

Instituto de Fisiología
Facultad de Medicina - Barcelona
(Prof. J. Jiménez - Vargas)

Reacciones histoquímicas de las sales de diazonio *

por J. Monche y Magdalena Ferrer Arenillas

(Recibido para publicar el 15 de octubre de 1952)

Sobradamente conocida en la clínica es la reacción coloreada denominada diazorreacción de Ehrlich, para extenderse en consideraciones sobre la misma, dado el interés innegable de la bilirubinemia para el diagnóstico en diversos estados patológicos. Se trata, como es sabido, de una aplicación de las sales de diazonio, fundada en la copulación de la correspondiente al ácido sulfanílico con la bilirrubina, en determinadas condiciones.

El empleo de sales de diazonio con fines clínicos, aunque de modo indirecto, ha sido aplicado en histoquímica, inicialmente por Menten, Junge y Green, y no hace muchos años por Seligman, Nachlas y Manheimer. Todos estos autores las utilizan para el estudio de la distribución de esterasas en tejidos normales y patológicos, según métodos fundados en el empleo como substrato de ésteres del naftol o del fenol, que al ser hidrolizados por la esterasa correspondiente, operando en presencia de una sal de diazonio, el naftol o el fenol así liberados se van copulando paulatinamente, a medida de su formación, con la sal de diazonio, dando el colorante monohidroxiazoico respectivo, que tiñe la preparación histológica con intensidad variable en diversas zonas de la misma, dependiente de su riqueza en esterasas.

Las opiniones de estos autores han sido ampliamente discutidas por Monche, aunque bajo un aspecto exclusivamente químico,

* Debemos hacer constar nuestro profundo agradecimiento al Dr. R. Vidal-Ribas Zaragoza, por su colaboración microfotográfica aportada a este trabajo, con la que nos ha distinguido.

tro concepto, por sus posibles aplicaciones para el diagnóstico clínico y que serán objeto de atención seguidamente.

Parte experimental

Hemos preparado la sal de diazonio de la *alfa*-aminoantraquinona, operando en medio clorhídrico para obtener el cloruro de antraquinondiazonio, que es estable en estado sólido, presentándose en forma de diminutas láminas cristalinas muy brillantes y de color amarillo (*). Elegimos dicha sal de diazonio, por ser la misma empleada por Seligman y Manheimer, dada la índole de nuestros trabajos. Con esta sal de diazonio y algunas de las ya utilizadas por nosotros anteriormente, hemos iniciado las investigaciones objeto del tema que nos ocupa, practicando algunas reacciones coloreadas en ensayos de copulación de las mismas con aminoácidos y con seralbúmina.

Ensayos con aminoácidos

Entre los aminoácidos que con las sales de diazonio dan productos de copulación más notablemente coloreados, de los ensayados por nosotros, debemos mencionar :

GLICOCOLA.

Con la sal de diazonio de la anilina añadida en medio ácido no se observa reacción coloreada alguna. Al alcalinizar aparece coloración amarilla, formándose abundante precipitado floculento del mismo color.

Con la sal de diazonio de la *meta*-toluidina, se observa un comportamiento idéntico al precedente.

Con la sal de diazonio de la sulfanilamida se observa coloración amarillo pálido en medio ácido, formándose precipitado amarillo intenso al alcalinizar.

Con la sal de diazonio de la *alfa*-aminoantraquinona, da color rojo ladrillo en medio ácido, cuya intensidad aumenta al alcalinizar, pero sin haber observado formación alguna de precipitado.

ALANINA.

Con la sal de diazonio de la anilina, no se observa coloración alguna en medio ácido. Al alcalinizar da abundante precipitado de color amarillo.

* Debemos hacer constar nuestro agradecimiento a la «Fabricación Nacional de Colorantes y Explosivos, S. A.», por su gentileza en proporcionarnos como obsequio las *alfa* y *beta*-aminoantraquinonas.

Con la sal de diazonio de la *meta*-toluidina, no aparece coloración alguna en medio ácido; en medio alcalino el líquido se colorea en verde, con ligero precipitado del mismo color.

Con la sal de diazonio de la sulfanilamida da color amarillo pálido en medio ácido, formándose un precipitado amarillo al alcalinizar.

ASPARAGINA.

Con la sal de diazonio de la anilina se observa un comportamiento similar al de la alanina.

Con la sal de diazonio de la *meta*-toluidina no da coloración alguna en medio ácido, pero al alcalinizar se observa intensa coloración verde, quedando el líquido completamente transparente al principio y formándose un precipitado verde amarillento al alcalinizar intensamente.

Con la sal de diazonio de la sulfanilamida en medio ácido no se observa coloración alguna. En medio alcalino da un escaso precipitado amarillo coposo.

TRIPTÓFANO.

Con la sal de diazonio de la anilina de color amarillo, transparente en medio ácido, formándose un precipitado del mismo color en medio alcalino.

Con la sal de diazonio de la *meta*-toluidina, no aparece coloración alguna en medio ácido. Al alcalinizar da precipitado amarillo.

Con la sal de diazonio del ácido *orto*-aminobenzoico: color amarillo en medio ácido y anaranjado en medio alcalino, sin formación de precipitado.

Con la sal del diazonio del ácido *meta*-aminobenzoico: color verde transparente en medio ácido, con ligero enturbiamiento posterior. Al alcalinizar aumenta algo el enturbiamiento y el líquido vira al amarillo canario.

Con la sal de diazonio de la sulfanilamida, da en medio ácido color rojo transparente; al alcalinizar vira el color al amarillo, formándose abundante precipitado de dicho color.

Con la sal de diazonio de la *alfa*-aminoantraquinona, el líquido se colorea en pardo intenso en medio ácido, que se debilita al alcalinizar.

OBSERVACIONES.

En otros casos, como, por ejemplo, mediante la sal de diazonio del ácido *meta*-aminobenzoico y la glicocola, alanina y asparagina, no se observa ni coloración, ni precipitado alguno, en medio ácido o alcalino.

Ensayos con seroalbúmina

Hemos ensayado el comportamiento del plasma humano y el de ternera sometidos a la acción de las sales de diazonio indicadas precedentemente. Con todas se observa el desarrollo de color rojo intensísimo al alcalinizar y de tonalidades dependientes de la sal de diazonio empleada, aunque tan similares, que prácticamente pueden considerarse idénticas. El color, una vez formado, permanece inalterado en medio ácido, con floculación en masa del producto coloreado. Después de lavado varias veces con agua sobre un embudo de filtración a la trompa o por centrifugación y secado mediante lavados con alcohol y éter y permanencia en un desecador sobre cloruro cálcico seco fundido, queda en forma de masa amorfa y dura, muy brillante y cuya coloración oscila del pardo-rojizo al rojo, según la sal de diazonio empleada. El producto húmedo tiene el aspecto de masa elástica, similar al caucho en polvo.

Al añadir las sales de diazonio sobre el plasma, operando en medio ácido (pH = 5), se observa desarrollo de color amarillo más o menos intenso, que se confunde fácilmente con el del plasma, salvo en el caso del cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio, que determina el desarrollo paulatino de una coloración rojo pardusca, cuya intensidad va aumentando rápidamente durante la primera hora de hallarse la mezcla reaccionante a la temperatura ambiente y más lentamente después, hasta permanecer invariable, al cabo de unas seis horas. En cambio, en medio alcalino el desarrollo del color indicado es prácticamente instantáneo y el tono e intensidad similares al que se observa finalmente operando en medio ácido.

En todos estos ensayos y en los que expondremos seguidamente, operamos con las sales de diazonio a concentraciones M/250, aproximadamente, salvo con los cloruros de bencenosulfonamidodiazonio y de antraquinondiazonio, cuya estabilidad en forma de fino polvo cristalino, una vez secos, permite pesarlos y preparar, por lo tanto, con precisión, las disoluciones M/250 de los mismos.

Ensayos histológicos

Hemos operado con el cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio, haciéndolo actuar sobre cortes de hígado y riñón de rata blanca, en medio ácido y en medio alcalino. Resumimos seguidamente los ensayos realizados, previa una selección de los mismos, entre los que nos han conducido a los resultados que estimamos más demostrativos. Las ratas utilizadas y las técnicas y métodos que hemos empleado, incluso en la preparación y montaje de los cortes histo-

lógicos, son los mismos ya descritos por Monche y Ferrer Arenillas.

Ensayos en medio alcalino

Preparamos una mezcla amortiguadora de sosa cáustica y borato sódico, de $\text{pH} = 9,5$, operando según Sørensen, para emplearla a la temperatura ambiente (18°C .), con las variantes siguientes:

a) Introducimos los cortes histológicos en las correspondientes cápsulas de Petri y los cubrimos con 25 c.c. de la mezcla amortiguadora indicada, añadida en cada cápsula. Seguidamente tenemos a punto una disolución recién preparada, en el preciso momento de su empleo, de 15 mg. del cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio en la cantidad necesaria de una disolución N/10.000 de ácido clorhídrico para neutralizar los 25 c.c. de la mezcla amortiguadora de referencia, dejándola a $\text{pH} = 7$, determinada volumétricamente en ensayos aparte, cada vez que se vaya a proceder al tratamiento de los cortes histológicos por la sal de diazonio. El pH se determinó mediante la colección de papeles indicadores Bayer (*). Al verter la disolución clorhídrica de la sal de diazonio así resultante, en cada cápsula de Petri conteniendo los cortes histológicos sumergidos en la mezcla amortiguadora antes indicada, se observa al poco rato (15 a 30 minutos) la tinción de los cortes en rojo pardusco bastante intenso. Después se lavan y montan en la forma acostumbrada.

b) Operamos a la inversa, o sea recubriendo los cortes histológicos con la disolución clorhídrica de la sal de diazonio y añadiendo seguidamente los 25 c.c. de la misma mezcla amortiguadora, pero efectuando la adición muy lentamente. En este caso se observa que la coloración aparece instantáneamente sobre los cortes, que quedan teñidos de modo algo más intenso. Luego se procede a lavarlos y montarlos.

Comparando mediante examen microscópico los cortes histológicos de los ensayos a) y b), se observa en los primeros una destrucción parcial del protoplasma celular, apareciendo los tejidos de estructura celular en forma de panal. En los tratados según b), no se observa, en cambio, dicha destrucción.

Ensayos en medio ácido o neutro

Los ensayos en medio ácido o neutro, es indiferente efectuarlos añadiendo primero la mezcla amortiguadora y seguidamente

* Indikatorpapiere mit Farbumschlag-Tafel zur Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Bereich von $\text{pH} = 0,1 - 14,0$ (Leverkusen a. Rh.).

la disolución acuosa de la sal de diazonio, o bien procediendo a la inversa, pues el desarrollo de color es en ambos casos igualmente lento, sin que se observen prácticamente diferencias entre unos y otros cortes histológicos, después de teñidos.

Operamos de modo idéntico al descrito precedentemente, pero sustituyendo la mezcla amortiguadora de sosa cáustica y borato, por la de acetato sódico y ácido acético a pH = 5, que es la misma utilizada por Seligman y Manheimer, o empleando en su lugar simplemente agua destilada.

Cortes histológicos procedentes de ratas sometidas a tratamiento especial

SAL DE DIAZONIO ENDOVENOSAMENTE

Injectada a dos ratas, no se observa tinción alguna de los cortes de hígado. Tampoco el resultado es mejor administrando la sal de diazonio por vía intramuscular. En todos los casos los animales así tratados toleran muy mal la sal de diazonio, apareciendo en estado comatoso.

RATAS TRATADAS CON AMINOÁCIDOS

Hemos inyectado, a dos lotes de seis ratas cada uno, disoluciones saturadas de glicocola y de triptófano, respectivamente, reservándonos dos ratas de testigo, o sea utilizando catorce ratas en total. A cada rata se le administran endovenosamente 0,5 c.c. de la disolución del aminoácido en suero fisiológico, efectuándolo dos veces consecutivas en el intervalo de una hora. Luego se sacrifican, y los cortes de hígado y riñón se someten a la acción de la sal de diazonio durante veinticuatro horas, ya que solamente operamos en medio ácido (pH = 6,5), por ser el óptimo de tinción histológica con el cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio, según nuestros ensayos. Seguidamente se lavan y montan los cortes, observándose que los procedentes de hígado de las ratas tratadas con los aminoácidos de referencia son los más intensamente teñidos, con muy notable diferencia. En los cortes de riñón, aunque algo más débilmente teñidos que los de hígado, la diferencia es bastante notable por su mayor intensidad de tinción, comparada con la de los testigos.

Un hecho curioso a tener muy en cuenta es que al montar los cortes con xilol fenicado y proceder después a su examen microscópico, aparecen éstos de aspecto difuso y, a pesar de ser la colocación de los mismos bastante intensa, no se observa estructura celular. En cambio, en los cortes montados con xilol sólo, además

de ser la tinción aun más intensa, se observa muy netamente la estructura celular, conforme debe ser.

Atribuyendo al fenol presente la causa de resultados tan diferentes, dispusimos dos tubos de ensayo con 1 c.c. de suero sanguíneo en cada uno, diluído mezclándolo con 5 c.c. de la disolución de la sal de diazonio en la mezcla amortiguadora de ácido acético y acetato sódico de $\text{pH} = 5$, de modo que el contenido de cada tubo fué de 6 c.c. Al cabo de una hora de efectuado todo ello, añadimos en uno xilol fenicado, y en el otro xilol sin fenicar. En el primero se observa una floculación característica de la seroalbúmina fuertemente coloreada, y en el otro tubo no hay floculación alguna, permaneciendo el líquido transparente, aunque igualmente coloreado; todo lo cual explica claramente lo observado en los cortes histológicos, motivado, pues, por la presencia del fenol, dado su gran carácter ácido en medio acuoso.

Discusión

Como es sabido (Karrer), la reacción de las aminas con las sales de diazonio ocurre en medios ligeramente ácidos, neutros o alcalinos. Solamente en medios muy ácidos resulta inhibida, pero para ello debe existir un exceso de 2 a $2\frac{1}{2}$ equivalentes, por lo menos, de ácido mineral; en cuyas condiciones las proteínas floculan, con profunda destrucción de toda estructura celular, a efectos histoquímicos.

Así, pues, en las condiciones en que operan Seligman, Nachlas y Manheimer, o sea a $\text{pH} = 7,8$, para la hidrólisis enzimática del *beta*-naftilacetato, o a $\text{pH} = 5$, para la del *alfa*-naftilfosfato cálcico; la alcalinidad del medio, en el primer caso, así como la débil acidez del mismo en el segundo, son las óptimas para que toda la sal de diazonio presente reaccione con las proteínas tisulares, y ello no sólo por acción de masa, fundamentalmente, dada la enorme desproporción entre la concentración proteínica existente en la mezcla reaccionante y la de los substratos indicados, sino incluso porque, aun en el supuesto de posible hidrólisis enzimática, quedaría ésta inhibida por la capa protectora de colorante azoico proteínico, formado superficialmente en cada corte histológico al copularse la sal de diazonio con las proteínas tisulares, que de este modo son causa esencialmente determinante de la constitución química del mismo, resultando así prácticamente aislada del sistema enzimático reaccionante, toda la estructura tisular en estudio, cuando no parcialmente destruída, incluso la estructura celular.

Entre estas diazorreacciones histoquímicas y los procesos de

tinción histológica corriente, existe evidentemente la diferencia esencial de formar parte integrante de la molécula del colorante azoico resultante, las proteínas tisulares, en el primer caso, mientras que en el segundo, en cambio, la fijación del colorante sobre el tejido ocurre sin transformación material alguna, y por ello los cortes histológicos pueden incluso decolorarse, total o parcialmente, por extracción del color de los mismos, mediante fosfatasas tisulares que va tiñendo los cortes histológicos a medida que progresa el proceso hidrolítico de nuestros substratos cromógenos (Monche y Ferrer Arenillas), es esto último precisamente lo que se observa siempre. En cambio, el color de los cortes histológicos teñidos por diazorreacción, es perfectamente sólido, cualquiera que sea el disolvente ensayado.

En cuanto a la velocidad de tinción de los cortes histológicos bajo la acción del cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio trabajando a pH = 5, y aun incluso operando en idénticas condiciones experimentales que Seligman y Manheimer, pero con la única variante fundamental de suprimir del sistema reaccionante el *alfa*-naftilfosfato cálcico y el «aerosol», sustituyéndolos por 1 c.c. de agua destilada, la evolución del proceso de copulación entre dicha sal de diazonio y las proteínas tisulares transcurre de modo enteramente similar al de los procesos de tinción tisular mediante los colorantes hidroxiazoicos liberados por hidrólisis fosfatásica del éster fosfórico correspondiente, hasta el extremo de prestarse a confusión al observarlos, incluso operando a las temperaturas de «incubación» de 35° C., según los autores de referencia.

La evolución del proceso de diazorreacción tisular indicado, es lenta en dichas condiciones, hasta el extremo de que en las microfotografías sobre demostración histoquímica de fosfatasa ácida publicadas por Seligman y Manheimer, atribuyen lastimosamente, ambos autores, a procesos de hidrólisis fosfatásica, lo que en realidad se debe a las diazorreacciones tisulares, demostrativas, por lo tanto, no de la riqueza y distribución de fosfatasas en los cortes histológicos, sino, en cambio, del contenido y distribución en ellos de grupos amino libres, bien sean proteínicos o, incluso, de aminoácidos y derivados conjuntamente.

En la velocidad de toda clase de copulaciones, no sólo ejerce, naturalmente, influencia la temperatura, sino incluso el pH del medio; ambos agentes determinan que la velocidad crezca con el aumento del valor de los mismos, conforme es sabido. Particularmente el pH del medio, cuya influencia óptima según su valor depende de la naturaleza de los sustituyentes del núcleo bencénico de la sal de diazonio, constituye otro factor coadyuvante a la confusión de referencia.

En apoyo de cuanto antecede, las microfotografías de cortes histológicos de hígado y de riñón de rata blanca, que se incluyen en este trabajo, ofrecerán una muestra suficientemente demostrativa en nuestro concepto. Todas ellas han sido seleccionadas y obtenidas por el Dr. Vidal-Ribas, en la forma que le ha parecido más demostrativa, mediante óptica Leitz y filtro Kodak-verde-AF, operando a aumentos de 70 y 470 diámetros.

La figura 1 corresponde a un borde hepático, en el que se observa una clara hiperpigmentación de la zona cortical respecto a la más profunda del mismo, siendo de notar la disminución suave de la intensidad de tinción y su uniformidad general, especialmente por comparación con las microfotografías ya publicadas por Monche y Ferrer Arenillas en un trabajo anterior, demostrativas de las características de la misma cuando obedece a administración al animal de un colorante monohidroxiazoico y de su éster fosfórico. Conforme pudo apreciarse en dichas microfotografías, la intensidad de tinción, salvo en ciertas zonas ricas en fosfatasa, es mucho menor y la uniformidad de la misma sólo se observó en el caso de administración previa del colorante monohidroxiazoico. Por el contrario, la administración previa del éster fosfórico correspondiente, determinó la formación de amplias manchas de intensidad de tinción muy notable, sobre todo en los animales a los que también se les administró previamente fosfatasa y caracterizadas por cambios bruscos de la intensidad de coloración del corte histológico en dichas zonas.

La figura 2 corresponde a una zona del mismo preparado anterior, a mayor aumento, en la que se observa un capilar con su contenido hiperpigmentado, por acumulación de mayor cantidad de azoico rojo.

Los cortes histológicos de ambas figuras 1 y 2 han sido tratados para su tinción por la sal de diazonio según la variante b) de los ensayos en medio alcalino, ya descritos en la parte experimental de este trabajo.

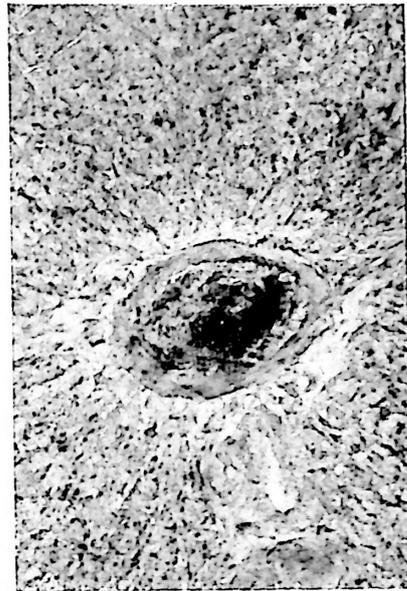
La figura 3 corresponde a la sección transversal de la zona distal de los túbulis de una porción de riñón, en la que se observan éstos bastante destruidos, dando la sensación de panal de abejas.

La figura 4 es la misma de la figura 3, pero a mayor aumento. En ella se observa que la destrucción del protoplasma celular no es total.

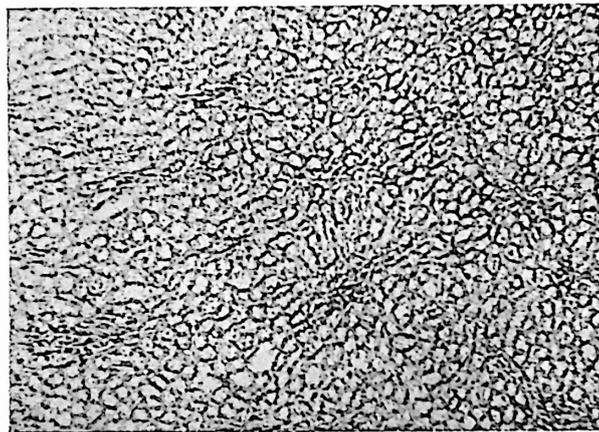
La figura 5 representa otra porción del corte histológico de la figura 3, pero cuya microfotografía ha sido tomada en la zona de cambio de orientación de los túbulis, permaneciendo la imagen de destrucción celular en forma de panal anterior y observándose intactos los túbulis en vista lateral, pues sólo se destruyen las células endotubulares.



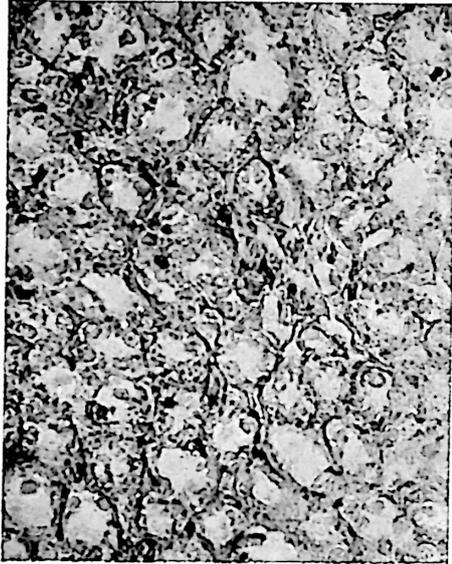
N.º 1



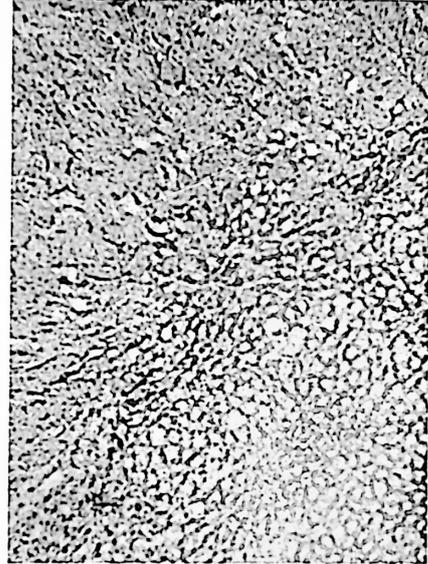
N.º 2



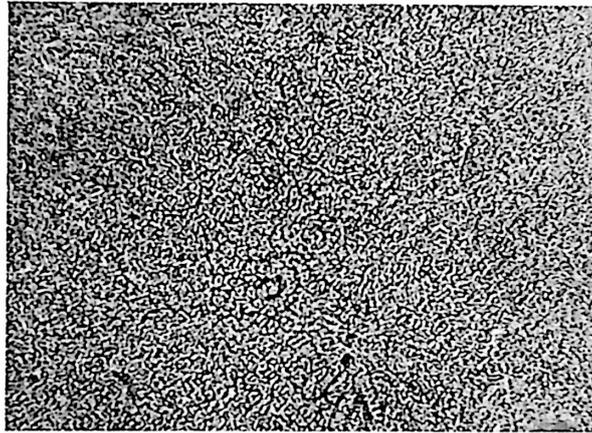
N.º 3



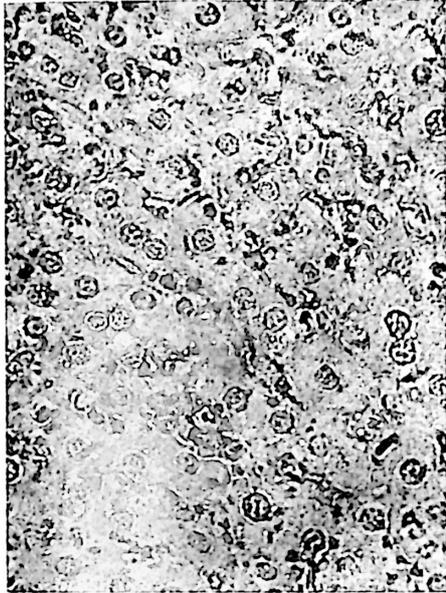
N.º 4



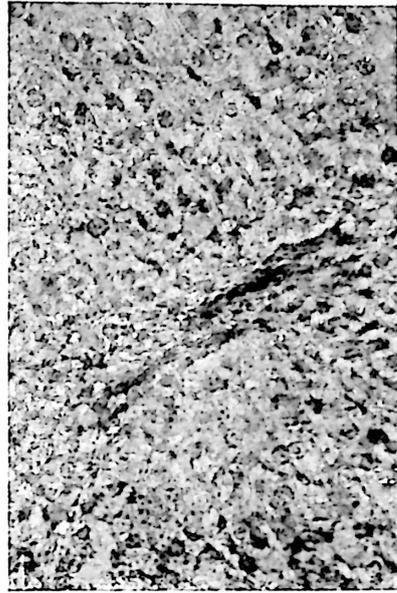
N.º 5



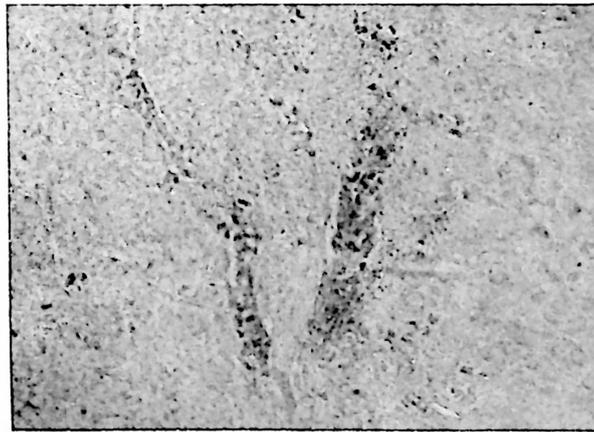
N.º 6



N.º 7



N.º 8



N.º 9

Conforme ya lo hemos hecho constar en la parte experimental de este trabajo, todas estas preparaciones histológicas en las que se observa destrucción parcial del protoplasma celular, apareciendo los tejidos de estructura celular en forma de panal, han sido tratadas para su tinción mediante el cloruro de *alfa*-antraquinon-diazonio, según la primera variante de los ensayos en medio alcalino. Resultados éstos muy interesantes y que demuestran claramente que las condiciones de $\text{pH} = 9,5$, del medio de la mezcla amortiguadora de sosa cáustica y borato sódico empleada por nosotros en estos ensayos, son incompatibles con la conservación de la estructura celular. Y ello es aún de mayor interés, en relación con el hecho bastante generalizado de trabajarse en general con fosfatasa alcalina, empleando substratos que requieren para ser óptimamente hidrolizados «in vitro» medios muy alcalinos, cuyo pH es del mismo orden, cuando no idéntico al indicado. También se han aplicado en terapéutica, incluso por vía intravenosa, medicamentos tales como las sales sódicas de las sulfamidas, cuyas disoluciones inyectables tienen un pH similar y a cuya acción atribuímos muchos trastornos provocados por su administración, a pesar de su rápida neutralización por la reserva alcalina y cuya neutralización no puede fundamentalmente ocurrir de modo absoluto instantáneo.

Hemos hecho ensayos de estabilidad de la estructura celular trabajando a pH inferiores, y en cuanto el pH del medio se aproxima al valor 8 ya empiezan a observarse síntomas de destrucción parcial del protoplasma celular y debe, pues, reconocerse, en nuestro concepto, que para que dichos síntomas sean visibles al microscopio es preciso, lógicamente, que mucho antes hayan ocurrido alteraciones físicoquímicas profundas del protoplasma celular, incompatibles con la vida.

Como ya es sabido, la alcalinidad del medio es un agente dispersante en toda clase de coloides proteínicos, bastando una débil alcalinidad del mismo para provocar tal efecto, y éste es precisamente el fundamento de la aplicación de tan interesante propiedad a la obtención de colas frías animales. La acidez, en cambio, las hace flocular rápidamente. Nos proponemos, por lo tanto, estudiar más detenidamente en otros trabajos, la aplicación de nuestras diazorreacciones tisulares a problemas relacionados con el pH de los medios internos biológicos del organismo.

La figura 6 representa un corte de parénquima hepático a pequeño aumento. La tinción se ha efectuado en medio ácido, trabajando a $\text{pH} = 5$, mediante la mezcla amortiguadora de acetato sódico y ácido acético, conforme lo hemos expuesto en la parte experimental de este trabajo.

En dicha microfotografía se observa precisamente una profunda

alteración del parénquima y que da la sensación de un punteado artificial; sensación ésta, debida, en nuestro concepto, a la floculación coloidal descrita precedentemente y que se hace visible gracias a nuestra diazorreacción tisular, por la insolubilidad de la capa protectora del azocolorante proteínico formado.

La figura 7 representa la misma imagen de la figura 6, pero a gran aumento. En ella se observa que tan sólo quedan relativamente bien conservados los núcleos, y el resto del tejido está lleno de precipitaciones, microcoágulos proteicos, etc.

En las figuras 8 y 9 puede apreciarse muy claramente su diferente intensidad de coloración. Corresponden a dos cortes de hígado, procedentes, respectivamente, de una rata sacrificada previa administración de triptófano (fig. 8), y de una rata testigo; operando conforme consta en la parte experimental de este trabajo, o sea a $\text{pH} = 6,5$, mediante la mezcla amortiguadora de acetato sódico y ácido acético, ya mencionada, y diazorreacción con el cloruro de *alfa*-antraquinondiazonio.

Es muy notable la diferencia que se observa al comparar ambas microfotografías, tanto en cuanto a la intensidad de tinción, incomparablemente mayor que la correspondiente a la figura 8, respecto a la 9, como en su aspecto general, y cuyo hecho será objeto de estudio más adelante en trabajos que tenemos en curso de realización actualmente. Hecho éste del mayor interés, en apoyo de las posibilidades de aplicación e interpretación clínicas y biológicas de nuestras diazorreacciones tisulares y que aparece evidente, en nuestro concepto, al observar la mucho mayor intensidad del color rojo de la capa de azocolorante proteínico y naturaleza de la misma, que tiñe el corte histológico del hígado de rata blanca tratada con dosis regulares de aminoácido, antes de ser sacrificada.

En efecto, en todos los procesos patológicos de degradación proteica, por degeneración tisular infecciosa o de tipo neoplásico, se observará evidentemente una mayor intensidad de tinción de los cortes histológicos procedentes de tejidos enfermos, respecto a los procedentes de tejidos sanos. En cambio, en los cortes procedentes de riñón, estas diferencias son muchísimo menos acusadas, pero es un hecho evidente que los procesos de desaminación a que están sujetos los aminoácidos, no ocurren en las mismas condiciones, ni con la misma intensidad en el hígado que en el riñón.

Debemos hacer constar nuestro profundo agradecimiento a la señorita María Bosch Feliu, enfermera especialista titulada de laboratorio, por toda su labor asidua, inteligente y muy valiosa, que ha venido desarrollando sin interrupción en este laboratorio durante muchos años y a la que sus obligaciones particulares le impedirán continuar en lo sucesivo prestando sus servicios profesionales, lamentándolo sinceramente por nuestra parte.

Resumen

Como consecuencia de la aplicación histoquímica en trabajos anteriores, de los ésteres fosfóricos de colorantes monohidroxiazóicos, al estudio de procesos fosfatásicos «in vivo», realizada por nosotros, hemos investigado la acción de las sales de diazonio sobre cortes histológicos de hígado y riñón de lotes de ratas blancas, previamente tratadas al efecto, aplicando por primera vez reacciones coloreadas del tipo de la de Ehrlich al estudio de problemas biológicos de posible interés clínico, mediante nuestras diazoreacciones tisulares. Se exponen algunos resultados experimentales, ilustrándolos con las microfotografías correspondientes.

Summary

As consequence of the histochemical appliance, in previous papers, of the phosphoric esters of monohydroxyazo dyestuffs to the study of phosphatasic process «in vivo», accomplished by the authors, we have investigated the action of diazonium salts on the histological cuts of liver and kidney of rats, previously treated for the experiments to be realized, applying for the first time coloured reactions of the Ehrlich's type to the study of biological problems of possible clinical interest, by means of our histological diazoreactions. We report several experimental results, illustrating them with the corresponding microphotographic figures.

Bibliografía

- GUILLEMONT, A.: *Ttraité chimie organique* (Grignard, **15**, 386 (Masson, Paris, 1948).
- KARRER, P.: *Lehrb. der organ. Chemie*, **476**, (Georg Thieme, Leipzig, 1937).
- MENTEN, M. L., JUNGE, J., y GREEN, M. H.: *Jour. Biol. Chem.*, **153**, 471, 1944.
- MONCHE, J.: *Anales Real Sdad. Esp. Física y Química*, **48**, (B), 518-521, 1952.
- MONCHE, J., y FERRER ARENILLAS, M.: *R. esp. Fisiol.*, **8**, 142-143, 1952.
- SELIGMAN, A. M., y NACHLAS, M. M.: *Jour. of the National Cancer Institute*, **9**, 415-425, 1949.
- SELIGMAN, A. M., y MANHEIMER, L. H.: *Jour. of the National Cancer Institute*, **9**, 427-434, 1949.
- SÖRENSEN, S. P. L. (JÖRGENSEN, H.): *Teorie, mesure et applications du pH*, 185 y 192 (Dunod, Paris, 1938).