

ESTUDIO HISTOQUIMICO DE OCHO CASOS DE AMILOIDOSIS CUTANEA POCO FRECUENTES *

*Dr. J. Di Prisco ***

El depósito de una substancia hialina y homogénea en las paredes de los vasos y en tejido conjuntivo, fue observada por varios investigadores antes de que Rokitansky (1) la describiese como "enfermedad lardácea" en 1842. Virchow, en 1853, denomina amiloide a esta substancia por tomar con el iodo un color parecido al que toma el almidón. Ya este mismo autor considera el amiloide como compuesto por carbohidratos y más tarde, Eppinger (1) en 1922 y Hass (2) en 1942, muestran que en verdad se trata de una substancia que contiene carbohidratos y proteínas.

La mayor parte de los trabajos relacionados con el comportamiento histoquímico del amiloide se ha realizado en material obtenido de amiloidosis secundaria, primaria sistematizada o experimental, pero más frecuentemente de la forma secundaria. Hemos encontrado pocas referencias de trabajos histoquímicos sobre amiloidosis primaria cutánea pura (3), (4), (5), (27).

MATERIAL Y METODOS

Este trabajo fue realizado sobre un material obtenido de siete casos de amiloidosis cutánea de forma pigmentaria difusa del tipo de la descrita por Palitz y Peck (5) y un caso de amiloidosis nodular primaria cutánea pura. Este material, desde el punto de vista clínico, ha sido motivo de una publicación reciente (6).

Las biopsias fueron tomadas de la espalda, piernas y brazos, sitios donde la alteración pigmentaria era mucho más acusada. Se utilizó

* Trabajo realizado en el Laboratorio de Patología Experimental (Director, Dr. Luis Carbonell) del Instituto de Investigaciones Científicas. El material clínico proviene de la consulta privada del autor y de las consultas externas del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Caracas y de Dermatología del Instituto Venezolano de los Seguros Sociales (Especialidades).

** Profesor Titular de Clínica Dermatológica y Sifilográfica de la Universidad Central de Venezuela. Hospital Universitario.

fijación en formol neutro y Carnoy. Se incluyó en parafina y se obtuvieron cortes aproximadamente de 10 micras.

Se distribuyó el material de acuerdo con la substancia que se quería demostrar, tomando en cuenta el número disponible de cortes, en tres grupos: grupo PAS, Metacromasia y Proteínas y Misceláneas. Los cuadros 1, 2 y 3 ilustran esta distribución, así como los resultados.

	PAS	PAS-AB	PAS AMILASA	PAS ACETILACIÓN	PAS BLOQUEO ALDEHIDO	PAS DENATURACIÓN	PAS BUNNELL	PAS PEPISNO	PAS METILACIÓN ⁽¹⁾
3826	+	+ AZUL	+	PAS O	NO	+ PAS	NO	NO	NO
3900	+	+ PAS	+	NO	NO	+ PAS	NO	NO	NO
3910	+	+ AZUL	+	PAS O	PAS O	+ PAS	NO	+ DEBIL	+ DEBIL ⁽²⁾
3967	+	+ AZUL	+	NO	PAS O	+ PAS	NO	+ DEBIL	+ DEBIL
2705	+	+ AZUL	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO
2742	+	+ AZUL	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3771	+	+ PAS	+	PAS O	PAS O	+ PAS	+ ROJO	+ DEBIL	+ DEBIL
M	+	+ PAS	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO

(1) DEMETILACIÓN: PAS +.
 (2) CARNOY TOTALMENTE NEGATIVO

PAS

	RESI DE TOLUIDINA	CONTR. VIOLETA	VIOLETA DE METILO	VALBUENA PASA A.T.	TRIPSINA A.T.	METILACIÓN 34. 60°C. A.T.	METILACIÓN 34. 25°C. DENATURACIÓN A.T.	TRIPSINA VALBUENA PASA A.T.	TRIPSINA VALBUENA PASA A.T.	RIBONUCLEASA A.T.	
3826	β ++	+	+	β Y ++	NO	DEBIL +	DEBIL +	NO	NO	β ++	NO
3900	β +	+	+	NO	NO	O	NO	NO	NO	NO	NO
3910	β +	+	+	NO	NO	O	O	NO	NO	NO	NO
3967	β ++	+	+	β Y +++	β ++	DEBIL +	DEBIL +	β ++	NO	β +	NO
2705	β ++	+	+	β +++	β ++	O	NO	NO	NO	β ++	NO
2742	β +	+	+	β ++	β +	NO	NO	NO	NO	NO	NO
3771	Y ++	+	+	β Y ++	β ++	DEBIL +	DEBIL +	β ++	DEBIL +	β ++	β ++
M	β ++	+	+	β Y +++	β ++	NO	NO	NO	DEBIL +	NO	NO
carnoy	β Y ++	+	+	NO	NO	NO	β ++	β Y ++	β ++ ⁽¹⁾	Y ⁽¹⁾ +++	NO
3771	β ++	+	+	NO	NO	O	NO	NO	β ++ ⁽¹⁾	NO	NO
3962	β ++	+	+	NO	NO	O	NO	NO	β ++ ⁽¹⁾	NO	NO

(1) MATERIAL FUERTEMENTE DIBERIDO

METACROMASIA

	ALCIAN BLUE	A. B. CROMOTROPOL	HEMEO COLOIDA	ROJO COMO	VERDE COMO	DEBIL +	NO	NO	VERDE	NO	NO	NO	+	NO	NO
	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	DEBIL +	NO	NO	VERDE	NO	NO	NO	+	NO	NO
3826	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	DEBIL +	NO	NO	VERDE	NO	NO	NO	+	NO	NO
3900	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	DEBIL +	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	+	0
39 10	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	+	NO	NO	NO	AMARILLO	NO	NO	+	NO	NO
3967	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	+	NO	NO	VERDE	AMARILLO	NO	NO	+	+	0
2705	AZUL	AZUL	AZUL ROJO	+	+	0	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	NO	NO
2742	AZUL	AZUL	ROJO	+	+	DEBIL +	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	+	NO
3771	AZUL	AZUL	AZUL ROJO	+	+	+	NO	NO	VERDE	NO	NO	NO	+	+	0
M Carnoy	AZUL	ROJO	AZUL	+	+	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	+	NO	NO
3771	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0	NO	NO	NO	+	NO	NO	NO
3962	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	0	NO	NO	NO	+	NO	NO	NO

(1) FLUORESCENCIA AMARILLA.

PROTEINAS Y MISCELANEAS

Para el grupo PAS y demostración de propiedad metacromática se emplearon bloques viejos fijados en formol neutro. Para demostración de triptofano (1) se usó material con no más de 24 horas de fijación en formol neutro. Para la demostración de RNA y DNA se usó material fijado en Carnoy.

Estudiando el efecto del fijador, se utilizaron cortes fijados tanto en formol como en Carnoy para la realización de algunas de las técnicas.

GRUPO PAS. Se hizo la técnica del PAS (10), la cual se combinó con diferentes variantes que se enumeran a continuación.

Alcian-blue-PAS. Se tiñeron los cortes con Alcian blue al 0,1 por ciento por 30 minutos y luego se procedió al PAS.

Acetilación. La acetilación (7) se obtuvo sumergiendo los cortes por seis horas a 58° C. en una mezcla de Acido acético y Piridina en la proporción 2:3. Se lavaron luego por 1-2 minutos con etanol absoluto y se pasaron rápidamente por agua. Se siguió luego la técnica del PAS.

Bloqueo de Aldehidos. Para bloquear los aldehidos (8) se usó una mezcla de 9 c.c. de Anilina y 8 c.c. de HCl y se sometieron los cortes a la acción del reactivo por tres horas, después del ácido periódico. Luego se siguió la técnica del PAS.

Deaminación. Los cortes se sometieron (1) a la acción de una mezcla de partes iguales de Nitrito de sodio al 5 por ciento y Acido acético al 10 por ciento por cuarenta y ocho horas a la temperatura de 0° a 4° C. Luego se procedió al PAS.

Metilación. La metilación se realizó (9) ..sometiendo los cortes a la acción de una solución 0,1 N de HCl en metanol por tres horas a 60° C. También se utilizó otro procedimiento (9), que consiste en dejar los cortes en el mismo reactivo por tres días a la temperatura ambiente. Luego se procedió al PAS.

Demetilación. Cortes de control se demetilaron sumergiéndolos en Hidróxido de potasio al 1 por ciento en etanol al 80 por ciento por veinte minutos (9).

Pepsina. Antes de realizar el PAS, se sometieron los cortes (1) por tres horas y a 37° C., en una solución de pepsina cristalina en 0,02 N de HCl a la concentración de 2 mg/ml.

METACROMASIA. Para el estudio de la metacromasia se utilizó Azul de Toluidina al 0,5 por ciento, pH 4,5 con la siguiente técnica:

Desparafinar en la forma usual.

Tinción por 2 con la solución de Azul de Toluidina.

Lavar con acetona para eliminar el exceso de colorante.

Lavar con Xilol-Acetona a partes iguales.

Aclarar en Xilol y montar.

Hialuronidasa-Azul de Toluidina. Los cortes se mantuvieron por seis horas a 37° C. (9) en una solución de hialuronidasa testicular en 0,1 M "buffer" fosfato pH 6,0 y a una concentración de 0,4 mg/ml. Luego tinción con Azul de Toluidina al 0,1 por ciento por un hora.

También se usó otra variante (1) incubando los cortes por tres horas a 37° C. en una solución de hialuronidasa testicular en Cloruro de sodio al 0,85 por ciento a la concentración de 1 mg/ml. Lavar con agua destilada y teñir con Azul de Toluidina al 0,1 por ciento por veinte minutos.

Tripsina-Azul de Toluidina. Los cortes permanecieron por una hora a 37° C. en una solución de tripsina a la concentración de 0,1 mg/ ml. en "buffer" fosfato 0,05 M a pH 8,9. Luego se procedió a la coloración con Azul de Toluidina arriba señalada.

Pepsina-Azul de Toluidina. Se dejó actuar la pepsina en la forma ya anotada y se procedió a la coloración con Azul de Toluidina.

Tripsina-Hialuronidasa-Azul de Toluidina. Se dejó actuar tanto la tripsina como la hialuronidasa, una después de la otra, en la forma ya señalada y se coloreó con Azul de Toluidina.

Metilación-Azul de Toluidina. Se procedió de acuerdo con lo descrito anteriormente.

La metacromasia con Cristal violeta (10) y con Metil violeta (1) se obtuvo según técnicas bien conocidas.

PROTEINAS. Para la reacción del Tetrazonio se utilizó una solución de Fast Blue B (1) al 0,2 por ciento en Tris "buffer" a un pH 9,2. Los cortes permanecieron por cinco minutos en el reactivo a la temperatura ordinaria. Luego lavado con agua corriente y tres cambios de dos minutos cada uno en "buffer" Veronal acetato a pH 9,2. Sumergir luego los

cortes en una solución saturada (1 gr. en 50 c.c.) de H-ácido (8-aminonaphthol-3-6-disulphonic acid), en "buffer" Veronal acetato a pH 9,2 por quince minutos. Lavar en agua por tres minutos. Deshidratar en alcohol, aclarar en xilol y montar.

Reacción de Millon. Se usó la modificación de Bensley y Gersh (1).

Reacción de Adams. Para la determinación del triptofano, según esta técnica, los cortes deben provenir de alcohol absoluto dejándolos secar al aire. Sumergirlos luego en una solución al 5 por ciento de p-dimetilaminobenzaldehido en HCl concentrando por un minuto. Transferir inmediatamente a una solución de nitrito de sodio al 1 por ciento en HCl concentrando por un minuto. Lavar en agua corriente por treinta segundos. Lavar en alcohol-ácido a 1 por ciento por un minuto. Deshidratar, aclarar y montar.

Ribonucleasa-Verde metilo-Pironina. Antes de proceder a la reacción de Kurnick (1) se hace actuar por una hora a 37° C., una solución de ribonucleasa en agua destilada al 0,5 mg/ml (1).

FLUORESCENCIA. La fluorescencia fue investigada por medio de dos técnicas: PAOS y Tioflavina.

PAOS. (11) Reactivos

Metabisulfito de potasio	250 mg.
Acridine orange.....	25 mg.
HO al 0,5 por ciento	50 ml.

Procedimiento:

Llevar los cortes hasta agua de la manera usual.

Acido periódico cinco minutos.

Lavar en agua corriente por un minuto.

Acridine orange por diez minutos.

Lavar en "buffer" citrato-fosfato pH 3,8 por dos minutos.

Examinar sin cubrir la lámina.

Sin embargo, nosotros deshidratamos rápidamente los cortes en alcohol y pasamos por xilol. Montamos en Fluormont.

Los cortes se examinaron al microscopio con luz ultravioleta. Lámpara Osram HBO 200. Filtros de excitación UG 5 y UG 2.

Tioflavina (12).

Llevar los cortes hasta agua corriente.

Teñir con Tioflavina T al 1 por ciento por un minuto.

Diferenciar con ácido acético al 1 por ciento por diez minutos.

Deshidratar y montar.

Los cortes fueron examinados en la misma forma que los anteriores.

DISCUSION

Analizaremos separadamente cada uno de los cuadros.

PAS. En la reacción ácido periódico-Schiff, el ácido periódico rompe los enlaces C C especialmente en los grupos 1,2 glicol para convertirlos en aldehidos. Estos no son ulteriormente oxidados y pueden ser localizados por una reacción de coloración con el reactivo de Schiff. Grupos hidroxil-aminos también son capaces de ser atacados y convertidos en aldehidos. En nuestros casos el bloqueo de aldehidos fue seguido de PAS negativo. Asimismo, la deaminación fue seguida de PAS positivo. La acción de la amilasa fue negativa, es decir que al persistir el PAS se elimina la posibilidad de la presencia de glícógeno.

La acetilación permite controlar la especificidad de la reacción de PAS. En efecto, la acetilación bloquea a los grupos hidróxilo y amino y por consiguiente impide la oxidación en aldehidos por el ácido periódico. Al mismo tiempo, como algunos lípidos del tipo de los glicolípidos o fosfolípidos (9) dan PAS positivo, aunque por un mecanismo algo diferente al de los carbohidratos, la acetilación no es capaz de prevenirla y sirve así para diferenciar y precisar la naturaleza de carbohidrato de la sustancia amiloide (14), (15).

La metilación (9) también actúa inhibiendo la reacción de PAS por efecto sobre los 1,2 glicol. Sin embargo, en nuestros casos este efecto inhibitorio no fue completo como con la acetilación y después de metilar los cortes por dos técnicas diferentes, como ya hemos anotado, el PAS persiste muy débilmente positivo. La demetilación restauró en toda su intensidad la reacción de PAS. En este punto señalamos una ligera diferencia con los resultados obtenidos en el estudio histoquímico de un único caso de amiloidosis cutánea publicado por Braunstein y Buerger (3), quienes con la metilación, al igual que con la pepsina, anotan una total supresión del PAS. Nosotros encontramos solamente una importante disminución de la intensidad, pero con cierta persistencia, tanto con la metilación como por acción de la pepsina. Larsen (16) también señala negatividad del PAS por la pepsina en amiloide secundario.

Aspecto de interés está dado por la reacción Alcian-blue-PAS. Cinco de nuestros casos toman coloración azul demostrando la presencia de un mucopolisacárido ácido, los otros, incluyendo el caso de amiloidosis nodular, muestran una coloración roja producida por el PAS.

METACROMASIA. La sustancia amiloide es capaz de producir, bajo la acción de ciertos colorantes, una coloración distinta al color del producto colorante. Esta propiedad es bien conocida cuando se usa Cristal violeta, Violeta de metilo y Azul de Toluidina. Sin embargo, según Larsen (17) la metacromasia del amiloide con Azul de Toluidina no puede comprobarse normalmente y sólo después de la digestión péptica

aparecería. Sin entrar a discutir las características del fenómeno de la metacromasia, motivo de una extensa bibliografía, precisaremos que en nuestros casos hemos obtenido sistemáticamente una metacromasia positiva, principalmente de tipo beta, tanto para el Cristal violeta y el Violeta de metilo como para el Azul de Toluidina. Windrum y Kramer (18) encuentran que después de una digestión de seis horas con pepsina, la reacción ortocromática se transforma en metacromática, interpretando que el componente metacromático, de naturaleza mucopolisacárido, está unido a una proteína de la cual queda en libertad bajo el efecto de la enzima y capaz de producir metacromasia. Estos mismos autores piensan que la metacromasia de la substancia amiloide no sería una verdadera metacromasia. Opinan que los colorantes utilizados contienen fracciones de diferentes colores, cromatográficamente demostrables y responsables de la coloración metacromática del amiloide.

Para Kelly (19) los colorantes derivados de la Thiazina son los más efectivos, entre ellos la Toluidina y los Azur, y piensa que la cromatografía elimina la posibilidad de interpretar la metacromasia como depósitos de impurezas del colorante. La temperatura, al aumentar la carga fónica, aumenta la metacromasia. Las proteínas básicas suprimen la metacromasia. Las enzimas, al eliminar el factor proteínico, aumentan la metacromasia. La metilación hace perder la metacromasia y la sulfatación la acentúa y la hace aparecer. Los grupos químicos que según este autor son capaces de producir metacromasia, son los, siguientes -COO -OSO₃ -OPO₃ -OPO₃H.

Para Lison (20) la metacromasia es la característica de los radicales sulfatados de los mucopolisacáridos ácidos, pero también el radical carboxilo, podría ser metacromático. El primero es el del Acido Condroitinsulfúrico y el segundo el del Acido Hialurónico.

Para Balanger (21) y Carnes (22) la metacromasia del amiloide es debida a la presencia de un mucopolisacárido de tipo condroitin sulfúrico. Braunstein y Buerger (3) en cambio, afirman que el responsable de la metacromasia del amiloide es un mucopolisacárido de tipo carboxilado y no sulfatado, no bloqueado por la acetilación, digestión péptica ni por la hialuronidasa. Según Kantor y Schubert (23) la metilación suprime la metacromasia, pero ésta no es restaurada por la saponificación cuando se trata de un mucopolisacárido sulfatado y sí la restaura cuando se trata de un mucopolisacárido de tipo carboxilado. Hass (2) y Meyer (24) opinan en cambio que el mucopolisacárido ácido del amiloide es de tipo sulfatado.

El comportamiento de la metacromasia en nuestros casos permite observar que se pudo obtener tanto por el Cristal violeta y Violeta de metilo como por el Azul de Toluidina. La hialuronidasa acentuó de manera extraordinaria la intensidad y el tipo de la metacromasia. En algu-

nos casos, como en los 3826, 3967, 3771 y en la forma nodular, apareció una verdadera metacromasia gamma y se hicieron metacromáticas zonas que originariamente habían reaccionado ortocromáticamente. Esto nos permite decir que la metacromasia en nuestros casos no es producida por el ácido Hialurónico y sugeriría la presencia de un mucopolisacárido ácido de tipo sulfatado.

La tripsina no afectó casi la acción metacromática. Su intensidad y su tipo permanecen inalteradas después de la acción enzimática. En cambio, la pepsina redujo el efecto de la metacromasia en forma apreciable y la metilación la eliminó totalmente en algunos casos y la redujo notablemente en otros, produciendo siempre un efecto inhibitor importante. La demetilación restauró la metacromasia a su intensidad original. De acuerdo con la observación de Kantor y Schubert (23), el mucopolisacárido de nuestro amiloide sería de tipo caboxilado y esto estaría en desacuerdo con el efecto de la hialuronidasa.

La acción combinada de la tripsina y de la ribonucleasa no alteró el comportamiento de la metacromasia y la ribonucleasa tampoco la modificó.

Sí debemos señalar la diferencia de la respuesta al tratamiento de la metacromasia con distinto fijador utilizado. En efecto, la pepsina, que había disminuido la metacromasia producida por el Azul de Toluidina en material fijado en formol, no produjo ninguna alteración en la capacidad metacromática de los focos de amiloide cuando estos se estudiaron en material fijado en Carnoy. En cambio, encontramos una mayor destrucción de tejido por la acción enzimática.

PROTEINAS Y MISCELANEAS. La reacción de Tetrazonio positiva demuestra la presencia de un componente proteínico importante. Interesa señalar que esta reacción fue totalmente negativa cuando se usó material fijado en Carnoy. En todos los casos se pudo obtener demostración de triptofano con la reacción de Adams en mayor o menor intensidad y aun cuando es bien conocida la presencia de histidina en el amiloide, el único caso en el cual pudimos realizar la reacción de Millon ésta fue negativa. La coloración verde obtenida con el Tricrómico de Gomori, asimila el amiloide a la naturaleza del colágeno, pero el color amarillo obtenido con el Van Gieson no confirma esta manera de ver.

El material fijado en Carnoy fue tratado para la reacción de Kurnick, la cual dio coloración roja en los sitios de amiloide. La ribonucleasa impidió esta coloración. Braunstein y Bueigei (3) anotan la negatividad del Fuelgen y descartan con ello la posibilidad de que la metacromasia sea producida por grupos fosforados del ácido nucleico. Pero como quiera que la ribonucleasa sólo actúa depolimerizando y la reacción de Fuelgen sólo demuestra la presencia de DNA, podría pensarse que existe RNA

depolimerizado después de la ribonucleasa y capaz todavía de dar metacromasia positiva.

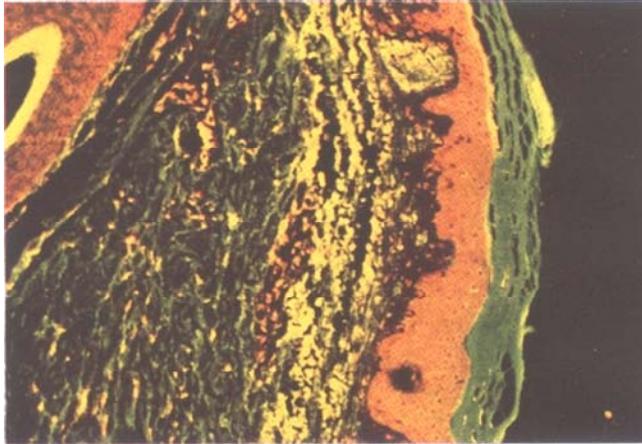
En todos los casos se obtiene una coloración azul cuando se usa la técnica del Alcian blue, lo que permite pensar en la presencia de un mucopolisacárido ácido. Esta coloración persiste cuando se hace la reacción Alcian blue-Cromotrope, menos en el caso de tipo nodular, donde la coloración es francamente roja. Es evidente que esto lleva a pensar que en este tipo de amiloide no predomina el mucopolisacárido ácido.

Esta conclusión está en franco desacuerdo cuando se analiza la reacción de Hale del hierro coloidal y se demuestra una sorprendente irregularidad en los resultados. Casos que habían reaccionado en azul, tanto para el Alcian blue solo como para el Alcian blue-Cromotrope, muestran coloración roja y no azul como correspondería darlo a los mucopolisacáridos ácidos con el hierro coloidal. En cambio, en el caso de forma nodular que mostraba color rojo con el Alcian-blue-Cromotrope, con el hierro coloidal muestra una bella coloración roja.

El Rojo Congo, colorante clásico para detectar la presencia de sustancia amiloide, se mostró positivo en todos los casos. Es bien conocida la tesis de que este colorante no puede ser considerado específico para el amiloide, dada la irregularidad de los resultados. Paerse (1) le da considerable importancia; en cambio, Maiak y Smith (4) lo consideran de poco valor. El fenómeno de la birrefringencia producido por el amiloide teñido con Rojo Congo es anotado por Seitelberger (citado por Paerse) (1), como una característica del amiloide sin ser específico, fenómeno este que también aparece cuando se tiñe el amiloide con otros colorantes diazoicos, además del Rojo Congo, como el Azul de Evans, Chlorantin Fast Red, etc. Relacionado con esto estaría la coloración anómala que se observa cuando se examina el amiloide tratado con Tetrazonio a la luz polarizada. El hecho parece ser debido a la forma cómo las partículas de colorante se orientan con respecto al plano de vibración de la luz. Vickerstaff (citado por Pearse) (1), establece que a bajas concentraciones se obtiene mejor el fenómeno de la birrefringencia.

La observación de material sospechoso de amiloide con luz polarizada debe realizarse siempre cuando se hace la tinción con Rojo Congo, con el objeto de ayudar mucho a la identificación de la sustancia.

Otro procedimiento, que según Malak y Smith (4) debe ser utilizado para la identificación del amiloide, es el estudio de la fluorescencia. Los autores proponen el uso de la Tioflavina T según la técnica de Vassar y Culling (12), como método útil para diferenciar amiloide de otras sustancias amorfas. Opinan que ni el Rojo Congo ni la metacromasia son elementos suficientemente específicos. En cuatro de nuestros casos pudimos realizar la técnica anotada con obtención de una fluorescencia verdosa en todos los casos. También utilizamos la Acridina orange según



Microfotografía de PA OS. Puede verse la fluorescencia amarilla en la zona de amiloide.

la técnica del PAOS (11) que se detalla anteriormente, obteniendo siempre una bellísima fluorescencia amarilla que detecta el amiloide en sitios donde no se había podido ubicar según los procedimientos convencionales.

El Sudan black fue negativo. Utilizamos la técnica de Berenbaum (1) debido a que todo el material disponible estaba incluido en parafina.

Debemos también señalar algunos hechos que consideramos de interés. Siempre se nos apareció el amiloide demostrando una estructura fasciculada y muchas veces las diferentes técnicas usadas no colorearon uniformemente toda la zona ocupada por el amiloide, sugiriendo una diferencia de estructura por diferente afinidad tintorial o por diferente capacidad de reacción química a los reactivos.

En algunos casos, como en el 3900 y en M, encontramos una importante reacción celular que faltaba completamente en los otros preparados. La mayor parte de las veces el amiloide se acumula en la dermis subpapilar en focos bien precisados, pero en algunos casos como en el 3910 era escaso y diseminado. En muchos de los cortes del 3900 el amiloide se ubicaba en forma de banda homogénea en dermis subpapilar.

La intensidad y la diseminación del amiloide en el caso de forma nodular es realmente sorprendente. Hasta el tejido subcutáneo y la grasa se encuentran infiltrados con la sustancia amiloide.

COMENTARIOS

Es muy probable que la substancia amiloide no esté constituida de manera homogénea, uniforme y regular aun en un mismo tipo de amiloidosis clínica. Posiblemente hay diferencias de estructura y composición química para los diversos tipos de amiloide primario, secundario y experimental. Si esto es así, se podría explicar la disparidad que se encuentra en el comportamiento histoquímico de este material.

Se acepta que el amiloide es una proteína en asociación con un polisacárido. Briggs (25) señala que según trabajos de Hass el 0,5 por ciento al 1,5 por ciento de la substancia amiloide es de naturaleza polisacárida. Benditt y col. (26), trabajando en amiloide secundario del bazo, encuentran que los métodos de extracción demuestran la presencia de un componente proteínico rico en triptofano y en tirosina.

Nuestros resultados nos permiten asentar que el amiloide estudiado ofrece suficientes elementos para pensar que su composición podría considerarse como un complejo proteínico y mucopolisacárido. La fracción proteínica es rica en triptofano y el mucopolisacárido presenta un componente carboxilado y otro sulfatado.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se hace un estudio histoquímico del material obtenido de ocho casos de amiloidosis cutánea primitiva. Siete de ellos corresponden a la forma pigmentaria difusa y uno a la forma nodular. Se revisa el comportamiento de la reacción de PAS bajo diferentes procedimientos de tipo histoquímico. Se revisa el comportamiento de la metacromasia y se estudia la fracción proteínica del amiloide.

CONCLUSIONES:

1. El comportamiento del material amiloideo frente a la reacción de PAS bajo diferentes procedimientos histoquímicos, sugiere la presencia de un mucopolisacárido.
2. El estudio de la metacromasia tiende a demostrar que este mucopolisacárido podría ser de tipo ácido y a la vez sulfatado y carboxilado. El comportamiento del material frente a diversas reacciones del tipo de Alcian blue, Hierro coloidal, etc., deja pensar que este mucopolisacárido existe en intensidad y en tipos variables.
3. El estudio de las proteínas demuestra la presencia de un componente proteínico importante y rico en triptofano.

4. La reacción de Kurnick positiva y la persistencia de la metacromasia después de la acción de la ribonucleasa, permitiría pensar en la presencia de un componente RNA que aún depolimerizado deja persistir grupos fosforados.

S U M M A R Y

Histochemical study of 8 cases of amiloidosis cutis is made. 7 cases are of macular difuse form, and 1 case of nodular form.

PAS reaction and metachromasia are studied under diverse histochemical techniques. The results show an acid mucopolysaccharid both sulphated and carboxilated.

The proteinic fraction is very important and rich in triptophan.

The positive Kurnick reaction and persistent metachromasia after ribonuclease action show the possibilities of RNA component.

R E S U M É

On presente une revision histochimique de 8 cases d'amyloidose cutanée. Un cas de forme nodulaire et 7 cases de forme pigmentaire diffuse et generalisé.

La reaction de PAS, la metachromasia avec different techniques histochimiques, et les proteines de la substance amyloide on etait etudies.

On pense dans la présence dune substance mucopolysaccharide dans l'amyloide. Ce mucopoly saccharide peut etre du type sulphaté et carboxilé. L'etude a démontré la présence d'une fraction proteinique riche en triptophane. D'après le comportement du material en face de quelques reactions du type du Alcian blue, Fer colloidal, etc., fait dejó penser qu'il existe un mucopolysaccharide d'intensité et du type variable.

La positivité de la reaction de Kurnick et la persistence de la metachromasia après faction de la ribonucleasa, permettrai fait penser dans la présence d'un component RNA malgré la depolimerization persistent les groupes phosphorilé.

B I B L I O G R A F I A

1. Pearse, A. G. E. Histochemistry-Theoretical and Applied. 24 Edtiion, J. & A. Churchill Ltd. London. 1960.
2. Haas, G. Isolation of Polysaccharides from Amyloid-Bearing Tissues. Arch. Path. 34: 92, 1942.
3. Braunstein, H., and Buerger, L. A Study of The Histochemical and Staining Characteristics of Amyloid. The Am. Jour. of Path. 35: 791, 1959.

4. Malak, A., and Smith, E. W. Secondary Localized Cutaneous Amyloidosis. *Arch. of Derm.* 86: 465-477, 1962.
5. Palitz, L. L., and Peck, S. Amyloidosis Cutis: A Macular Variant. *A.M.A. Arch. Derm. and Syph.* 65: 451-457, 1952.
6. Di Prisco, J., Campos, I., y Gómez C., L. Sobre ocho casos de amiloidosis cutánea de forma poco frecuente. *Dermatología Venezolana*, Vol. III, Nos. 1 y 2, págs.
7. Lillie, R. D. *Histopatologic Technic and Practical Histochemistry*. The Blakiston Company Inc. New York, 1954.
8. Bruce Casselman, W. G. *Histochemical Technique*. John Wiley & Sons Inc. New York, 1962.
9. Barka, T., and Anderson, P. J. *Histochemistry-Theory, Practice, and BiLliography*. Hoeber Medical Division. New York, 1963.
10. Armed Forces Institute of Pathology. *Manual of Histologic and Special Staining Technics*. 24 Edition. Washington, 1960.
11. Betts, A. The substitution of Acridine Orange in the Periodic Acid-Schiff Stain. *Am. Jour. of Cl. Path.* 36: n° 3, 240-243, 1961.
12. Vassar, P. S., and Culling, C. F. et al. *Fluorescent Stains: With Special Reference to Amyloid and Connective Tissue*. *AMA. Arch. Path.* 68: 487, 1956.
13. McMannus, J. F. A., and Cason, J. E. Carbohydrate Histochemistry Studied by Acetilation Technique. *J. Exper. Med.* 91: 651, 1950.
14. Wolman, M. Staining of Lipids by the Periodic Acid-Schiff reaction. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 75: 563, 1950.
15. Wolman, M. The Lipds Stained by the Periodic Acid-Schiff Technic. *Stain Technol.* 31: 241, 1965.
16. Larsen, B. Metachromasia inhibiting Components in Amyloid. *Jour. of Ilistochem. and Cytochem.* 6: 181, 1958.
17. Larsen, B. Metachromasia of Amyloid with Toluidine Blue. *Acta Path. et Microb. Scand.* 43: 265, 1956.
18. Windrum, G. M., and Kramer, H. Some Observations on the Histochemical Reactions of Amyloid. *Arch. Path.* 63: 373-378, 1957.
19. Kelly, J. W. The use of Metachromasy in Histology, Cytology and Histochemistry. *Acta Histochemica.* 5: Sup. 1-85, 1958.
20. Lison, L. *Histochimie et Cytochimie animale*. Gauthier-Villars, 1953.
21. Balanger, L. F. Persistent Toluidine Blue Metachromasie. *The Jour. of His toch. and Cytochem.* 8: 75, 1960.
22. Carnes, W. H., and Forker, B. R. Metachromasy of Amyloid. A Spectrophotometric Study with particular reference to the dye Chromotrope. *bond. Lab. Investi.* 5: 21-43, 1956.
23. Kantor, T. G., and Schubert, M. A Study for desulfation of Chondro-itinsulfate. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 152, 1957.
24. Meyer, K. The biological significance of hialuronic acid and hialuronidase. *Phyliol. Rev.* 27: 235, 1947.
25. Briggs, G. M. Amyloidosis. *Am. Inter. Med.* 55:943, 1961.
26. Benditt, E. P.; Lagunoff, D.; Eriksen, N. and Iseri, O. A. Amyloid. Extrac tion and Preliminary Characterization of Some Proteins. *Arch. of Path.* 74: 323, 1962.
27. Porto, Jarbas A. Amiloidose cutánea Genuína Clínica e Histopatologia. Rio de Janeiro, 1959.