

REACCIONES HISTOQUIMICAS DE LOS MUCO-POLISACARIDOS, GLICOGENOS, LIPIDOS Y OTRAS SUSTANCIAS DEL DIENTE

por los

Drs. G. B. WISLOCKI, M. SINGER y CH. M. WALDO

De la Universidad de Harvard (Boston, Massachussetts)

Los colorantes básicos azul de toluidina y tionina tiñen muchas células y sustancias del cuerpo en azul, y simultáneamente de púrpura o rojo a otros elementos. Se trata de colorantes metacromáticos, y las sustancias que se dejan por ellos teñir se llaman metacromáticas.

Las principales sustancias metacromáticas son: el ácido mucopolisacárido, incluido el moco, los gránulos de las células arborizadas ("mast granules"), la matriz de los cartílagos hialinos y elásticos, el humor vítreo y las sustancias fundamentales de una de las variedades de tejido conectivo.

En la literatura dental, la mención de los mucopolisacáridos o de las sustancias metacromáticas está limitada a los períodos de desarrollo. Letterer (1932) refiere que la pulpa del diente en desarrollo contiene tejido mucoide ("schleimgewebe"). Holmgren (1940) describe muy brevemente la presencia de sustancias cromotrópicas (ácido mucopolisacárido metacromático) en el órgano del esmalte humano y en la papilla dental de dientes de fetos humano y en algunos roedores. Sin embargo, no se hace mención a la presencia de sustancias cromotrópicas en el diente después del nacimiento. Sylvén (1941) cita a Koelliker, Letterer y Holgren como habiendo descrito la existencia de tejido mucoide en el estroma de la papila dental; sin embargo, se refiere en un capítulo dedicado a las sustancias cromotrópicas en el organismo adulto, proporcionando así una falsa impresión del estado actual del problema.

La presente investigación tiene por objeto demostrar la presencia de sustancias metacromáticas en el diente de feto humano, así como en el de adulto, en el diente de mono y en el de cerdo. En el diente de feto humano, la existencia es abundante en el retículo estrellado del órgano del esmalte y en la sustancia fundamental de la pulpa. En el diente de adulto humano y en el de mono sólo existe en pequeñas proporciones en la pulpa, pero existe abundante en los túbulos

dentinales. Sin embargo, en el diente del cerdo, en su constante desarrollo existe abundante en la pulpa y dentina.

Ello supone la evidencia de que la substancia metacromática es debida a la presencia del ácido mucopolisacárido. El posible papel fisiológico de estas substancias en el desarrollo del diente será tratado más tarde. La presencia de mucopolisacáridos en la dentina no parece haber sido observada antes ni por los histólogos ni por los químicos.

En adición a la metacromasia hemos investigado el glicógeno y colágeno en el diente por una variedad de métodos, y los lípidos por la ticción sudán negro B.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material.—El material humano comprende los maxilares de un feto de unas diecisiete semanas aproximadamente de edad (altura coronaria, 130 mm.) y dientes humanos de adultos de catorce a cuarenta años de edad.

El material de monos, incluídos los de la dentición temporal, así como los de la permanente, todavía no eruptados, fueron obtenidos de dos monos (*Macaca mulatta*) entre uno y dos años de edad.

El material de cerdo de Guinea consiste en incisivos y molares de dos animales adultos.

Preparación de los cortes.—Dado que el empleo de ácidos para la decalcificación hubiera perjudicado la histoquímica del diente, en esta investigación se procedió sin la previa decalcificación. Los dientes adultos humanos y de mono y cerdo fueron cuidadosamente partidos, y la pulpa de algunos de ellos, retirada y fijada. Las pulpas fueron embebidas en parafina, preparándose secciones de cinco micras.

Otros dientes abiertos fueron colocados en varios fijadores. De estos dientes fueron obtenidos cortes de 20-25 micras, que fueron teñidos histológicamente. Varios dientes de los sin haber eruptado, dientes permanentes de mono, fueron preparados de la misma manera.

Los maxilares del feto humano fueron fijados, embebidos en parafina y seccionados sin recurrir a la decalcificación. Esto fué posible porque solamente existían indicios de dentina y esmalte en algunos folículos dentarios.

Fijación y métodos de ticción.—Para la demostración de los mucopolisacáridos metacromáticos en los dientes fueron éstos fijados

y teñidos con el método de Holmgren y Wilander (1937) y el de Holgren (1940), modificado por Sylven (1941). Ambos métodos son satisfactorios, pero el proceder de Sylven (1941) proporciona mejores resultados.

Sylven recomienda la fijación de los tejidos en una solución acuosa al 4 por 100 de acetato de plomo básico (*) durante veinticuatro horas, seguido de la postfijación en formalina neutra al 10 por 100 durante otras veinticuatro horas. Los cortes desparafinados se tiñen en una solución alcohólica (0'5 a 40 por 100) de toluidina azul (0'2 a 1 por 100) durante diez a treinta minutos. Los autores han empleado sistemáticamente, con resultados satisfactorios, una solución al 0'5 por 100 de azul de toluidina preparada con alcohol al 5 por 100, tiñendo los cortes en treinta minutos. Sylven considera este método como específico para los mucopolisacáridos que contengan esteres del ácido sulfúrico.

El ácido mucopolisacárido es basófilo tanto como metacromático (Dempsey, Bunting, Singer, Wislocki, 1947), y su basofilia puede investigarse por distintos medios histológicos. Con este objeto se hicieron cortes de parafina, "cortes" que fueron teñidos con una solución de 0'5 de azul de metileno en agua después de su fijación en el flúido de Zenker. Cortes de material fijado en acetato básico de plomo o en el reactivo de Zenker fueron también teñidos en soluciones ("buffered") rebajadas de azul de metileno en un pH elevado por un procedimiento dado en detalle por estos autores.

Difiriendo de otras sustancias basiófilas, muchas mucopolisacáridas, son tan fuertemente ácidos que se tiñen intensivamente con azul de metileno a pH tres o menos. Ticciones de sustancias en cortes de tejidos con un pH más bajo combinado con clara metacromasia indica la presencia de ácido mucopolisacárido (Dempsey).

Otras secciones de dientes fueron también teñidas por McManus por el procedimiento "ácido periódico Schiff" (1946) y por el método del nitrato de plata amoniacal de Pap (1929). En los tejidos de los mamíferos, el primero de estos métodos consiguió teñir glicógeno, algunos mucopolisacáridos (mucosa epitelial, matrices de cartilago hialino), colágeno (especialmente retículo y membranas basales) y fibrina, además de otras sustancias de composición completamente desconocida. De acuerdo con Lillie (1947), el método depende o está basado en la oxidación de los hidratos de carbono por

los ácidos periódicos formando aldehidos, los cuales se tiñen entonces con el reactivo leucofuchina de Schiff. Este es un método extremadamente sensible para poner en evidencia el glicógeno, si se utiliza con un fijador apropiado. El método de plata de Pap fué utilizado para teñir el colágeno del retículo y calcio, pero para el glicógeno fué empleada una modificación de éste propuesta por Mitchell y Wislocki (1944).

Estos tres métodos fueron usados después de varios fijadores, incluyendo los de Zenker, Rossman (nueve partes de solución sol. sat. de ácido pícrico en abs. alc., una parte de formaldehído, añadido en el momento mismo de usarlo) y el de Bodian número 2 (18 partes 30 por 100 alc., una parte formaldehído y una parte de ácido acético glacial). El fijador de Rossman es de elección para la puesta en evidencia del glicógeno.

El método ácido-periódico Schiff de McManus (1946) fué aplicado a secciones desparafinadas y fueron tratadas con 1 por 100 de solución acuosa de ácido durante cinco minutos, seguido del agente de Schiff por quince minutos, lavándolo después con ácido sulfuroso. Los cortes fueron entonces deshidratados en alcohol, en xylol y montados en bálsamo. Las reacciones, en el grado de ticción, varían del rosa (colágeno) hasta el carmín oscuro (glicógeno o mucosa epitelial). El glicógeno se distingue de otras sustancias así teñidas sometiendo las secciones de control a la acción de la saliva antes de ser teñidas.

Además del empleo de los métodos de McManus y de Pap para la investigación del colágeno y retículo, los cortes de los dientes fueron examinados tiñéndolos con el reactivo de Masson del tejido conectivo. El gris claro utilizado en esta composición tiñe las fibras colágenas. Una sección de diente humano fué asimismo teñida con el método de Waigert, de resorcina fuchina para tejidos elásticos.

El método de protargol de Bodian (1937), modificado por Watson y Barnett (1944), fué aplicado a los cortes de dientes fijados con el fijador número 2 de Bodian. Este método de la plata, de pH neutro, no impregna ni el retículo ni el glicógeno. Tiñe células, fibras nerviosas y calcio. La ticción de dentina por este método fué comparada con el método de plata alcalina de Pap.

También los lípidos fueron investigados en dientes humanos y de monos. Al objeto, el material fué fijado en formalina neutra al

10 por 100 y teñido durante siete y treinta minutos en solución al 70 por 100 de alcohol saturado con negro sudán B.

Examen de las secciones o cortes.—A menos de que las secciones fueran examinadas con luz amarillenta fuerte, la metacromasia aparecía disminuída o completamente perdida. En este trabajo se utilizó como fuente de luz amarillenta un condensador pancromático Zeiss sin filtro azul.

Secciones o cortes relativamente delgados son necesarios para la identificación metacromásica. Por ejemplo, la matriz del cartílago y la mucosa epitelial, ambas de las cuales son fuertemente metacromáticas, tienden a aparecer azules en lugar de característicamente rojas o purpúreas cuando se las examina en cortes demasiado gruesos. Como consecuencia de esta posible variabilidad de gruesos, las secciones o cortes de dientes utilizados en el presente trabajo fueron no siempre metacromáticas, al menos de una manera precisa.

Debe apreciarse también que las secciones no calcificadas de dientes tienden a teñirse de una manera poco precisa con cualquiera de los métodos, siendo algunas partes más profundamente teñidas que otras. Varios factores son probablemente responsables de este hecho. El diferente espesor de cada una de las partes del corte del diente es uno de los factores que contribuyen a ello. Además, la parte interna de la dentina, vecina a la pulpa, tiende a teñirse más profundamente que la dentina periférica. Finalmente, si los túbulos dentinales van en el corte horizontal o verticalmente al plano del corte, determina ello las diferentes áreas y, por ende, el grado de penetración del reactivo. La abertura de los túbulos favorece la más rápida accesibilidad del reactivo.

Reacciones histoquímicas del diente de feto humano.—El teñido metacromático del órgano del esmalte y de la pulpa en los dientes de feto humano y de algunos roedores ha sido referido brevemente por Holmgren (1940), y el del glicógeno, por Sundberg (1924). Nuestro propio estudio sobre el desarrollo del diente ha tenido como propósito el de familiarizarnos nosotros mismos con la distribución exacta y cantidad de substancia metacromática y glicógeno.

La dentina y el esmalte se hallan todavía escasamente extendidos en unos pocos de los gérmenes del diente en los fetos humanos de diecisiete semanas, de forma que nuestra descripción corresponde principalmente a la papila dental y al órgano del esmalte. La substan-

cia fundamental del retículo estrellado del órgano del esmalte es intensamente metacromático, estando lleno de un sinnúmero de granos purpúreos. La metacromasia va disminuyendo y desaparece en el estrato celular intermedio. El citoplasma de las células del retículo estrellado aparece libre de metacromasia alguna y no es visible ni en las de adentro ni más afuera del epitelio del esmalte. La papila dental es menos evidente, menos metacromática que el retículo estrellado. Sin embargo, es menor su diferencia cuando se estudian más intensamente células poliédricas y se observan encapsuladas por la sustancia fundamental, la cual es evidentemente purpúrea. Comparada en su último desarrollo, la pulpa en este estadio es excesivamente celular y contiene relativamente poca matriz. La membrana amelo-dentinal, frente a la parte interior del epitelio del esmalte, es claramente metacromática. En los odontoblastos y dentina, que se encuentran entonces exactamente en el comienzo de su formación, no se aprecia metacromasia alguna.

El glicógeno teñido por el método Schiff, o por la modificación de Pap del Mitchell-Wislocki, es extremadamente abundante en este estadio en las células epiteliales de la cavidad oral, lámina dental y esmalte. Se encuentra en menor cantidad, pero muy apreciablemente, en el epitelio interno y externo del esmalte y en el citoplasma de las células estrelladas del retículo. Está presente asimismo en el epitelio de transición entre la parte interna y externa del epitelio del esmalte (porción cervical), donde ha sido declarado ausente por Sundberg (1924) en material teñido por el carmín de Best. Asimismo se muestra aparente en pequeñas gotitas en las células de la pulpa dental, donde únicamente se han visto trazas por Sundberg. Estas diferencias deben ser probablemente atribuidas al hecho de que los métodos con ácido periódico y la plata ponen de manifiesto el glicógeno mejor que los métodos precedentes (Lillie, 1947). Esto parece demostrar que el glicógeno se encuentra en el diente en desarrollo donde —como en otros tejidos embrionarios—sirve probablemente como una fuente de energía en potencia.

Ha de recordarse que el reactivo de Schiff-ácido periódico tiñe el colágeno y mucosa epitelial tanto como el glicógeno. Colágeno teñido que se muestra bien de manifiesto en los dientes de feto, en los cuales se ha desprovisto de glicógeno por su tratamiento preliminar con saliva. Un delicado conjunto rojizo de fibras colágenas puede

observarse alrededor de las células pequeñas de la pulpa y condensadas como una membrana fundamental en la unión amelo-dentinal. El retículo estrellado del órgano del esmalte, el cual deriva su nombre de su largo proceso de anastomosis de las células estrelladas del ectodermo, no es un retículo colágeno y es teñido muy diferentemente. Aún más: la substancia intercelular fundamental del órgano del esmalte, la cual es fuertemente metacromática, después de teñida con azul de toluidina, resulta virtual, no se tiñe por el método de Schiff-ácido periódico. Es esto una observación interesante porque la substancia fundamental metacromática es un moco epitelial derivado del epitelio del esmalte. Esto a diferencia de otras formas de moco epitelial conocidas (glándulas salivares, células vasculares), el moco del órgano del esmalte no se tiñe por el método Schiff. Se comporta en este aspecto como el ácido mucopolisacárido del tejido conectivo (excepto la matriz del cartílago hialino). Difiere del moco epitelial en otro aspecto. Así como el moco epitelial es ordinariamente visible en las células y secreción, el moco epitelial peculiar del retículo estrellado no tiene antecedentes visibles en las células. En esto muestra un parecido mayor a los mucopolisacáridos de los tejidos conectivos. No existe explicación razonable actualmente porque los hidratos de carbono, en algunos mucopolisacáridos como este mismo, no se ponen en evidencia con el reactivo de Schiff-ácido periódico.

REACCIONES HISTOQUÍMICAS DE LOS DIENTES DE ADULTO Y DE MONO RHESUS

Ticción metacromática.—Los dientes de mono Rhesus y del hombre son tan parecidos en su estructura histológica y reacciones histoquímicas, que pueden estudiarse juntos, como ya ha sido indicado anteriormente, muchos ácidos mucopolisacáridos que se caracterizan por la ticción metacromática tanto como por su capacidad para fijar el azul de metileno a un pH muy bajo.

Cuando cortes de diente adulto sin decalcificar, dientes humanos o de mono, son expuestos al azul de toluidina seguido de la fijación en acetato de plomo básico, los túbulos dentinales son teñidos en púrpura fuertemente o en azul pálido. El color es exactamente localizado en la pared de los túbulos bordeando el lumen o luz. La zona más intensa de los túbulos dentinales, designados con el nombre de membrana de Neumann y descrita por los histólogos como compues-

ta por una substancia fundamental libre de fibrillas. Esta membrana se encuentra entre los lumen a luz de los túbulos dentinales y la matriz fibrilar calcificada de la dentina. Esta última sin teñirse. El lumen de los túbulos dentinales están ocupados por una fibra de Tomes, dentinal, sin teñir, escondiéndose dentro de la dentina, desde los odontoblastos. El lumen entre la membrana de Neumann y las fibras de Tomes han de ser consideradas como espacios virtuales más bien que reales. Sin embargo, debido a la contracción de los procesos protoplasmáticos de los odontoblastos con algunos fijadores, el lumen puede aparecer acentuado. Cuando los túbulos dentinales son cortados normalmente, la ticción metacromática de la vaina de Neumann adquiere la apariencia de anillos purpúreos con su centro sin teñir, y cuando son cortados oblicuamente o longitudinalmente, la membrana se muestra como líneas paralelas rojizas. En estos relativos cortes de dientes sin calcificar, no todos los túbulos aparecen teñidos igualmente, y algunos pocos de ellos pueden llenarse de aire, ofreciendo una apariencia negra.

La metacromasia de la vaina de Neumann está delimitada claramente por la matriz calcificada de la dentina vecinal. Los túbulos dentinales dan pequeñas ramas laterales, las cuales se dividen en pequeñas ramificaciones dentinales, dentro de todas las cuales se extienden las fibras de Tomes. Las delicadas vainas de estos túbulos secundarios se encuentran algunas veces teñidas metacromáticamente.

El esmalte está libre de metacromasia, exceptuando los prismas y husos, que llegan a la unión amelo-dentinal y se extienden por el esmalte o dentro de él. Estas distintas estructuras hipocalcificadas contienen una débil sustancia fundamental metacromática que continúa, aparentemente, a través de la unión amelo-dentinal, con el material metacromático de los túbulos dentinales. Allá donde el proceso odontoblástico cruza la unión amelo-dentinal y llega al esmalte, también aparecen rodeados de delicadas vainas de material metacromático.

En la pulpa de diente adulto de mono y hombre hay una ligera metacromasia. La matriz, más bien celular, compuesta de una mezcla de fibras colágenas y sustancia fundamental, ofrece una ligera metacromasia en algunos sitios y nada en otros. En la capa de odontoblastos, inmediatamente debajo, con visibles variables trazas de metacromasia, más comúnmente vista en la región de la cámara pulpar que en el canal radicular o en ápice. Varios dientes de mono perma-

nentes y no en erupción muestran amplia y profunda metacromasia de la sustancia fundamental de la pulpa, y con este aspecto parecen más bien dientes de feto que de adulto. Esta observación parecería indicar que la metacromasia de la pulpa no declina hasta que el desarrollo está casi completado.

Las células de ésta se ha dicho están ausentes de la pulpa dental del diente humano (Orban, 1929). Nosotros hemos encontrado solamente una, tras meticulosos exámenes de docenas de cortes de dientes humanos y ninguna en parecido número de dientes de mono; debe, pues, aceptarse el que estas células sean extremadamente raras. El presente método muestra los gránulos de las células de asta brillantemente, de modo que ninguna de estas células hubiera podido pasar desapercibida.

Ticción basófila.—Tras la inversión de los cortes de diente humano y de mono en azul de metileno acuoso, la dentina aparece teñida como con el azul de toluidina. Consecuentemente, su apariencia parece deducir que la sustancia metacromática que se presenta en la pared de los túbulos dentinales tiene afinidad por las tinturas básicas y es predominantemente de naturaleza ácida. Es más, cuando las secciones de dientes son teñidas con azul de metileno, con un pH de dos o tres, se observa que la sustancia metacromática y basófila que compone la vaina de Neumann ribetea la tintura básica. En el diente de mono la ticción desaparece alrededor de pH dos, y en el diente humano, entre pH 2, 5 y 3. La ticción basófila con este pH es característica de algunos mucopolisacáridos sulfatados, de los cuales el moco epitelial es un ejemplo (Dempsey, Bunting, Singer y Wislocky, 1947). Las observaciones siguientes sobre la ticción metacromática basófila de la dentina indican que las paredes de los túbulos dentinales poseen una vaina interna clara compuesta de un ácido mucopolisacárido.

Finalmente, debe notarse que la sustancia fundamental de la pulpa de diente adulto es débilmente basófila y su metacromasia correspondientemente reducida.

Ticción por el método Schiff-ácido periódico.—Por este método el proceso protoplasmático de los odontoblastos (fibras de Tomes) aparece de rojo oscuro, mientras las vainas de Neumann quedan sin teñir. La matriz dentinal calcificada es coloreada de manera variable hasta un máximo de ladrillo rojo. La reacción positiva de las fibras de Tomes no es el resultado de tratamiento previo con la saliva y sí,

en consecuencia, debida al glicógeno. La variable ticción de la matriz dentinal puede significar una posible reacción con el colágeno.

En contraposición con la dentina, la sustancia del esmalte no se tiñe. Además, este procedimiento no tiñe el material intersticial que llena las uniones entre los prismas del esmalte y los husos, el cual es teñido por los colorantes básicos.

Las fibras colágenas en la matriz y alrededor de los vasos sanguíneos se tiñen en varios tonos de rosa. No existe glicógeno; sin embargo, en un diente humano fueron encontrados trazas en el endoneurium de fascículos nerviosos.

Ticción del tejido conectivo de Masson.—Esta composición triácida tiñe la matriz fibrilar calcificada de la dentina en gris, y las fibras de Tomes, en rojo-anaranjado; pero no diferencia con las vainas de Neumann. Es decir, que tiñe algunas estructuras, las mismas que fueron hechas patentes en la dentina por el método anterior de Schiff; sin embargo, el fundamento de su ticción difiere evidentemente. La reconocida presencia de colágeno en la matriz dentinal, más la conocida afinidad del colágeno por el factor o elemento gris del reactivo, indican que la ticción de la matriz es debida a las fibras colágenas.

El esmalte no está generalmente teñido; sin embargo, algunas de sus partes ofrecen una débil coloración grisácea. Las células y fibras de la pulpa quedan bien definidas, las fibras colágenas se tiñen de gris. Las fibras asumen la forma de red neta, no obstante ligeros amontonamientos ondulados que se observan.

Método de impregnación de Pap con el nitrato de plata amoniacal.—Siguiendo este método, la matriz calcificada de la dentina y el proceso protoplasmático de muchos odontoblastos se impregnan con plata. Alrededor de los túbulos dentinales se deposita la plata en anillos oscuros o vainas, que sugieren la posesión de contornos interiores o exteriores. Estos depósitos en anillo de plata dan a las preparaciones un aspecto característico. Los anillos o vainas que se hacen patentes por este método no son, al menos aparentemente, las vainas de Neumann, pero rodean a ellas. Esta conclusión se obtiene por la comparación de su diámetro relativo con las fibras de Tomes y los espacios que las circundan, en relación con las vainas de Neumann y el aparentemente límite de la dentina calcificada.

Orban (1926) ha descrito una matriz argirófila en el borde in-

terno de la dentina muy parecida a las vainas que nosotros describimos. Lo refiere a fibras argirófilas, de consistencia precolágena, que no se transforman en fibras colágenas ordinarias de la matriz dentinal. Esto parece nos da una razonable explicación de estas vainas, no obstante el hecho de las distintas diferencias químicas entre las fibras argirófilas y las colágenas ordinarias, que pueden ser debidas a razones de índole física mejor que química. En cualquier caso, las fibras argirófilas en muchas regiones deben considerarse como jóvenes, consideración en consonancia con la observación de que ésta zona argirófila de la matriz dentinal es la parte que ha sido descrita más recientemente. De estas varias consideraciones, parece evidente que estas vainas fibrilares argirófilas rodean la vaina metacromática afibrilar de Neumann.

Las uniones hipocalcificadas de los prismas y husos del esmalte pueden contener cierta cantidad de plata reducida; sin embargo, es difícil asegurar esto, dada la apariencia negruzca que ofrecen estas estructuras, aun sin tinción alguna.

El método de plata de Pap pone en evidencia gran número de fibras colágenas en la pulpa dental, pero las tiñe más bien en marrón que no en negro. Dado que estas fibras son, en general, muy delicadas, entrelazándose a modo de red o retículo fibrilar, como tantas veces se ha observado, es sorprendente que no sean intensa y precisamente argirófilas. Las fibras de Von Korff y los elementos colágenos en las paredes de los vasos sanguíneos constituyen las estructuras más profundamente plateadas.

Método de impregnación de protargol, de Bodian.—Este método se realiza con un pH menos alcalino que el método de Pap y ofrece un cuadro completamente diferente. Los túbulos dentinales son intensamente teñidos en todas sus ramificaciones. Dado el relativo tamaño de las estructuras teñidas, parece evidente que el contenido total de los túbulos, incluyendo las fibras de Tomes y la vaina de Neumann, haya sido impregnado. Rodeando la mayoría de los túbulos ennegrecidos, existe una zona clara que corresponde a la localización de las vainas colágenas argirófilas puestas en evidencia por el método de Pap. A este respecto, debe recordarse que el método de Pap impregna generalmente el retículo colágeno y las fibrillas, donde el método de Bodian no lo expone en ningún caso. Además, la matriz dentinal muestra un punteado gris o negruzco de plata reducida en la ma-

triz calcificada, parecida a la punteada ticción con el método de Pap.

El esmalte no se tiñe, con la posible excepción de que pueda ser depositada plata en las estrías del esmalte, en los primas o en los husos.

En la pulpa dental el método de protargol, de Bodian, pone de manifiesto las fibras nerviosas, en gran profusión y belleza. Asimismo, tiñe las células de la pulpa con gran claridad, incluyendo el citoplasma y núcleo.

Las células que aparecen claramente teñidas son estrelladas o fusiformes, acabando en finas terminaciones. La matriz colágena de la pulpa no se revela por el método de Bodian, y el delicado proceso celular no ofrece parecido con el de las fibras colágenas densas y onduladas, que se aprecian aplicando el método de Pap o Masson. Una descripción detallada de los nervios de la pulpa en el hombre y animales se ofrece amplia en la bibliografía (Weatherford, 1939).

Lípidos.—El proceso de los odontoblastos se tiñe con el negro sudán B, especialmente en el área donde los túbulos dentinales han sido seccionados y el lumen o luz expuesto al reactivo. En estas condiciones el proceso odontoblástico muestra pequeños puntos negros o grises. Por otra parte, el campo aparece decolorado, exceptuando algunas partes de la matriz dentinal, que ofrecen una débilmente perceptible ticción gris. La ticción de las fibras de Tomes indican que este proceso odontoplasmático contiene lípidos, y el hecho de que se tiñen suave y uniformemente sugiere que contienen fosfolípidos más fácilmente que grasas neutras. Nosotros no hemos encontrado en la bibliografía referencia alguna sobre la demostración histológica de contenido de lípidos en la dentina.

La pulpa es profundamente teñida con negro sudán. En algunos sitios donde las secciones son suficientemente delgadas, de forma que se pueda examinar la célula separadamente, su citoplasma contiene diminutas partículas negras o grises (mitocondria).

Tejidos elásticos.—Una sección de dentina fué teñida con reactivo de tejidos elásticos de Weigert, con resultado negativo.

METACROMASIA DEL DIENTE ADULTO EN EL CERDO

Examinamos la dentina y pulpa en tejidos normales en el cerdo, porque, a diferencia de los primates, el diente de cerdo continúa su desarrollo en su vida de adulto. El examen de los túbulos dentinales de los dientes adultos del cerdo son teñidos metacromáticamente de

una manera muy similar a la observada en la dentina de mono y hombre, y muy similar a los dientes de feto humano, por la continua proliferación de la pulpa dental del cerdo, que es extremadamente metacromática. Se observa que las células redondas de la pulpa están rodeadas por una sustancia dental intensamente metacromática. Numerosas células de ésta se encuentran en la pulpa dental de cerdo en fuerte contraste con su extrema rareza en el diente humano y de mono.

El glicógeno se revela en abundancia en las células de la pulpa en los dientes adultos de cerdo. Este glicógeno probablemente representa una fuente de energía en el continuo desarrollo, como ya fué observado en el diente humano de feto.

DISCUSIÓN

Nosotros hemos observado metacromasia en la parte interna de los túbulos dentinales del hombre, mono y cerdo, incluyendo las vainas de Neumann (1863). El análisis de las condiciones en las cuales la sustancia de las vainas de Neumann reaccionan metacromáticamente y se tiñe basófilamente, nos lleva a la conclusión de que contiene ácido mucopolisacárido. Ninguno parece haber apreciado metacromasia en la vaina de Neumann antes de haber sido sugerida su naturaleza química. Sí ha sido mencionado que la parte interior de los túbulos dentinales se tiñen con hematosilina, reactivo que tiende a unirse por los componentes basófilos de los tejidos.

Hoppe (1853, 1862) trató cortes de dentina con ácido hidrocórico, el cual disuelve el calcio, y con agua, la cual, junto con el ácido, da lugar a la hinchazón de las fibras colágenas, dando lugar a la separación de las vainas. De este resultado Hoppe saca la conclusión de que las vainas no están compuestas de colágeno. Por medio de hidróxido de potasio caliente, Kölliker (1852) aisló las vainas junto con la membrana en la superficie interna de la dentina, a la cual se unen, membrana de Kölliker). De acuerdo con Fleishmann (1906), la predentina está compuesta de la misma sustancia, libre de fibrillas, como la vaina de Neumann, mientras que Von Ebner (1922) afirma que la vaina constituye la mayor parte de la porción interior y, consecuentemente, la parte más joven de los túbulos dentinales, representando, por así decirlo, la capa de predentina de los túbulos. Lhener y Plek (1936) consideran las vainas como equivalentes a la zona apo-

sicional en el desarrollo del hueso o de las paredes de lagunas óseas. Noyes (1929) subraya que están compuestas de elastina, lo cual no hemos podido confirmarlo nosotros. Todavía otros investigadores han negado su existencia (Hanazawa, 1917; Meyer, 1926; Orban, 1929; Churchill, 1934) por el hecho de su variabilidad en los fenómenos ópticos o reactivos. Rodeando las vainas de Neumann y formando la capa interna de la matriz dentinal, hemos observado vainas distintivas conteniendo fibras colágenas argirófilas. Esto es quizá a lo que Jordán (1947) se refiere cuando dice que "las paredes de los túbulos dentinales están formadas por vainas dentinales (de Neumann) calcáreas, extremadamente densas".

Esta observación indica que las vainas de Neumann son estructuras diferenciales realmente histológicas, las cuales son metacromáticas y basófilas y contienen ácido mucopolisacárido. Lehner y Plenk no se refieren al sulfuro como ingrediente del diente, pero en vista de este hallazgo puede esperarse el hallarlo en la dentina, dado que otras sustancias de comparable basofilia a bajo pH son conocidas como ésteres (half esters) del ácido sulfúrico (Dempsey y col., 1947).

Es regla general que el ácido mucopolisacárido se encuentra regularmente en el estroma de los tejidos de desarrollo (Sylvén, 1941), tejidos de desarrollo cíclico, repetido (endometrio uterino) y tumores (Sylvén, 1945). En el tiempo del desarrollo ha subsistido o es completado, y su diferenciación ha tenido lugar mientras que la mayor parte de los tejidos han perdido su metacromasia. Es retenido aparentemente en la vida adulta solamente en sitios donde el desarrollo persiste o donde el ácido mucopolisacárido asume funciones especiales (matriz del cartílago, córnea, fluido articular, etc.). En relación con este concepto, la más completa desaparición de metacromasia de la pulpa del diente adulto de primate parecería referirse al cese de su desarrollo, de donde su existencia en el diente de cerdo representaría una concomitancia con su continua proliferación. Por otro lado, la metacromasia de la vaina de Neumann sugiere que los mucopolisacáridos allí localizados poseen algunas especiales propiedades relativas a funciones o mantenimiento de la función dentinal.

Cuando el posible papel jugado por los mucopolisacáridos de las vainas de Neumann sólo pueden ser sospechados, se subraya así la importancia asignada a estas sustancias en la regulación de la permeabilidad del tejido conectivo en referencia a la difusión de las in-

fecciones y a la resistencia a la enfermedad (Duran-Reinalds). Algunos polisacáridos cambian su viscosidad y ofrecen una sol-gel reversible bajo la influencia de hormonas o enzimas mucolíticas que son capaces de despolimerizar varios mucopolisacáridos, alterando sus propiedades o destruyéndolos completamente (Myer, 1946). Tales enzimas, lisozimas, existen en la saliva, lágrimas, secreciones nasales, cerca de varias células bacterianas. Pero, además, hay indicaciones de que por la influencia hormonal algunos polisacáridos se hidratan periódicamente (endometrio "sex skin"). Es extraordinario lo que los mucopolisacáridos representan en los túbulos dentinales, donde bañan el proceso de los odontoblastos y puedan mostrar algunas de estas sus propiedades, jugando un papel importante en la nutrición y mantenimiento de los dientes.

La organización estructural de la pulpa dental exige un comentario adicional. La pulpa de los dientes de primates dispone de tres componentes en mayor grado: las células estrelladas y fusiformes, las fibras colágenas intersticiales y la sustancia fundamental. Durante la vida fetal, la pulpa es muy celular y la matriz proporcionalmente pequeña. Durante el desarrollo postnatal las células disminuyen relativamente su número, ya que las fibras colágenas intersticiales aumentan grandemente su tamaño. Ácido mucopolisacárido, que abunda en el período de desarrollo y disminuye en el tiempo de la cesación del desarrollo. En un diente completamente desarrollado, como consecuencia de estos cambios es teñido muy poco por los tintes basófilos, excepto las células, de donde la matriz de las fibras colágenas muestra una gran afinidad por los reactivos ácidos.

Autores alemanes refieren frecuentemente que la pulpa dental tiene la consistencia de tejidos gelatinosos (*Gallertgewebe*, Lehner y Plenk, 1936), lo cual es un término descriptivo y no una composición química conocida. En los más recientes textos americanos se habla de células embebidas en una sustancia intercelular gelatinosa que se asemeja al tejido mucoide (Schour, 1932) o como poseyendo abundante sustancia gelatinosa basófila similar al tejido mucoide (Maximow y Bloom, 1942). La investigación presente indica que la sustancia fundamental de la pulpa embrionaria o desarrollada del diente contiene una sustancia, ácido mucopolisacárido, que puede colocarse definitivamente en la categoría del tejido mucoide en el diente adulto de Primate: por el contrario, la sustancia fundamental pierde casi

completamente su acidez y basofilia, indicando así que el ácido mucopolisacárido ha casi desaparecido. Se extraña uno de que en estas circunstancias por las que pasa la sustancia fundamental no pueda ser reemplazada por las fibras colágenas. Quizás se justifique admitiendo que se convierten o se sustituyen en un débil ácido o un mucopolisacárido neutro. Este último se sabe existe ampliamente en el cuerpo (ácido hialurónico), la dermis y otros tejidos, y que se tiñe muy débilmente o no se tiñe en absoluto (Dempsey y col., 1947).

RESUMEN

Después de la fijación en acetato de plomo básico y teñido en azul de toluidina, el diente de feto humano muestra una marcada metacromasia. Esto ocurre con la sustancia fundamental del órgano del esmalte y en la papila dental. El glicógeno se encuentra abundante en el epitelio del esmalte y en las células de la pulpa dental.

Dientes de adulto de hombre y del mono Rhesus muestran una pronunciada metacromasia de las vainas de Neumann de los túbulos dentinales y ligera y variable metacromasia en la sustancia fundamental de la pulpa dental. Las sustancias de las vainas de Neumann son muy basófilas, las cuales se unen y tiñen con azul de metileno a un pH bajo. Estas propiedades de ticción indican que la vaina de Neumann es una estructura histológica definitiva, compuesta de un ácido mucopolisacárido.

El colágeno de la matriz de la dentina sin decalcificar tiñe con el ácido periódico Schiff y con el reactivo de Masson. El método de la plata amoniacal de Pap pone en evidencia las fibras de las vainas argirófilas de la matriz dentinal rodeando las vainas de Neumann. El método da asimismo una apariencia punteada a las sales de cal de la matriz. El método de protargol de Bodian impregna también el calcio, pero no en negro las paredes de los túbulos dentinales.

El proceso de los odontoblastos (fibras de Tomes) se tiñe con sudán negro B, reacciona positivamente con el ácido periódico-Schiff, tiñe con tinturas ácidas y son impregnados variablemente por la plata amoniacal de Pap. La particular ticción con el sudán negro se cree debida a los fosfolípidos. El método protargol de Bodian impregna los túbulos dentinales y su contenido, incluyendo las vainas de Neumann y el proceso de los odontoblastos.

La sustancia fundamental de la pulpa, en el diente adulto de Primate, muestra débil y variable metacromasia. Las células contienen pequeñas partículas lípidas (probablemente mitocondria), pero no glicógeno.

El diente adulto de cerdo muestra también metacromasia de los túbulos dentinales. La sustancia fundamental de la pulpa dental es intensamente metacromática y sus células contienen considerable glicógeno. La metacromasia (ácido mucopolisacárido) y el glicógeno en la pulpa adulta han de ser referidas probablemente al continuo desarrollo de los dientes del animal.

Referencias bibliográficas

- BODIAN, D.: *The staining of paraffin sections of nervous tissues with activated protargol*. "Anat. Rec.", 69: 153-162, 1937.
- CHURCHILL, H. R.: *Histology and Histogenesis of the teeth*. Phil Lippincott, 1933.
- DAWSON, A. B. and J. BARNETT: *Bodian's protargol method*. "Stain Tech.", 19: 115-118, 1944.
- DEMPSEY, E. W., H. BUNTING, M. SINGER and G. B. WISLOCKI: *The dye-binding capacity of mucopolysaccharides*. "Anat. Rec.", 98: 417-430, 1947.
- DURÁN-REYNALDS, F.: *Tissue permeability*. "Bact. Rev.", 6: 197-252, 1942.
- VON EBNER, V.: *Histology of the Teeth 4 Auf.* "Wien Alfred Hölder", 325-399, 1922.
- FLEISCHMANN, L.: *Die Entwicklung der Zahnscheiden*. "Arch. f. Mikr. Anat.", 68: 297-310, 1906.
- *Zur Bildung der Zahnbeingrundsubstanz*. "Arch. f. Mikr. Anat.", 70: 190-192, 1907.
- HANAZAWA, K.: *A study of the intimate structures of dentin especially of the relation between the dentinal tubules and fibrils*. "Dental Cosmos", 59: 125-148, 271-300, 1917.
- HOLMGREN, H.: *Studien über Verbreitung und Bedeutung der chromotropen Substanz*. "Zeitsch. f. Mikr. Anat., Forsch.", 47: 489-521, 1940.
- and O. WILANDER: *Beitrag zur Kenntnis der Chemie und Funktion der Ehrlichschen Mastzellen*. "Zeitsch. f. Mikr. Anat. Forsch.", 42: 242-276, 1937.

- HOPPE, E.: *Über die Gewebselemente der Zähne*. "Virchows Arch.", 5: 170-188, 1853.
- *Untersuchungen über die Consttn. des Zahnschmelzes*. "Virchows Arch.", 24: 13-23, 1862.
- JORDAN, H. E.: *A Textbook of Histlg.* 8th ed revised "D'Appleton-Century Co.", Nueva York, 1947.
- KÖLIKER, A.: *Handbuch der Gewebelehre des Menschen* 1 Auf. Leipzig Engelmann, 1852.
- LEHNER, J. and H. PLENK: *Die Zähne*. "In Möllendorff", 5: 499-708, 1936.
- LETTERER, E.: *Über epithl.* Leipzig Hirzel, 1932.
- LILLIE, R. D.: *Studies on th presrvtn. and histlge. demostrtn. of glycogen*. "Bull Internatl. Assn. Med. Museums", 27: 23-61, 1947.
- MCMANUS, J. F. A.: *Histlgcl. demostrtn. of mucin after periodic acid*. "Nature", 158-202, 1946.
- MAXIMOW, A. A. and W. BLOOM: *A. Text-book of Histlgy* 4th ed revised. "Saunders Phil.", 1942.
- MEYER, K.: *Mucolytic enzymes*. "In Greenés Currents in Biochemical Research", 277-289, 1946.
- MEYER, W.: *Die feinere Histologie der Dentinkanälchen*. "Deutsch Monatschr. f. Zahnheik", 44: 649-675, 1926.
- MITCHELL, A. J., and G. B. WISLOCKI: *Selctv. Staineng of glycg.* "Anat. Rec.", 90: 261-266, 1944.
- NEUMANN, E.: *Beitrag zur Kenntns des normlen Zahnbein*. Leipzig, 1863.
- NOYES, F. B.: *Dentl. Histlg. and Embryolg.* "Lea and Phil.", 1929.
- ORBAN, B.: *Contribtn. to th histolg. of th dental pulp*. "J. Am. Dental Assn.", 16: 965-996, 1929.
- *Th devlpment. of th dentn.* "J. Am. Dental Assn.", 16: 1.547-1.586, 1929.
- PAP, T.: *Eine neue Methd. zur Imprägntr. des Retiklms.* "Centrlbl. f. allg Path. u path. Anat.", 73: 168-246, 1929.
- SYLVEN, B.: *Über das Vorkommen von hochmolekularen Esterschwefelsäuren*. "Acta. Chir. Seand.", 86. Supplmntm. 66, 151 pp. 1941.
- *Ester sulphrc. acids of high molclr. weight*. "Acta radiolgc. Supplmntm., LIX, 99 pp. 1945.
- WEATHERFORD, H. L.: *Th innervtn. of th teeth th dentl. pulp*. "Anat. Rec.", 74: 329-347, 1939.