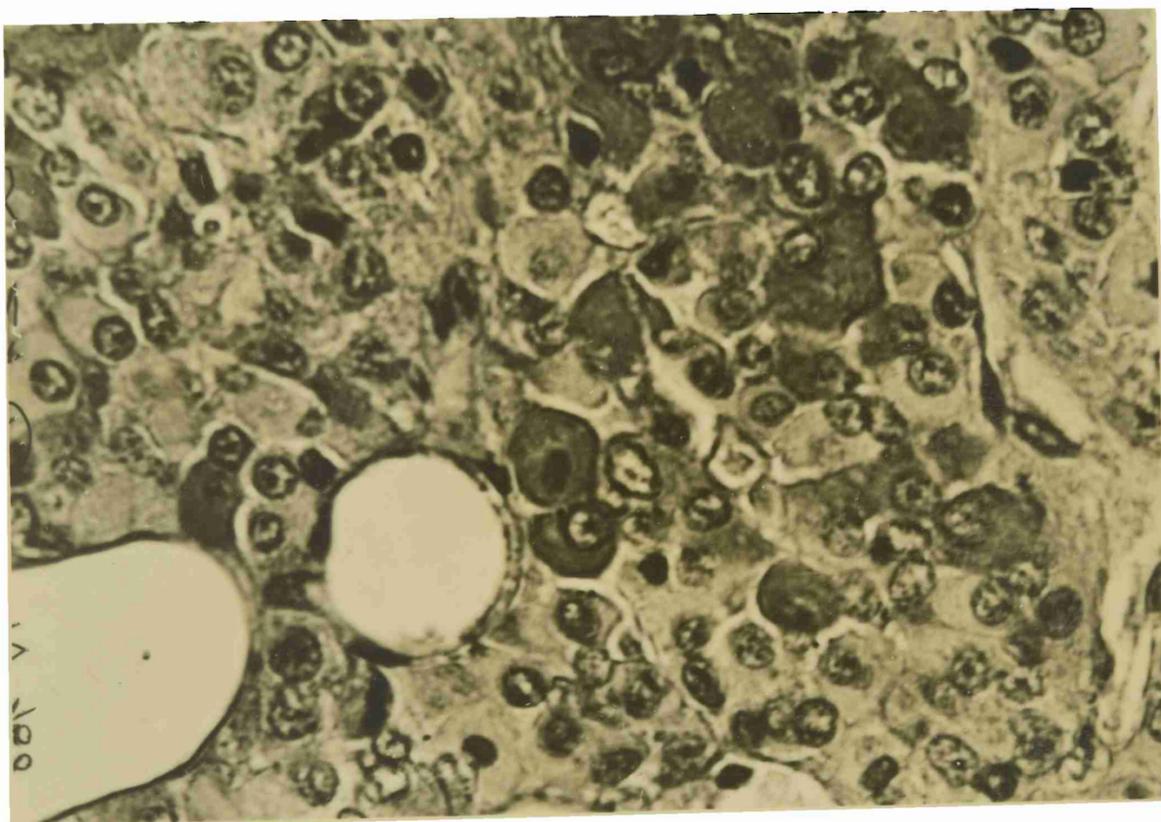


FIGURA 8

Hipofisis de gato. Porción distal. Se observan células teñidas con hematoxilina. El fondo se ha teñido muy intensamente. Zenker-Formol. Hematoxilina Delafield.

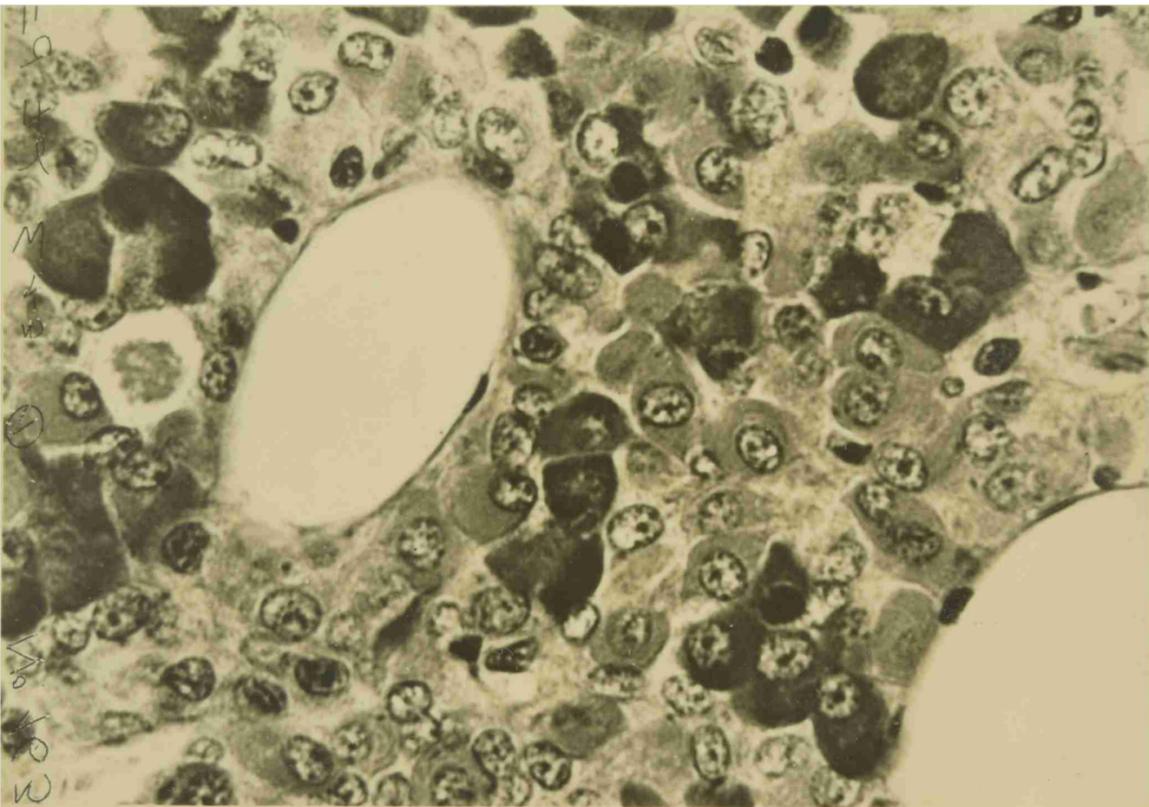


FIGURA 6

Hipofisis de gato. Porción distal. Se observan células teñidas con hematoxilina (negro) y eritrosina (gris). Zenker Formol Hemalumbre de Meyer pH 4,9-Eritrosina

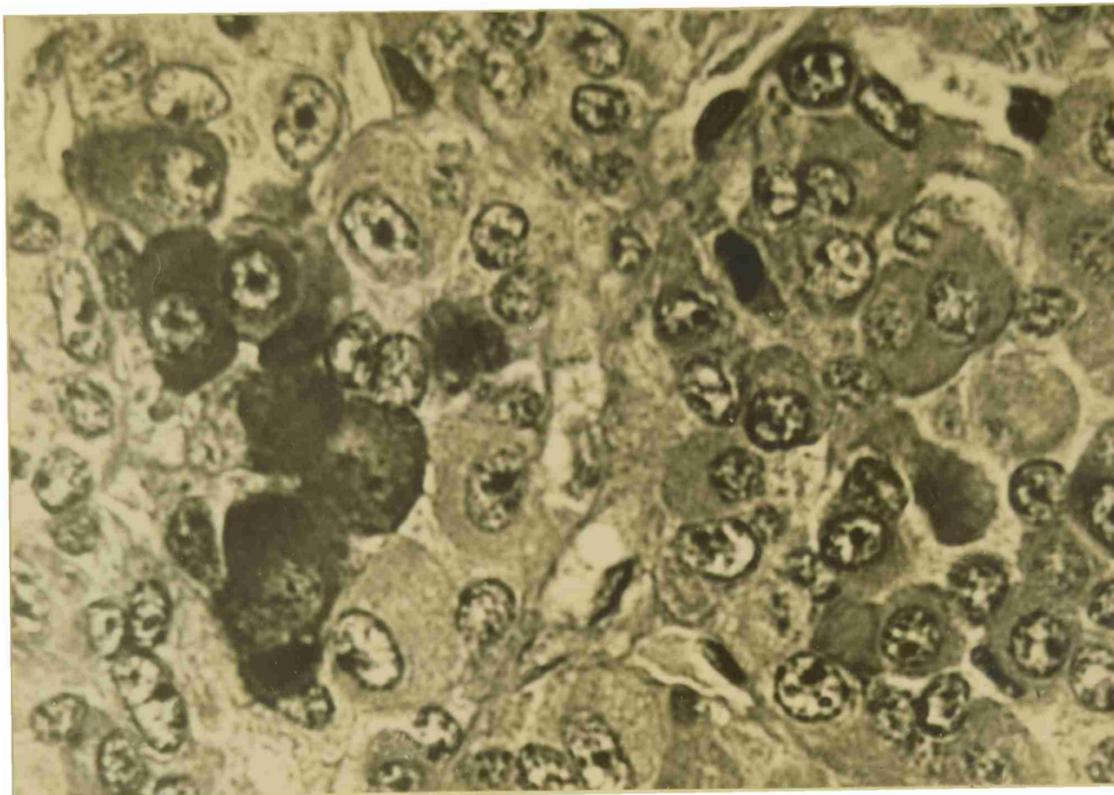


Fig. 8.

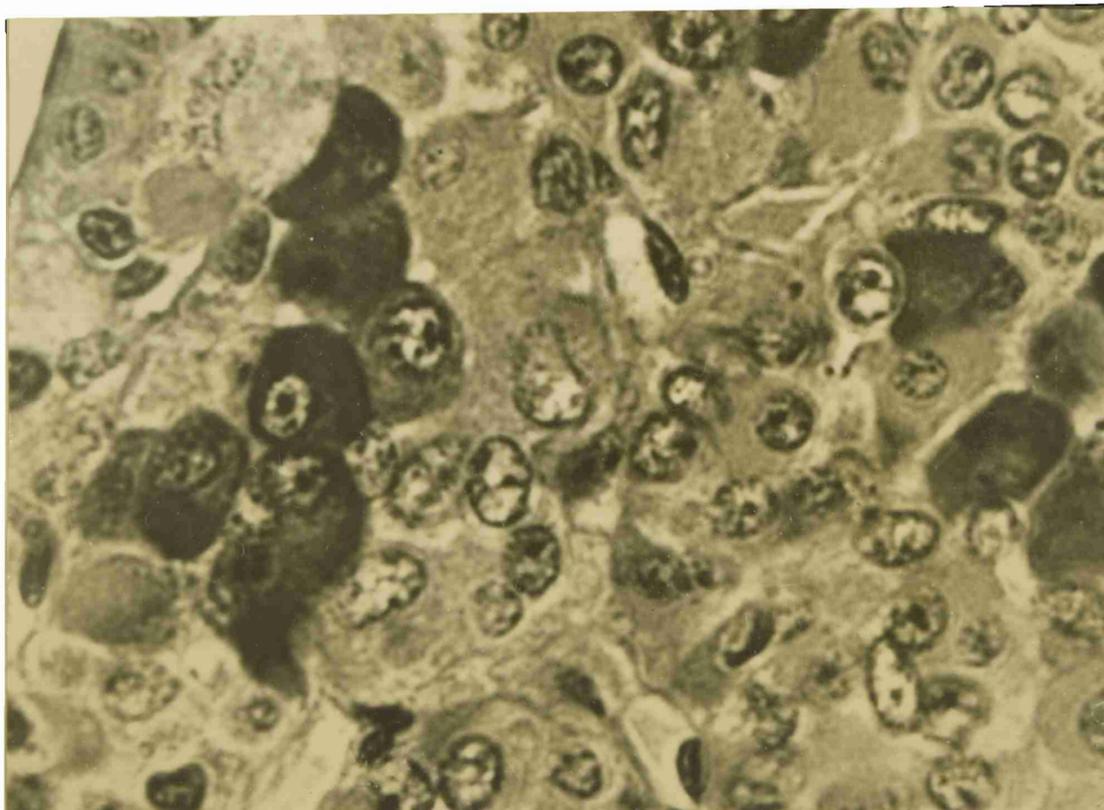


Fig 7

FIGURA 7

Hipofisis de gato. Porcion distal. Se observa un grupo de celulas teñido con hematoxilina. Zenker Formol. Hemalumbre pH 4,9. - Eosina.

FIGURA 8

El mismo grupo de celulas de la figura 7 teñido con azocarminG en un corte vecino. Or. Celulas orangiófilas. "Azan".

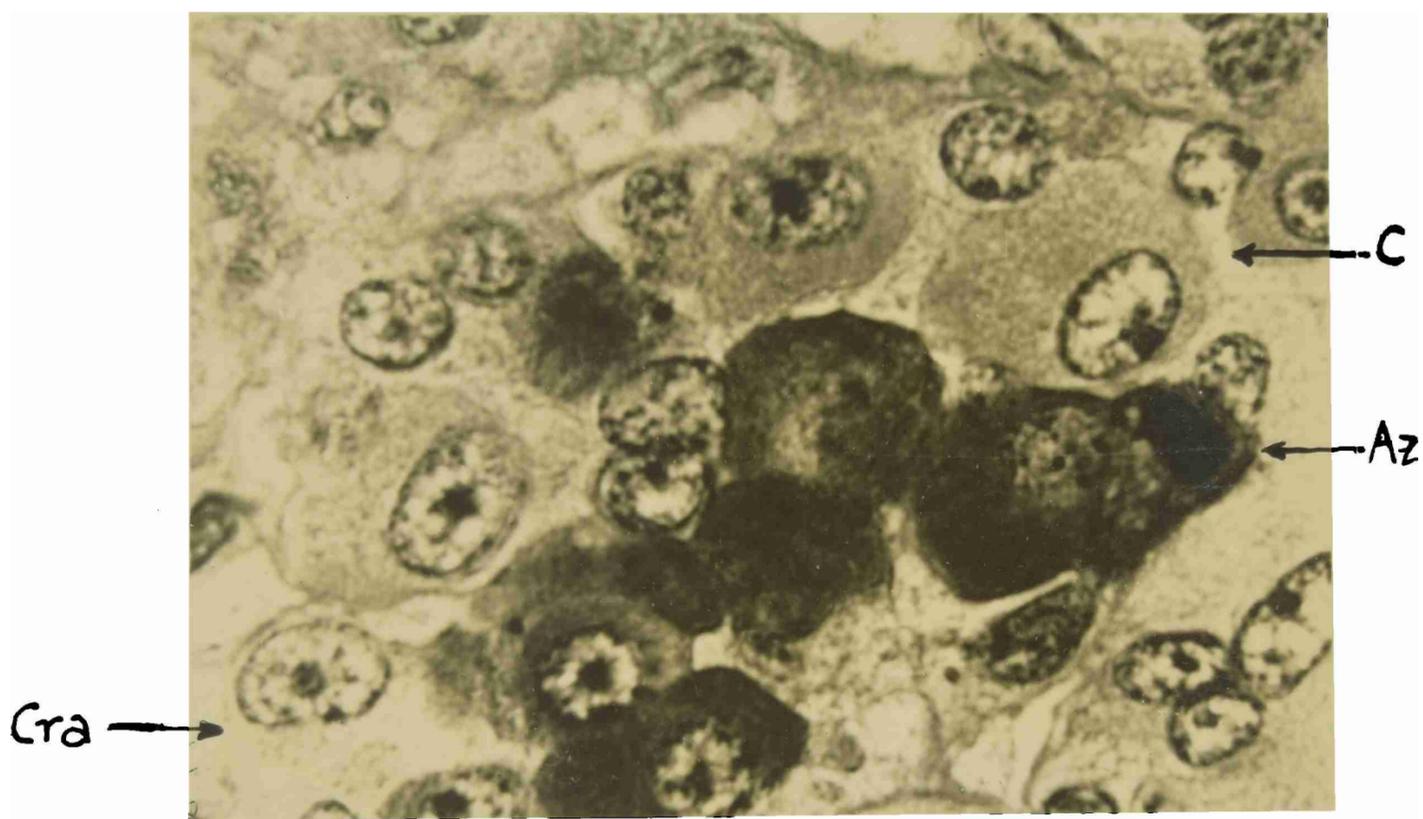


FIGURA 9

Hipofisis de gato. Porcion distal. Detalle del grupo de celulas de la fig. 8.
 Az. Azocarminófilas. C. Cianófilas. Cra.
 Cromofobas activas. Zenker Formol. "Azan"

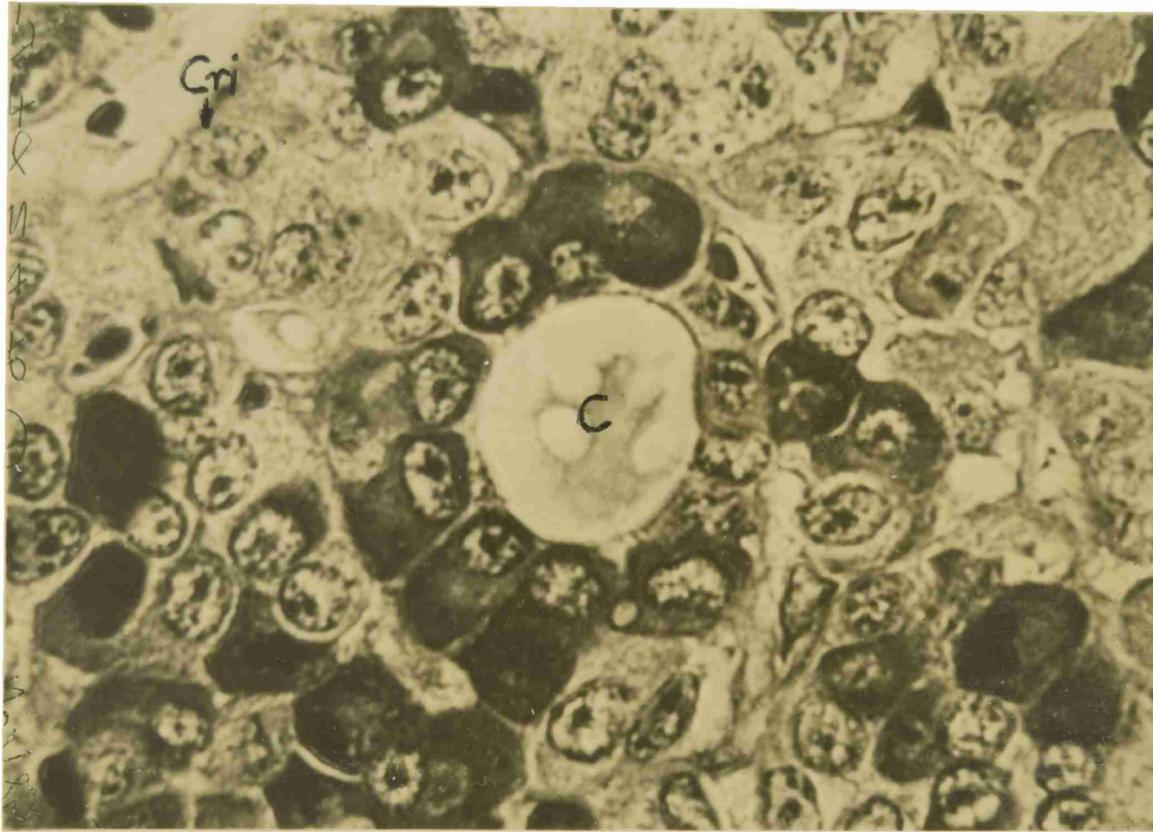


FIGURA 10

Hipofisis de gato. Porcion distal. Se observa disposicion alveolar de celulas teñidas con azocarmin G. Coloide intraalveolar. Cri. Cromofobas inactivas. Zenker Formol. "Azan".

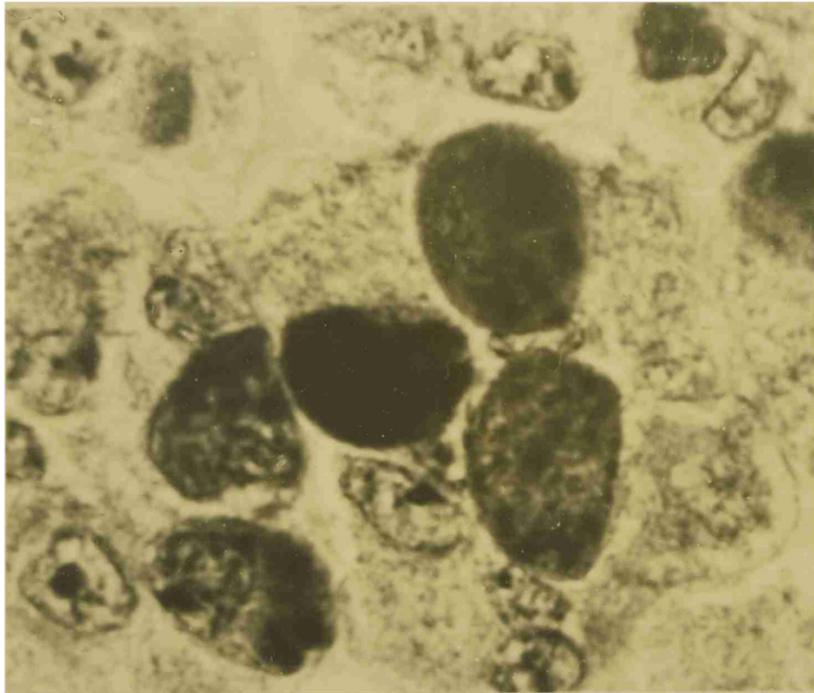
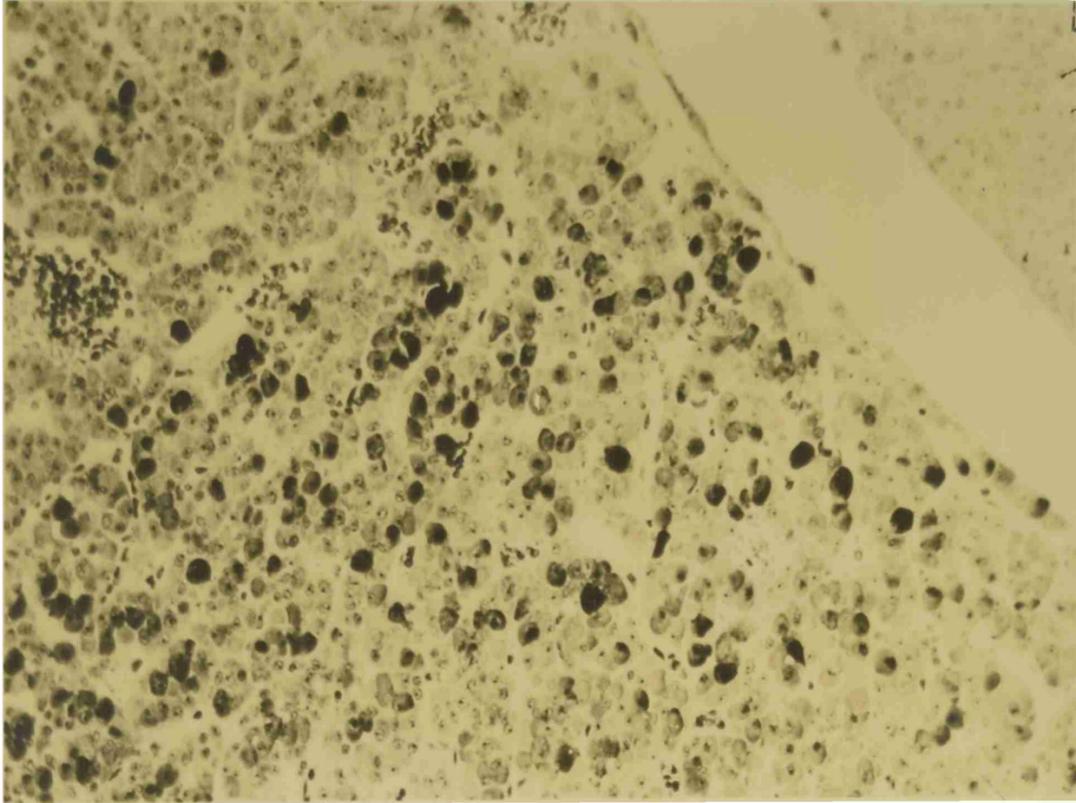


FIGURA 11

Hipofisis de gato. Porción distal. Se observan células teñidas con azul de metileno. Zenker. Metodo de Mallory.

FIGURA 12

Hipofisis de gato. Porción distal. Detalle del preparado anterior.

BIBLIOGRAFIA

- 1.-BAKER J.R.-Cytological Technique.Methuens and Co.London.1945.-
- 2.-COWDRY E.V.-Microscopic technique in Biology and Medicine.Williams and Wilkins.Baltimore. 1943.-
- 3.-COPELAND D.E.-Cytology of the pituitary gland in developing and adult triturus viridescens. J.Morph.,72.,379.,1943.-
- 4.-CLEVELAND R.and J.M.WOLFE.-A differential stain for the anterior lobe of the hipophysis.Anat. Rec.,51.,409.,1932.-
- X 5.-DAWSON A.B. and H.B.FRIEDGOOD.-The occurrence of a second type of acidophile cell in the anterior pituitary of the female cat and its relation to the sexual cycle.Anat.Rec.,70.,21.,1938.-
- X 6.-DAWSON A.B.and H.B.FRIEDGOOD.-Differentiation of two classes of acidophiles in the anterior pituitary of the female rabbit and cat.-Stain Tech. 13.,17.,1938.-
- 7.-DAWSON A.B.-The epithelial components of the pituitary gland of the opossum.Anat.Rec.,72.,181., 1938.-
- X 8.-DAWSON A.B.-Differential staining of the anterior pituitary gland of the cat.Stain.Tech.,14., 133.,1939.-
- X 9.-DAWSON A.B.-Some evidences of specific secretory activity of the anterior pituitary gland of the cat.-Am.J.Anat.,78.,347.,1946.-
- 10.DEMPSEY E.W.-The chemical cytology of endocrine glands.Rec.Progr.in Horm.Res.,3.,127.,1948.-
- 11.DEMPSEY E.W.-The chemical cytology of the thy-

- roid gland. Ann. of the N. York Acad. of Sci. 50., 336
1949.-
12. DEMPSEY E. W. and M. SINGER.- Observations of the
chemical cytology of the thyroid gland at diffe-
rent functional stages. Endocrinology., 38., 270.,
1946.-
13. DESCLIN L. Detection de substances pentosonucle-
iques dans les cellules du lobe anterieur de l'
hipophyse du rat et du cobaye. C. R. Soc. Biol., 133
457.-1940.-
- X 14. FRIEDGOOD H. B. and A. B. DAWSON.- Cytologic evidence
of the gonadotropic activity of the rabbits an-
terior hypophysis. Endocrinology., 22., 647., 1938.-
- X 15. FRIEDGOOD H. B. and A. B. DAWSON.- Physiological sig-
nificance and morphology of the carmine cell of
the cats anterior pituitary. Endocrinology., 26., 1022., 1940.-
- X 16. FRIEDGOOD H. B. and A. B. DAWSON.- Inhibition of t
the carmine cell reaction in the pituitary of cat
which mate but do not ovulate. Endocrinology., 30.,
252., 1942.-
17. GEMELLI A.- Nuovo contributo alla conoscenza
della struttura dell'ipofisa dei mammiferi. Riv. di
Fis. Mat. e Sci. Nat. Pavia., 6., 1., 1905.-
18. HERRING P. T.- The histological appearances of t
the mammalian pituitary body. Quart. J. Exp. Physiol.
1., 121., 1908.-
19. HARTMAN J. F.- Seasonal cytological changes in
the anterior hypophysis of the garter snake. Am. J.
of Anat., 75., 121., 1944.-
20. HARTMAN J. F., W. R. FAIN and J. M. WOLFE.- A cytol-

gycal study of the anterior hypophysis of the dog with particular reference to the presence of a four cell type. *Anat. Rec.*, 95., 11., 1946.-

21. LILLIE R. D. - Histopathologic technic. Blakiston. Filadelfia. 1948.-

22. MASSELIN J. N. - Variaciones histologicas estacionales en la hipofisis del sapo *Bufo arenarum* H. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 16., 581., 1940.-

23. PRIETO DIAZ H. E. y ECHAVE LLANOS J. M. - Citologia de la porción distal de la hipofisis del *Bufo Arenarum* Hensel. *Archivos de histología normal y patológica.*, 3., 541., 1947.-

24. RAHN H. - The development of the chick pituitary with special reference to the cellular differentiation of the pars buccalis. *J. Morph.*, 64., 483., 1939.

25. RAHN H. and B. T. Painter. - A comparative histology of the bird pituitary. *Anat. Rec.*, 79., 297., 1941.

26. ROMEIS B. - Guia formulario de tecnica histologica. Edt. Labor. Barcelona. 1928.-

27. SCHÖNEMANN A. - Hypophysis und thyreoidea. *Wirkchows Archiv.*, 129., 310., 1892.-

28. Villalobos Dominguez C. y J. Villalobos. - Atlas de colores. El Ateneo. Buenos Aires 1947.-

29. WOLFE J. M. and A. D. BROWN. - Action of diethylstilbestrol on cytological characteristics of anterior pituitaries of female rats together with certain observations on the effect of castration. *Endocrinology.*, 31., 467., 1948.-

..... 

See 28/10/53



[Handwritten signature]
RAFAEL G. ROSA
PROSECRETARIO

28-10-53
2

.....