

SINELI RITA SILVEIRA

Participação de substâncias de natureza lipídica no processo de queratinização epidérmica; estudo histoquímico dos queratinócitos e do compartimento extracelular.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como requisito ao Concurso de Livre Docência em Histologia.

ÍNDICE

	pág.
INTRODUÇÃO	1
1 - Queratinização da célula epidérmica	1
2 - Relação entre lípidos e "queratinas" epidérmicas	7
3 - Lípidos da epiderme	8
4 - Metabolismo lipídico na epiderme	11
5 - Influência de alterações da lipogênese sobre a quera- tinização epidérmica	15
6 - Comentários sobre a metodologia empregada no estudo da queratinização epidérmica	20
 MATERIAL E MÉTODOS	 23
1 - <i>Técnicas histoquímicas</i>	24
1.1 - Técnica do negro de Sudan B	24
1.2 - Técnica para lípidos contendo colina	24
1.3 - Técnica para demonstrar o íon PO_4^{3-}	25
1.4 - Técnica para demonstrar o íon SO_4^{2-}	25
1.5 - Técnica para demonstrar basofilia	26
1.6 - Técnicas para demonstrar substâncias redutoras	26
1.6.1 - Reação com o reativo de Schiff	26
1.6.2 - Reação do ferricianeto férrico	26
1.7 - Técnica para demonstrar substâncias dotadas de gru- pos 1,2-glicólicos	26
1.8 - Técnica para demonstrar proteínas	27
1.8.1 - Reação da aloxana-Schiff	27
1.8.2 - Reação do DDD	27
1.9 - Técnica para demonstrar colesterol	27
1.9.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina	27
1.9.2 - Reação do ácido peracético-Schiff	28
1.9.3 - Técnica para discriminar o colesterol não esterifi- cado dos ésteres do colesterol	28
1.9.4 - Teste de Schultz	29
1.10 - Técnica para demonstrar vitamina D e 7-deidrocoles- terol	29

	pág.
1.10.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na	29
1.10.2 - Reação do permanganato alcalino-Schiff	30
1.10.3 - Ação desmascarante de agentes hidrolíticos	31
1.11 - Técnica para demonstrar tocoferol	31
1.11.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina ...	31
1.11.2 - Reação do ácido perfórmico-reativo de Schiff ...	32
1.11.3 - Ação inibidora da formalina-bicloreto de mercú- rio	32
1.11.4 - Ação desmascarante de agentes hidrolíticos	32
2 - <i>Pré-tratamentos</i>	33
2.1 - Ribonuclease	33
2.2 - Metilação	33
2.3 - Solventes de lípidos	33
2.3.1 - Metanol-clorofórmio	33
2.3.2 - Metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	33
2.4 - Hidrolisantes	34
2.4.1 - Hidrólise pelo hidróxido de potássio	34
2.4.2 - Hidrólise pelo ácido perfórmico	34
2.4.3 - Hidrólise dos ésteres de colesterol	34
2.4.3.1 - Solução de ácido sulfúrico-ácido acético	35
2.4.3.2 - Solução de peridrol-amônia	35
2.4.3.3 - Solução de carbonato-bicarbonato de potássio ..	35
2.5 - Inibidores	35
2.5.1 - Bloqueio pela solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazi na	36
2.5.2 - Bloqueio pela solução de bicloreto de mercúrio ..	36
RESULTADOS	37
1 - Detecção histoquímica de lípidos totais: coloração pe lo negro de Sudan	37
1.1 - Ação do metanol-clorofórmio	38
1.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	38
1.3 - Ação do hidróxido de potássio	39
1.4 - Ação do ácido perfórmico	39
1.5 - Síntese	40
2 - Detecção histoquímica de lípidos contendo colina	41
2.1 - Ação do metanol-clorofórmio	42
2.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	42

	pág.
2.3 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	43
2.4 - Ação do ácido perfórmico	43
2.5 - Síntese	43
3 - Detecção histoquímica de substâncias dotadas do íon fosfato	44
3.1 - Reação para o íon fosfato, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease	44
3.2 - Efeito do peridrol-amônia sobre a reação para o íon fosfato, em cortes histológicos previamente trata- dos pela ribonuclease	45
3.3 - Efeito da fixação pela formalina-bicloreto de mercú- rio	45
3.4 - Ação do metanol-clorofórmio	45
3.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	45
3.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	45
3.7 - Síntese	46
4 - Detecção histoquímica de substâncias basófilas pelo azul de toluidina, em pH 0,3	47
4.1 - Ação da ribonuclease	47
4.2 - Ação da metilação	47
4.3 - Ação do metanol-clorofórmio	48
4.4 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	48
4.5 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	48
4.6 - Síntese	48
5 - Detecção histoquímica do colesterol	49
5.1 - Detecção do colesterol não esterificado	49
5.1.1. - Reação do ácido peracético-azul de toluidina ..	49
5.1.1.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente tratados pe- la ribonuclease	49
5.1.1.2 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação	50
5.1.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio	50
5.1.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio	50
5.1.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico .	50
5.1.1.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio .	51

	pág.
5.1.1.7 - Síntese	51
5.1.2 - Reação do ácido peracético-Schiff, em cortes his- tológicos sucessivamente tratados pela ribonuclea- se e pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina	52
5.2 - Detecção do colesterol total (colesterol e ésteres do colesterol)	53
5.2.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente tratados pela ri- bonuclease	53
5.2.2 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente submetidos à me- tilação	54
5.2.3 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em cortes histoló- gicos previamente tratados pela ribonuclease ...	55
5.2.4 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em cortes histoló- gicos previamente submetidos à metilação	55
5.2.5 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease	56
5.2.6 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação	56
5.2.7 - Síntese	56
5.3 - Detecção do colesterol total pelo teste de Schultz.	57
6 - Detecção histoquímica da vitamina D e do 7-deidroco- lesterol	58
6.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina .	58
6.1.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, em cortes histológicos previamente tratados pe- la ribonuclease	59
6.1.2 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, em cortes histológicos submetidos à metilação	60
6.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mer	

	pág.
cúrio	60
6.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio	61
6.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	61
6.1.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	61
6.1.7 - Ação do ácido perfórmico	61
6.1.8 - Síntese	62
6.2 - Reação do permanganato alcalino-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitro- fenil-hidrazina	62
6.3 - Efeito de agentes hidrolíticos sobre a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina	63
6.3.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acé- tico, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease	63
6.3.2 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acé- tico, em cortes histológicos previamente submeti- dos à metilação	64
6.3.3 - Síntese	64
6.3.4 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo peridrol-amônea, em cor- tes histológicos previamente tratados pela ribonu- clease	65
6.3.5 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo peridrol-amônea, em cor- tes histológicos previamente submetidos à metila- ção	65
6.3.6 - Síntese	65
6.3.7 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente tra- tados pela ribonuclease	66
6.3.8 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidi- na, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente sub- metidos à metilação	66
6.3.9 - Síntese	67

	pág.
7 - Detecção histoquímica do tocoferol	67
7.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina	67
7.1.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease	67
7.1.2 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos submetidos à metilação	68
7.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina	68
7.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina	68
7.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina	69
7.1.6 - Ação do hidróxido de potássio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina	69
7.1.7 - Ação da hidrólise pelo peridrol-amônia sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease	70
7.1.8 - Ação da hidrólise pelo peridrol-amônia sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação	71
7.2 - Reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina	71
7.2.1 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina	71
7.2.2 - Ação do metanol-clorofórmio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff	71
7.2.3 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff	72
7.2.4 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina	72

	pág.
7.2.5 - Ação do peridrol-amônia sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina ..	72
7.3 - Síntese	73
8 - Detecção histoquímica de grupos redutores	73
8.1 - Reação do ferricianeto férrico	73
8.1.1 - Ação do bicloreto de mercúrio	74
8.1.1.1 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de <u>mer</u> <u>cúrio</u>	74
8.1.1.2 - Ação do bicloreto de mercúrio, em cortes <u>histo</u> <u>lógicos</u> de pele fixada em formalina-cálcio	74
8.1.2 - Ação do metanol-clorofórmio	75
8.1.3 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	75
8.1.4 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	76
8.1.5 - Ação do ácido perfórmico	76
8.1.6 - Síntese	77
8.2 - Reatividade ao reativo de Schiff	78
9 - Detecção histoquímica de material PAS reativo	79
9.1 - Ação da amilase e da diastase do malte	79
9.2 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de <u>mercú</u> - <u>rio</u>	80
9.3 - Ação do metanol-clorofórmio	80
9.4 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico	80
9.5 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio	80
9.6 - Síntese	81
10 - Detecção histoquímica de substâncias dotadas do íon sulfato	82
11 - Detecção histoquímica de proteínas	83
11.1 - Reação da aloxana-Schiff	83
11.1.1 - Ação do metanol-clorofórmio	83
11.1.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ...	83
11.1.3 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio ...	84
11.1.4 - Ação do ácido perfórmico	84
11.2 - Reação do DDD	85
11.2.1 - Ação do metanol-clorofórmio	85
11.2.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ...	85
11.2.3 - Ação do ácido perfórmico	86
11.2.4 - Reação do DDD em cortes histológicos previamente	

	pág.
tratados pelo tioglicolato de sódio	86
11.2.5 - Síntese	87
12 - Documentação fotomicrográfica	89
DISCUSSÃO	107
1 - Lípides epidérmicos demonstrados pelo negro de Sudan.	108
2 - Lípides contendo colina presentes na epiderme	113
3 - Lípides contendo íon fosfato presentes na epiderme ..	116
4 - Relação entre o material sudanófilo e os lípides dota dos de colina e fosfato, presentes na epiderme	119
5 - Substâncias PAS positivas presentes na epiderme	128
6 - Colesterol e ésteres do colesterol presentes na epi- derme	134
7 - Vitamina D presente na epiderme	144
8 - Tocoferol presente na epiderme	149
9 - Material ferricianeto férrico positivo presente na epiderme	151
10 - Material de natureza protéica presente na epiderme .	156
11 - Síntese sobre a correlação entre os lípides intraepi dérmicos e a queratinização	158
RESUMO E CONCLUSÕES	170
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176

INTRODUÇÃO

A queratinização epidérmica, também chamada corneificação, tem sido definida como o processo que abrange uma série de modificações morfológicas e bioquímicas, progressivas, sofridas pelas células epiteliais viáveis e metabolicamente ativas, que culminam com a total diferenciação celular; a finalidade deste processo é constituir a camada córnea. Admite-se que a transformação de proteínas, sintetizadas no citoplasma dos queratinócitos, constitua importante evento no processo de queratinização da epiderme; de acordo com este conceito, FAREMAN (1966) definiu a queratinização como um processo múltiplo que termina com a síntese intracelular de proteína fibrosa e insolúvel: a "queratina".

Existe uma série de outras definições do processo de queratinização; porém, todas elas correlacionam este processo com a síntese da "queratina", ou seja, de uma proteína fibrosa especial. A tendência geral é, portanto, excluir da queratinização a participação de substâncias de natureza não protéica.

1 - Queratinização da célula epidérmica

No processo de queratinização epidérmica, em concomitância com a síntese da "queratina" ocorrem diversos outros eventos gerais que determinam a proliferação, a migração, a diferenciação e a descamação dos queratinócitos. Estes eventos se processam simultaneamente, pois os queratinócitos em diferenciação migram ordenadamente para a superfície cutânea e descamam.

Para que o equilíbrio morfofisiológico seja mantido, no interior da epiderme, as células descamadas são substituídas por outras provenientes da proliferação das mais profundas que, em seguida, se diferenciam. Desta forma, dois fenômenos destacam-se no processo de queratinização epidérmica: a

proliferação e a diferenciação celular. Esta última é a que mais particularmente nos interessa, por estar diretamente relacionada com a formação da "queratina".

Devido à sequência de eventos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, que ocorrem durante a diferenciação celular, quatro tipos principais de queratinócitos são considerados na epiderme, quais sejam: basais, espinhosos, granuloso e queratinizados, ou corneificados. Dentre estes tipos, os dois primeiros estão mais relacionados com a proliferação celular, enquanto nos últimos ocorrem as mais importantes etapas da diferenciação. Deve ser salientado que as substâncias contidas nas células queratinizadas são sintetizadas nos queratinócitos das camadas profundas da epiderme, pois conforme foi demonstrado, através do emprego de aminoácidos radioativos, a camada córnea é incapaz de sintetizar proteínas (FUKUYAMA *et alii.*, 1965; GUMUCIO *et alii.*, 1967; FUKUYAMA & EPSTEIN, 1968).

Admite-se que a diferenciação celular do queratinócito epidérmico ocorra precocemente e seja simultânea com a síntese de uma proteína fibrosa, que se apresenta sob a forma de filamentos, denominados tonofilamentos, ou tonofibrilas; esta síntese tem início nas células mais profundas da epiderme. Os tonofilamentos foram relacionados com o processo de queratinização desde UNNA & GOLODETZ (1903); essa correlação foi corroborada por outros autores (BRANCA, 1907; FIRKET, 1911; UNNA & SCHUMACHER, 1925; ROTHMAN & SCHAAF, 1929; KING, 1950) e amplamente confirmada posteriormente.

A comparação morfológica entre os tonofilamentos e os filamentos de "queratina", situados nas células queratinizadas da camada córnea, foi efetuada, minuciosamente, através da microscopia eletrônica (BRODY, 1959a, b, 1960a, b), tendo sido demonstrada grande semelhança entre ambos. A semelhança foi reforçada pelos resultados do espectro de difração dos raios X, que se apresenta característico e idêntico nos tonofilamentos e nos filamentos de "queratina" (MERCER, 1949; GIROUD & LEBLOND, 1951; RUDALL, 1952); foi também confirmada através do isolamento de uma proteína fibrosa da epiderme (pré-queratina), que possui as características morfológicas e espectrais da proteína dos tonofilamentos e da "queratina" da camada córnea (RUDALL, 1952; CARRUTHERS *et alii.*, 1957; CROUNSE, 1963; MATOLTSY, 1964a, b, 1965). Além disso, foi verificado que a composição de aminoácidos e a estrutura molecular da pré-que

tina e da "queratina" são muito semelhantes, sendo ambas constituídas por polipeptídeos com disposição α -helicoidal, que apresentam propriedades eletroforéticas semelhantes (BADEN & BONAR, 1968; BADEN & GOLDSMITH, 1972; BADEN *et alii.*, 1973; STERN *et alii.*, 1973; LEE *et alii.*, 1975). Todavia, a identidade entre a pré-queratina e a "queratina" somente foi demonstrada através da imuno-histoquímica, com o emprego de derivados S-carboximetilados da "queratina" (SHIMIZU *et alii.*, 1974); por meio desta técnica, foi verificada a identidade imunológica entre ambas. LEE *et alii.* (1976), empregando proteínas desnaturadas, confirmaram essa identidade, inclusive através da imuno fluorescência, o que também foi confirmado por DALE *et alii.* (1976), nas proteínas isoladas da epiderme do rato.

Embora imunologicamente idênticas, a pré-queratina e a "queratina" são diferentes quanto à solubilidade; enquanto a primeira é facilmente solúvel (RUDALL, 1952; MATOLTSY, 1964 a, b), a "queratina" da camada córnea é muito resistente aos solventes (FRATER, 1968; BADEN *et alii.*, 1971; TEZUKA & FREEDBERG, 1972b). Admitiu-se que esta diferença decorria da interação, na camada córnea, da proteína fibrosa com proteínas não fibrosas, pois das células queratinizadas, além de proteínas fibrosas, foram extraídas proteínas não fibrosas com alto teor de enxofre (RUDALL, 1952; MATOLTSY, 1965), que podem associar-se com as fibrosas, modificando suas propriedades (BRODY, 1959b, 1964; ZELICKSON, 1961). Existem evidências morfológicas que sugerem a presença de, pelo menos, dois tipos de proteínas nas células córneas, sendo um tipo fibroso e o outro amorfo. BIRBECK & MERCER (1957), BRODY (1959a) e ROGERS (1959) identificaram, nestas células, ao nível da microscopia eletrônica, estruturas filamentosas (constituídas por proteína fibrosa) intercaladas com a matriz protéica amorfa.

BRODY (1959a) e MERCER (1961) admitiram que a proteína não fibrosa da célula córnea, que constitui a matriz interfilamentosa, seria proveniente dos grânulos de queratoialina. Esta suposição baseou-se, inicialmente, em dados morfológicos e estruturais (BRODY, 1959a), bioquímicos e histoquímicos (FUKUYAMA *et alii.*, 1965, 1968; TEZUKA & FREEDBERG, 1972a; TEZUKA, 1975, 1976). Além disso, o isolamento de peptídeos, contidos na substância amorfa interfilamentosa da camada córnea, que apresentam grande semelhança com os peptídeos dos grânulos de queratoialina (MATOLTSY, 1975), constituiu novo argumento em fa

vor da hipótese que considera a matriz interfilamentosa, da célula córnea, como oriunda dos grânulos de queratoialina.

Novas tentativas de confirmação dessa hipótese foram efetuadas. DALE & STERN (1975a, b) compararam extratos proveⁿientes dos grânulos de queratoialina com o material extraído, através do emprego de uréia e mercaptoetanol, da matriz interfilamentosa da célula queratinizada; após os extratos terem sido submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida, a comparação, efetuada entre ambos, mostrou que os peptídeos da queratoialina estão presentes também na camada córnea. Estes resultados sugeriam grande semelhança entre os constituintes protêicos da queratoialina e os da matriz interfilamentosa da célula córnea.

Por outro lado, também em apoio a essa hipótese, foi demonstrado que aminoácidos "tritiados" são incorporados pelas células da camada granulosa e, após várias horas, as proteínas radioativas são encontradas na matriz interfilamentosa da célula córnea (FUKUYAMA & EPSTEIN, 1966), indicando correlação entre esses dois elementos. Em prosseguimento, foi demonstrado que as células córneas contêm uma proteína rica em histidina e arginina, situada na matriz interfilamentosa, que foi denominada proteína básica da camada córnea (DALE, 1977), ou proteína-2 rica em histidina (BALL *et alii.*, 1978). Devido à semelhança, quanto à composição química, foi sugerido que essa proteína derivasse de um precursor presente na queratoialina (DALE & LING, 1977); tentou-se demonstrar essa hipótese através da imunoquímica.

Com esta finalidade, DALE & LING (1979) prepararam imunossoro contra a proteína básica da camada córnea, o qual foi conjugado com peroxidase; este soro reagiu positivamente com os grânulos de queratoialina e com a proteína interfilamentosa das células da camada córnea; a reação era específica, revelando identidade imunológica entre ambos. Baseado nesses resultados, foi admitido que um precursor, localizado nos grânulos de queratoialina, se converte na proteína básica da camada córnea, quando os grânulos de queratoialina se desfazem e a célula granulosa se transforma na célula córnea.

De acordo com o que foi assinalado, parece bem demonstrado que os dois componentes que caracterizam a célula queratinizada e que constituem o padrão estrutural da "queratina" da camada córnea (BRODY, 1959a, b, 1960a, b; ALBRIGHT & LISTGARTEN,

1962; GIBBINS, 1962; RHODIN & REITH, 1962; ZELICKSON, 1963; LISTGARTEN, 1964), são de natureza protéica e derivam de proteínas sintetizadas nas células das camadas profundas da epiderme. Desses componentes, o fibroso contém polipeptídeos imunologicamente idênticos aos dos tonofilamentos; por outro lado, a matriz amorfa é constituída por polipeptídeos imunologicamente idênticos aos dos grânulos de queratoialina.

No entanto, cumpre salientar que as células queratinizadas, ou córneas, além desses componentes de situação intracelular e que constituem o seu citoplasma, apresentam-se envolvidas por membrana celular espessada que, por também participar das funções desempenhadas por estas células, deve ser devidamente considerada (MATOLTSY & BALSAMO, 1955; MATOLTSY, 1958; BRODY, 1959a, b, 1960b; MATOLTSY & PARAKKAL, 1965, 1967); a membrana celular espessada constitui consequência da diferenciação celular, que ocorre durante o processo de queratinização. A membrana espessada apresenta-se muito resistente aos agentes químicos e, por isso, admitiu-se que também contenha "queratina" (UNNA, 1913; CHAMPETIER & LITVAC, 1939).

A membrana celular espessada, que está presente em todas as células da camada córnea (FARQUHAR & PALADE, 1965; FARBMAN, 1966; BRODY, 1966, 1968, 1969; HASHIMOTO, 1969; RAKNERUD, 1974), é constituída por uma faixa interna, proveniente do citoplasma e ligeiramente mais eletrodensa do que ele (BRODY, 1959a, 1969; GRUBB *et alii.*, 1968; RAKNERUD, 1973), chamada faixa marginal (HASHIMOTO, 1969, 1970, 1971a), e por um revestimento, formado pela membrana plasmática propriamente dita. O conjunto apresenta cerca de $170 \text{ \AA}$ de espessura, em média (BRODY, 1969); a espessura é maior, atingindo 140 a $180 \text{ \AA}$, na face superficial da célula córnea e menor em sua face profunda, onde atinge $100 \text{ \AA}$ (MARTINEZ & PETERS, 1971). A membrana espessada é resistente ao tratamento por solução de hidróxido de sódio 0,1 N e apresenta maior teor de enxofre do que os filamentos de "queratina" e a matriz amorfa interfilamentosa (FARBMAN, 1966), situados no interior da célula; ao contrário, é digerida pela ação de proteases, conforme foi verificado através da microscopia eletrônica (WOLFF & SCHREINER, 1971).

A comparação das propriedades da membrana espessada com as do citoplasma da célula queratinizada mostra diferenças que devem refletir desigualdade de composição química, de cada

um destes componentes. Com base nestas diferenças foram identificados, a partir do trabalho de UNNA & GOLODETZ (1909), dois tipos de "queratina" na epiderme: a "queratina A", insolúvel em ácido nítrico e ácido sulfúrico contendo peróxido de hidrogênio, a qual está situada na membrana espessada; a "queratina B", solúvel nestes reagentes e localizada no interior da célula córnea. CHAMPETIER & LITVAC (1939) verificaram que a "queratina", localizada no interior da célula queratinizada da camada córnea e que apresenta anisotropia, além de característico espectro de difração dos raios X, é extraída por solução de hidróxido de potássio a 2%; esta substância foi denominada α -queratina. Ao contrário, a "queratina" da membrana espessada (que corresponde à "queratina A") não é extraída por esse tratamento, se apresenta isotrópica e com espectro de difração dos raios X muito diferente do correspondente ao da α -queratina.

Embora levando em consideração as diferenças assinaladas nas "queratinas" epidérmicas, admite-se que estas substâncias, não obstante heterogêneas quanto à composição química, sejam de natureza protéica e se caracterizem pelo espectro de difração dos raios X (BRADBURY, 1973). Deve ser salientado, entretanto, que o termo "queratina" ao mesmo tempo que tem sido usado para designar a proteína fibrosa da lã, cuja natureza e cuja composição química são bem conhecidas (SCHURINGA *et alii.*, 1952; ALEXANDER & HUDSON, 1954), também tem sido utilizado para identificar o produto responsável pela grande resistência da camada córnea da epiderme aos agentes físicos e químicos, cuja composição é pouco conhecida. São muito grandes, no entanto, as diferenças entre estes dois tipos de "queratina". Por outro lado, a "queratina" da epiderme difere da dos pêlos pela proporção de alguns aminoácidos, pelas dimensões da molécula e pelo seu comportamento eletroforético (CREWETHER *et alii.*, 1965; BADEN, 1970; PARRISH *et alii.*, 1972); além disso, a "queratina" dos pêlos apresenta maior teor de cistina e prolina (WARD & LUNDGREN, 1954; CREWETHER *et alii.*, 1968); a proteína insolúvel da camada córnea ("queratina") contém apenas 2,3 a 3,8% de cistina e 2,0% de enxofre, enquanto que a "queratina" do pêlo apresenta 17,0% de cistina e 5,0% de enxofre (WARD & LUNDGREN, 1954). ASTBURY (1942) havia verificado a presença de 15,0% de cistina no cabelo, proporção esta muito superior à do conteúdo de cistina da camada córnea (MATOLTSY, 1958).

De acordo com esses dados, os pêlos e a camada córnea conteriam "queratinas" diferentes entre si; porém, todas elas seriam, conforme o conceito predominante, de natureza protéica. Todavia, a análise química mostrou que membranas espaçadas, isoladas das células queratinizadas da epiderme, são constituídas por 66,0% de proteínas, 33,0% de lípidos e 1,0% de glúcides (MATOLTSY & PARAKKAL, 1967). De acordo com esses resultados, a membrana celular espessada, embora seja predominantemente protéica, contém razoável proporção de lípidos, sendo este o único componente da célula córnea que se admite conter lípidos; os dois outros componentes, isto é, as fibrilas de "queratina" e a matriz interfilamentosa, que constituem a maior parte da célula queratinizada, admite-se serem de natureza protéica. Convém salientar, no entanto, que MATOLTSY (1958) admite a presença de lípidos associados com a "queratina", na matriz interfilamentosa da célula córnea.

Resultados químicos, anteriormente obtidos, mostravam diferenças entre a "queratina" dos pêlos e a da epiderme; assim, a "queratina" da lã apresentava-se destituída de lípidos (SCHURINGA *et alii.*, 1952; ALEXANDER & HUDSON, 1954), ao contrário da "queratina" epidérmica.

Os resultados assinalados indicam que a "queratina" epidérmica difere de outros tipos de "queratina", além de sugerir que as proteínas, nela contidas, se interrelacionem com lípidos. Este assunto deve ser analisado pormenorizadamente.

2 - Relação entre lípidos e "queratinas" epidérmicas

Embora admita-se que do processo de queratinização participem apenas proteínas, existem diversos fatos e argumentos que são favoráveis à coparticipação de lípidos. Assim, a análise química revelou proporção relativamente alta de lípidos, na epiderme, a qual contém 5,25 mg de lípidos por mg de nitrogênio (WICKS & SUNTZEFF, 1942); os lípidos constituem 10,0 a 15,0% do peso seco da epiderme (WHEATLEY, 1965; OHKIDO *et alii.*, 1974); foi verificado, também, que a proporção de lípidos e de proteínas da "queratina" é aproximadamente equivalente, na epiderme do camundongo (WICKS & SUNTZEFF, 1942).

A presença de lípidos, associados com proteínas, na "queratina" foi, além disso, deduzida através dos resultados da difração dos raios X (SWANBECK, 1959; SWANBECK & THYRESON, 1962;

FRASER *et alii.*, 1963); esses resultados sugeriam a ocorrência de um componente lipídico na "queratina"; foi mesmo deduzida a existência de um complexo lipoprotéico na "queratina" da epiderme normal humana (HOLMES, 1961); esse complexo, isolado da pele, continha 30,0% de ácidos graxos, que se apresentavam ligados às proteínas através do aminogruppo da lisina.

O espectrograma dos raios X, da "queratina", permite supor que delgada película de fosfolípidos esteja recobrendo as fibrilas protéicas (SWANBECK, 1959). FRASER *et alii.* (1963) verificaram que o espectro de difração dos raios X da "queratina" é compatível com a presença de cristais lipídicos; por esse motivo, consideraram que os lípides a princípio se apresentavam estruturados em lamelas, as quais iniciavam a formação dos cristais lipídicos.

Por outro lado, através do espectro de difração dos raios X, mostrou-se que a "queratina" da epiderme apresenta diferenças em relação à "queratina" dos pêlos; na primeira, ocorre uma reflexão adicional característica, de $4,15 \text{ \AA}$, que não é verificada na "queratina" dos pêlos. Esta reflexão é proveniente da presença de um lípide, que integra a molécula da "queratina" epidérmica (CREWETHER *et alii.*, 1965; BADEN, 1970; PARRISH *et alii.*, 1972). O lípide parece dispor-se com orientação perpendicular, em relação à proteína fibrosa (BADEN & MADERSON, 1970). Admite-se que o lípide se incorpore à proteína, durante o processo de queratinização da epiderme (GOLDSMITH & BADEN, 1970).

Resultados bioquímicos são também favoráveis à ocorrência de modificações na pré-queratina, durante o processo de queratinização. Assim, LITVAC (1940) verificara que as tonofibrilas sofrem processo de amadurecimento durante a queratinização, tornando-se resistentes à ação das proteases, o que sugere a formação de complexos protéicos.

De acordo com o que foi sumariado, os resultados das dosagens químicas, efetuadas em extratos da epiderme, assim como a interpretação dos espectrogramas da difração dos raios X, sugerem que a "queratina" epidérmica não seja de natureza puramente protéica, parecendo conter um componente lipídico.

3 - Lípidos da epiderme

Nos queratinócitos, da mesma maneira que em todas as

células, existem lípidos e substâncias lipossolúveis que atuam como entidades estruturais ou como reserva de energia. A principal entidade estrutural é constituída pelas citomembranas, que contêm esteróis, fosfolípidos e esfingolípidos, sendo responsáveis pela delimitação dos compartimentos celulares. Os lípidos, que integram as citomembranas, ocorrem em proporção aproximadamente constante em todas as células.

Na epiderme, admite-se que os lípidos estruturais sejam liberados nas fases finais do processo de queratinização (lipofanerose), após a destruição dos orgânulos celulares. Esta hipótese foi aventada com base em resultados histoquímicos obtidos por RANVIER (1898), o qual assinalou a presença de apenas pequenos grânulos sudanófilos, nos queratinócitos das camadas basal e espinhosa da epiderme de mamíferos, em contraste com a intensa sudanofilia difusa verificada na camada córnea. Esta aparente maior proporção de lípidos na camada córnea foi relacionada com a lipofanerose, que ocorre no final do processo de queratinização. A eventual presença de outros lípidos nas células córneas, além daqueles liberados através da lipofanerose, não foi cogitada.

No caso particular da epiderme existem, ainda, dois outros tipos de lípidos; um deles é proveniente da secreção glandular, pois tanto as glândulas sebáceas quanto as sudoríparas secretam material lipídico, que faz parte do filme lipídico cutâneo e pode impregnar as células epidérmicas (MICKELSEN & KEYS, 1943). O outro tipo é constituído por lípidos e substâncias lipossolúveis, sintetizados pelos queratinócitos e que permanecem em seu interior durante a evolução do processo de queratinização.

O emprego de técnicas histoquímicas permitiu demonstrar que os lípidos, na epiderme, se apresentam sob formas diversas, nas várias espécies animais. Assim, na epiderme dos mamíferos gotículas lipídicas são observadas somente em circunstâncias anormais (HANUSOVA, 1960; MARTINEZ, 1972), enquanto que na epiderme de aves numerosas gotículas de lípidos ocorrem normalmente (PARAKKAL & MATOLTSY, 1968; MATOLTSY, 1969; FREINKEL, 1972a, b).

Grande parte do material sudanófilo da epiderme dos mamíferos não parece provir da secreção sebácea (MONTAGNA & CHASE, 1950), embora histoquimicamente não seja possível estabelecer diferenças entre os lípidos epidérmicos e os sebáceos

(MONTAGNA & NOBACK, 1947; MONTAGNA *et alii.*, 1948; SUSKIND, 1951); todavia, a presença de fosfolípidos e de colesterol, nos lípidos cutâneos (MONTAGNA *et alii.*, 1948; MONTAGNA & HAMILTON, 1949), sugere sua origem epidérmica, pois eles estão ausentes na secreção sebácea. Do mesmo modo, a sudanofilia da camada córnea da epiderme dos mamíferos não parece relacionada com a secreção das glândulas sebáceas (MONTAGNA & CHASE, 1950), pois ela persiste após a destruição destas glândulas e ocorre em espécies animais delas desprovidas (toninhas e golfinhos).

MATOLTSY & BALSAMO (1955) verificaram, bioquimicamente, a presença de lípidos nas células córneas, os quais estão associados às proteínas e à pequena quantidade de glúcidos; estes lípidos estariam situados na membrana espessada e na matriz interfilamentosa da célula córnea e parecem intimamente relacionados com a "queratina" (MATOLTSY, 1958).

Através de técnicas bioquímicas, foi amplamente verificado que os lípidos, situados no interior dos queratinócitos e que são encontrados inclusive nas áreas da epiderme desprovidas de glândulas sebáceas (ROTHMAN, 1954; KLIGMAN & SHELLEY, 1958), são constituídos, predominantemente, por esteróis, ésteres de esteróis (LEWIS & HAYWARD, 1971), fosfolípidos e esfingolípidos (REINERTSON & WHEATLEY, 1959; CARRUTHERS, 1964; WHEATLEY & FLESCHE, 1967; ANSARI *et alii.*, 1970; LONG, 1970).

Além dos lípidos situados no interior dos queratinócitos existem, na epiderme, outros de situação intercelular, os quais são encontrados, principalmente, na camada córnea. A princípio, a presença desses lípidos foi interpretada como artefato, provocado pela fixação prolongada (MONTAGNA, 1952). Estudos citoquímicos indicaram, todavia, que os lípidos intercelulares são provenientes dos corpos lamelares (ELIAS *et alii.*, 1979a).

Corpos lamelares, ou de Odland (ODLAND, 1960), são estruturas submicroscópicas, recobertas por membrana tríplice bem definida e que apresentam, internamente, lamelas claras e escuras dispostas alternadamente e periodicamente (ODLAND, 1960; FARBMAN, 1964; MATOLTSY & PARAKKAL, 1965). São encontrados em pequeno número no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais profundos da camada espinhosa; seu número aumenta nos extratos mais superficiais desta camada e na camada granulosa, onde situam-se na periferia da célula e, em seguida, atingem o

espaço intercelular (WOLFF-SCHREINER, 1977). Após atingirem o espaço intercelular desintegram-se lentamente e seu conteúdo, liberado, aí permanece, constituindo o material lipídico intercelular, que recobre o folheto externo da membrana plasmática das células granulosas e córneas (MARTINEZ & PETERS, 1971). Como os corpos lamelares são constituídos por esteróis livres e fosfolípidos (BREATHNACH & WYLLIE, 1966; WILGRAM *et alii.*, 1973; KUROSUMI, 1977; ELIAS *et alii.*, 1979a), estes são os lípidos liberados após a desintegração desses orgânulos. Os lípidos intercelulares, além de contribuírem para a adesão das células córneas entre si, parecem atuar como barreira à penetração de substâncias pela via transepidérmica (BLANK, 1953; ONKEN & MOYER, 1963; BRODY, 1966; SCHREINER & WOLFF, 1969).

4 - Metabolismo lipídico na epiderme

Há evidências morfológicas, bioquímicas e histoquímicas, de que a lipogênese e a metabolização dos lípidos são muito intensas nos queratinócitos epidérmicos. Dentre as evidências morfológicas e histoquímicas, destacam-se o grande desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e, principalmente na epiderme das aves, a presença de gotículas de lípidos nos queratinócitos das camadas basal e espinhosa (MATOLTSY, 1969). Nos mamíferos, o retículo endoplasmático liso se apresenta mais desenvolvido nas células dos estratos superficiais das camadas espinhosa e granulosa, onde se encontra situado entre os tonofilamentos e os grânulos de queratoialina (WOLFF-SCHREINER, 1977); nas fases finais do processo de queratinização, o retículo endoplasmático se reduz intensamente e desaparece.

O retículo endoplasmático liso dos queratinócitos foi relacionado com a biossíntese de fosfolípidos (WHALEY *et alii.*, 1974) e de esteróis (CHRISTENSEN & FAWCETT, 1961; CHRISTENSEN, 1965; FRIEND & BRASSIL, 1970). Esta relação é corroborada pela presença de algumas enzimas, tais como a fosfatase ácida, a inosina difosfatase, a tiamina pirofosfatase e a aril sulfatase, no retículo endoplasmático liso, as quais desempenham importante função no metabolismo lipídico (WOLFF-SCHREINER, 1977). A presença de enzimas, relacionadas com esse metabolismo, foi assinalada no citoplasma dos queratinócitos das camadas basal e espinhosa da epiderme de aves, nos quais é alta a atividade esterásica (LAVKER, 1975). A epiderme de mamíferos também apresen

ta esterases não específicas, nos queratinócitos da camada espinhosa e, em menor proporção, nos queratinócitos da camada córnea (HELWIG & MOSTOFI, 1971; STEVENS & DEVILLEZ, 1980). A esterase tiol-acética e a indoxil esterase (SQUIER & WATERHOUSE, 1970) também foram assinaladas nos queratinócitos. A presença de esterase não específica, na epiderme humana e do rato, havia sido verificada por THOMPSON & WHITTAKER (1944), através de método manométrico; todavia, esses resultados não foram confirmados por técnicas histoquímicas (MONTAGNA, 1952). No entanto, discreta atividade lipásica foi verificada, na epiderme humana e do hamster, através de técnicas histoquímicas (MONTAGNA & PARKS, 1948; MONTAGNA & HAMILTON, 1949).

As fosfatases ácidas, que também parecem ter relação com o metabolismo dos lípidos, por atuarem conjuntamente com as esterases (BEJDL, 1954), ocorrem em abundância nos queratinócitos dos extratos superiores da camada espinhosa, nos da camada granulosa e nas células queratinizadas dos extratos mais internos da camada córnea (HELWIG & MOSTOFI, 1971). Por outro lado, BEJDL (1954) assinalou o desaparecimento da atividade fosfatásica ácida, na camada lúcida e correlacionou este achado com a presença de lípidos nesta camada. A existência de fosfatase ácida foi confirmada nos queratinócitos de várias espécies de mamíferos, tendo sido, também, assinalada atividade aril sulfatásica (EISEN *et alii.*, 1964; BRAUN-FALCO & RUPEC, 1967; ROWDEN, 1967, 1968; OLSON *et alii.*, 1968, 1969; RUPEC, 1970; SQUIER & WATERHOUSE, 1970).

Outras enzimas do tipo degradativo, tais como fosfolipases, lisofosfolipases, esfingomielinase e fosfatases, também foram assinaladas na epiderme do homem e do porco (LONG, 1975; BOWSER, 1978; BOWSER & GRAY, 1978); estas enzimas foram relacionadas com o catabolismo dos fosfolípidos situados nas membranas das organelas dos queratinócitos, inclusive dos corpos lamelares.

A presença de diversos tipos de enzimas relacionadas com o metabolismo lipídico, na epiderme, sugere grande atividade, tanto no que concerne ao anabolismo quanto ao catabolismo dos lípidos. O catabolismo ocorre com maior intensidade nas fases finais do processo de queratinização. Devido ao catabolismo dos glicerolípidos e dos esfingolípidos, que ocorre durante a diferenciação da célula epidérmica, na camada córnea encontra-se pequena quantidade de glicoesfingolípidos, fosfolípidos,

triglicérides e ésteres do colesterol, ao contrário do colesterol não esterificado, das ceramidas e dos ácidos graxos que ocorrem em maior proporção (GRAY & YARDLEY, 1975a).

Embora as evidências assinaladas sejam favoráveis à ocorrência de biossíntese e de metabolização de lípidos, na epiderme, a lipogênese nos queratinócitos só foi devidamente demonstrada mediante o emprego de precursores radioativos. GRIESEMER & THOMAS (1963a, b, 1966) verificaram a incorporação de acetato- ^{14}C , na epiderme humana, em ácidos graxos de cadeia curta. Esses dados foram confirmados em cultura de células epidermicas (WILKINSON, 1970), tendo sido demonstrada a biossíntese de ácidos graxos, a partir do acetato, e o prolongamento subsequente da cadeia alifática (NICOLAIDES, 1974). OHKIDO *et alii*. (1972b) verificaram que o glicerol- ^{14}C é utilizado para a biossíntese de triglicérides, na epiderme do rato.

O emprego de acetato- ^{14}C permitiu, também, estudar a lipogênese em células epidérmicas de aves, consideradas adequadas para este tipo de estudo (FREINKEL, 1972a, b); através desta técnica foi demonstrada a síntese de triglicérides, esteróis e ésteres de esteróis, em cultura de células.

A incorporação de ácidos graxos radioativos não só evidenciou a intensa biossíntese de lípidos, na epiderme, como esclareceu alguns pontos obscuros referentes a esta síntese. Assim, LAVKER (1975) estudou a incorporação de palmitato- ^3H , na epiderme de aves, a qual se efetua, principalmente, nos triglicérides e fosfolípidos e, em menor grau, nos ésteres de ceras (ceramidas). A incorporação ocorre, inicialmente, no retículo endoplasmático das células das camadas basal e espinhosa, aparecendo, sucessivamente, nas camadas granulosa e córnea; nesta última, o palmitato- ^3H aparece sete dias após a injeção. A incorporação do palmitato "tritulado" às gotículas de lípidos dos queratinócitos, inicialmente, é muito pequena, aumentando progressivamente à medida que a célula se diferencia e atinge as camadas granulosa e córnea. A incorporação de palmitato- ^3H parece efetuar-se por esterificação, com intervenção do retículo endoplasmático liso, da mesma maneira que ocorre no fígado. Esses resultados indicam que a biossíntese de triglicérides, fosfolípidos e ceramidas ocorrem, principalmente, nas camadas mais profundas da epiderme, sendo estes lípidos mantidos sob a forma de gotículas na camada córnea das aves, onde tomam parte na formação da matriz interfibrilar da célula queratinizada.

(LAVKER, 1975).

Por outro lado, na epiderme ocorre síntese de colesterol, que se efetua nos queratinócitos e pode ser comprovada tanto através da presença de produtos intermediários quanto da incorporação de acetato-¹⁴C (SRERE *et alii.*, 1950; NICOLAIDES & ROTHMAN, 1955; WILSON, 1963; NICOLAIDES, 1963, 1964; KANDUTSCH, 1964). Admite-se que a esterificação do colesterol sobrevenha tardiamente, pois ésteres do colesterol são encontrados principalmente nos extratos superficiais da camada córnea, devido à ação dos ácidos graxos livres sobre o colesterol livre, ambos aí presentes (NICOLAIDES *et alii.*, 1970).

Tanto o colesterol quanto os fosfolípides, sintetizados na epiderme, estão associados às membranas biológicas (STOECKENIUS & ENGELMAN, 1969), supondo-se que o colesterol tenha a função de estabilizar os fosfolípides (THEISE, 1973). Quando essas membranas se desintegram (lipofanerose), no final do processo de queratinização, os ácidos graxos permanecem, em parte, nas células queratinizadas (NICOLAIDES, 1974). Aliás, devido à lipofanerose, que ocorre na camada granulosa, o teor de triglicérides e ácidos graxos, nas camadas granulosa e córnea, é maior do que nas outras camadas da epiderme (LONG, 1970).

Paralelamente, foram observadas variações qualitativas e quantitativas dos lípides epidérmicos, durante o processo de queratinização, o que indica relação entre o conteúdo lipídico dos queratinócitos e a diferenciação celular. KOOYMAN (1932) dosou o colesterol e os fosfolípides, nas diversas camadas da epiderme, verificando modificações no decorrer do processo de queratinização; dentre essas modificações, incluiu a transformação de lípides polares em lípides neutros. Esses resultados foram inicialmente discutidos e nem sempre devidamente considerados, pois os lípides epidérmicos foram, por vezes, admitidos como simples componentes do sistema de membranas dos queratinócitos e, portanto, desvinculados do processo de queratini^zação (NICOLAIDES, 1964). Contudo, diversas modificações do conteúdo lipídico foram assinaladas nas camadas epidérmicas de mamíferos e correlacionadas com a diferenciação celular (REINERTSON & WHEATLEY, 1959; WHEATLEY & FLESCHE, 1967; LONG, 1970; GRAY & YARDLEY, 1975a).

Na epiderme de aves, também, foram demonstradas variações dos lípides durante a queratinização epidérmica. Essas variações atingem, principalmente, as gotículas de lípidos das

células epidérmicas, que se dispõem junto à membrana celular (PARAKKAL & MATOLTSY, 1968; MATOLTSY, 1969); na camada espinhosa as gotículas são pequenas, aumentando de diâmetro à medida em que a célula se diferencia; na camada córnea as gotículas de lípidos estão presentes na porção central da célula (MATOLTSY, 1969). Esses resultados foram confirmados por FREINKEL (1972b) que verificou, além disso, modificações da lipogênese durante a queratinização; assim, assinalou que, nas fases finais da queratinização, a síntese de fosfolípidos diminui, ao contrário da biossíntese de ésteres de esteróis e de ceras (ceramidas), que aumentava. Esses resultados foram obtidos através da incorporação de acetato- ^{14}C , nos ácidos graxos e nos esteróis da epiderme, a qual aumenta, inicialmente, durante a queratinização da epiderme do embrião de galinha; quando sobrevém o início da formação da camada córnea, tanto a lipogênese quanto a concentração de ácidos graxos e de colesterol diminuem e, em seguida, permanecem constantes (FREINKEL, 1972b). Esses resultados foram parcialmente confirmados, em cultura de pele de embrião de galinha (FREINKEL, 1972a); também, *in vitro*, a corneificação é acompanhada de aumento da lipogênese, aumento dos triglicérides e dos ésteres de esteróis e de ceras.

5 - Influência de alterações da lipogênese sobre a queratinização epidérmica

Tem sido verificado que o transtorno da lipogênese repercute sobre a queratinização da epiderme. Excluindo as alterações da queratinização epidérmica, que ocorrem em diversas dermatoses cuja patogenia não está completamente esclarecida e que não constituem o objeto da presente revisão bibliográfica, iremos nos restringir à análise das alterações encontradas em condições experimentais, que permitem interrelacionar a diferenciação do queratinócito com modificações do metabolismo lipídico epidérmico, propositalmente induzidas. Dentre essas alterações, destaca-se a proveniente da deficiência de ácidos graxos essenciais.

Os ácidos graxos essenciais, polinsaturados, desempenham função estrutural nas células epidérmicas, após serem incorporados aos fosfolípidos e participarem da constituição das estruturas membranosas (AAES-JORGENSEN, 1961). Quando sobrevém

carência de ácidos graxos essenciais diminui o nível epidérmico do ácido linoléico (considerado essencial), ao mesmo tempo que aparece o ácido 5,8,11-eicosatrienóico nas lecitinas epidérmicas (PROTTEY *et alii.*, 1975). O ácido 5,8,11-eicosatrienóico não ocorre na epiderme normal, sendo característico da deficiência de ácidos graxos essenciais (FULCO & MEADS, 1959), da mesma maneira que outros ácidos trienóicos (BASNAYAKE & SINCLAIR, 1956). Esses resultados indicam que, na carência, os ácidos graxos essenciais são substituídos por outros ácidos não essenciais insaturados (DeTOMAS *et alii.*, 1963).

Como consequência dessa substituição, a estrutura dos fosfolípidos dos queratinócitos se apresenta alterada, o que acarreta modificações das propriedades das citomembranas, inclusive distúrbios funcionais das mitocôndrias, conforme foi muito bem observado no fígado (LEVIN *et alii.*, 1957; SINCLAIR, 1958; WILSON & LEDUC, 1963). Na epiderme ocorrem, também, alterações da queratinização, com espessamento da camada córnea e grande descamação celular (WHITE *et alii.*, 1973; LORD *et alii.*, 1978; LORD & ZIBOH, 1979). Em várias espécies animais, inclusive no homem, foram assinaladas lesões cutâneas na carência de ácidos graxos essenciais (BURR & BURR, 1929; HOLT *et alii.*, 1935; HANSEN & WIESE, 1944; HANSEN *et alii.*, 1958; WARWICK *et alii.*, 1959; ALFIN-SLATER & AFTERGOOD, 1968; HOLMAN, 1968; CALDWELL *et alii.*, 1972; RIELLA *et alii.*, 1975). No rato foi verificada uma dermatose escamosa, com acantose e hiperqueratose (KINGERY & KELLUM, 1965; McCULLOUGH *et alii.*, 1978); as lesões encontradas, no homem (WIESE, 1971) e no camundongo (MENTON, 1970), são semelhantes. De acordo com os trabalhos citados, além de hipertrofia da epiderme e aumento da descamação, ocorrem outros transtornos da queratinização e aumento da proliferação dos queratinócitos mais profundos; essas alterações foram correlacionadas entre si, permitindo estabelecer que a hipertrofia epidérmica resulte do aumento da proliferação celular, pois sobrevêm, simultaneamente, com a intensificação da descamação.

A proliferação celular pode ser estimada através do número de mitoses nas células germinativas epidérmicas. Em ratos, submetidos à carência de ácidos graxos essenciais, nem sempre foi comprovado aumento do número de mitoses dos queratinócitos (RAMALINGASWAMI & SINCLAIR, 1953; VINSON *et alii.*, 1961); todavia, foi assinalado aumento aparente do número de mitoses em

cães e também em ratos, o que não foi comprovado pela contagem das células em divisão (HANSEN *et alii.*, 1951; KINGERY & KELLUM, 1965). Mais recentemente, através da comparação entre o número de mitoses na epiderme de animais carentes e na de animais controles, foi demonstrada muito maior frequência de mitoses nos primeiros, o que concorda com o aumento das atividades succinodeidrogenásica e citocromoxidásica, nos extratos mais profundos da camada espinhosa (MENTON, 1968), pois essas enzimas são consideradas indicadoras da atividade mitótica (MONTAGNA & FORMISANO, 1955).

A cinética da proliferação celular, da epiderme de ratos carentes, foi estudada por McCULLOUGH *et alii.* (1978), através da incorporação da timidina-³H, tendo sido demonstrado que o aumento da atividade proliferativa decorre da maior rapidez do ciclo celular e da mais rápida migração dos queratinócitos no interior da epiderme; essa migração passa de seis dias, nos controles, para dois dias, nos animais carentes.

As alterações da queratinização, na epiderme do cão, verificadas na carência de ácidos graxos essenciais, foram, por outro lado, interpretadas como devidas à diferenciação incompleta do queratinócito (HANSEN *et alii.*, 1951); de acordo com esta interpretação, a queratinização estaria interrompida, o que repercutiria na proliferação celular. Entretanto, a hipertrofia da epiderme foi correlacionada com o aumento da atividade fosfatásica ácida, tendo em vista os resultados obtidos por BRAUN-FALCO (1958a), na epiderme de portadores de psoríase. Em camundongos mantidos em carência de ácidos graxos essenciais, a atividade fosfatásica ácida, na epiderme, se apresentava aumentada nos queratinócitos da camada granulosa, o que indicaria aceleração da diferenciação celular (MENTON, 1968); de acordo com essa interpretação, a queratinização epidérmica não estaria interrompida.

Tem sido observada alguma semelhança entre as alterações bioquímicas, que sobrevêm na epiderme de animais em carência de ácidos graxos essenciais e as que ocorrem na psoríase; em ambas, há aumento do metabolismo dos carboidratos (HALPRIN & OHKAWARA, 1966; ZIBOH & HSIA, 1972), aumento da síntese de lípidos (HERDENSTAM, 1962; ZIBOH & HSIA, 1972), aumento da metabolização da prostaglandina-E₂ (ZIBOH *et alii.*, 1977) e diminuição da atividade da adenilciclase (WRIGHT *et alii.*, 1973). No entanto, essas semelhanças são apenas aparentes, pois a

administração do ácido linolêico cura ou previne, as lesões cutâneas provenientes da carência de ácidos graxos essenciais e não tem ação sobre as lesões da psoríase. A regressão das lesões, resultantes da carência, ocorre tanto após a administração oral quanto após a aplicação local do ácido linolêico (SHEPHERD & LINN, 1936; GRANDEL, 1939; PROTTEY *et alii.*, 1975); em ambos os casos aumenta o teor desse ácido nos fosfolípidos epidérmicos, ao mesmo tempo em que se reduz o nível de outros ácidos graxos insaturados.

Esses resultados indicam que o ácido linolêico desempenha função importante na patogenia das lesões epidérmicas encontradas na carência de ácidos graxos essenciais. Contudo, é difícil avaliar se as alterações da queratinização epidérmica, que ocorrem nessas circunstâncias, seriam consequência direta da ausência do ácido linolêico (PROTTEY, 1976, 1977), pois foi demonstrado que a deficiência de ácido linolêico reduz a síntese do ácido aracdônico (HOLMAN, 1968; PROTTEY, 1976), responsável pela produção de reguladores da proliferação epidérmica, dentre os quais se incluem hidróxiácidos e prostaglandinas (GOLDYNE, 1975; HAMMARSTROM *et alii.*, 1975). Como consequência da redução dos reguladores, haveria proliferação epidérmica (LOWE & STOUGHTON, 1977), a qual regride com a aplicação tópica de prostaglandinas (ZIBOH & HSIA, 1972).

No entanto, a alteração da permeabilidade cutânea, que ocorre na carência de ácidos graxos essenciais, parece uma consequência direta da ausência do ácido linolêico, pois é corrigida pela aplicação tópica desse ácido ou do ácido linolênico (HARTOP & PROTTEY, 1976; PROTTEY, 1977).

Convém salientar que pequena proporção de ácido linolêico foi assinalada nos lípidos extraídos da camada córnea da epiderme humana e do porco (ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a), fazendo parte dos lípidos polares, ou seja, dos glicosfingolípidos (GRAY & WHITE, 1978; GRAY *et alii.*, 1978b).

Outra alteração epidérmica, encontrada na carência de ácidos graxos essenciais, consiste no alargamento do espaço intercelular da camada espinhosa (HANSEN *et alii.*, 1951; PANOS & FINERTY, 1953; MENTON, 1968), que parece determinar menor adesão entre as células, com repercussão sobre a descamação da camada córnea; em consequência dessa alteração ocorre, também, maior perda de água transepidérmica (MENTON, 1968). Aliás, a barreira epidérmica, responsável pela ausência de perda de

água, que foi correlacionada com a camada córnea (BLANK, 1953), se apresenta alterada na carência de ácidos graxos essenciais, conforme foi amplamente assinalado (FELSHER & ROTHMAN, 1945; BASNAYAKE & SINCLAIR, 1954; ROTHMAN, 1954; SINCLAIR, 1958; VINSON *et alii.*, 1961; SPRUIT & MALTEN, 1966; MENTON, 1968; IDSON, 1973; PROTTEY *et alii.*, 1975).

A alteração da permeabilidade epidérmica, observada na carência de ácidos graxos essenciais, foi atribuída, inicialmente, à desidratação das células da camada espinhosa, como consequência da aceleração do processo de queratinização (FELSHER & ROTHMAN, 1945). No entanto, deve ser salientado que, nos animais carentes, ocorrem perturbações da constituição dos lípides epidérmicos, que influi na atividade da barreira epidérmica, provocando perda de água transepidérmica (MENTON, 1968). Além disso, parecem ocorrer, também, alterações estruturais da membrana da célula queratinizada, devido à modificações da constituição dos fosfolípidos (MENTON, 1968). Todas essas alterações podem ser responsáveis pelos transtornos da permeabilidade epidérmica.

O aumento da permeabilidade da epiderme tem sido considerado como a alteração mais importante, provocada pela carência de ácidos graxos essenciais; a hiperplasia epidérmica seria uma consequência do aumento de permeabilidade e teria como finalidade dificultar a perda de água (MENTON, 1967); devido a esse motivo, quando camundongos carentes são mantidos em ambiente úmido, ocorre menor perda de água e menor hiperplasia da epiderme.

Foi verificado que os corpos lamelares, que passam para o espaço intercelular, não se apresentam em número reduzido na deficiência de ácidos graxos essenciais (MENTON, 1970). Entretanto, os corpos lamelares se apresentam geralmente vazios e seu conteúdo não preenche o espaço intercelular das camadas granulosa e córnea e, como consequência, os lípides neutros se apresentam em menor proporção (ELIAS & BROWN, 1978). Esses resultados possuem interesse no que diz respeito à influência da carência de ácidos graxos essenciais na permeabilidade epidérmica, pois a importância da função desempenhada pelos lípides extracelulares da camada córnea, nessa permeabilidade, é bem conhecida (BERENSON & BURCH, 1951; MALI-NIJMEGEN, 1956; MATOLTSY *et alii.*, 1968; SWEENEY & DOWNING, 1970). No entanto, convém lembrar que as alterações epidérmicas encontra

das nas dermatoses escamosas, nas quais sobrevêm aumento de permeabilidade cutânea são, por vezes, consideradas consequência de anormalidades do metabolismo das proteínas; contudo, este conceito não foi comprovado (ELIAS, 1981).

As alterações epidérmicas, verificadas na carência de ácidos graxos essenciais, onde ocorrem profundas alterações do metabolismo lipídico, constituem evidências da correlação entre os lípidos e a queratinização. Por outro lado, está bem demonstrado que alterações dos lípidos epidérmicos são acompanhadas de alterações da queratinização (PARSONS & FLINN, 1959; YORK-MOORE & RUNDLE, 1962; WINKELMANN *et alii.*, 1963; SIMPSON *et alii.*, 1964; ANDERSON & MARTT, 1965; MOSER & LEES, 1966; DYKES *et alii.*, 1978). Nas dermatoses que decorrem da ausência de enzimas específicas do metabolismo lipídico (MOSER, 1972; DYKES *et alii.*, 1978; WEBSTER *et alii.*, 1978) ou naquelas que constituem consequência da interferência de drogas sobre o metabolismo dos esteróis (PARSONS & FLINN, 1959; WINKELMANN *et alii.*, 1963; SIMPSON *et alii.*, 1964; ANDERSON & MARTT, 1965), parece evidente que as alterações da queratinização constituam consequência da alteração do metabolismo lipídico, confirmando a importância dos lípidos na queratinização normal da epiderme.

6 - Comentários sobre a metodologia empregada no estudo da queratinização epidérmica

Algumas observações devem ser feitas a respeito das alterações do conteúdo lipídico dos queratinócitos, verificadas durante o processo de queratinização. Essas alterações foram estabelecidas, na maioria das vezes, com base em dados bioquímicos obtidos através da análise dos lípidos extraídos da epiderme *in totum*; a metodologia bioquímica convencional, embora apropriada para estudos analíticos da composição lipídica de homogeneizados de tecidos, fornece informações de importância limitada no que se refere ao estudo da queratinização, por serem os resultados baseados em valores médios, provenientes de toda a população celular da epiderme. No caso particular da queratinização epidérmica, com o decorrer da evolução e da diferenciação celular, originam-se substâncias relacionadas com esse processo; no entanto, a presença de uma determinada substância, que surge como decorrência da diferenciação celular,

atinge apenas pequena parcela da população celular epidérmica. Assim sendo, os valores médios das dosagens bioquímicas são incapazes de evidenciar diferenças que ocorrem em reduzidas populações celulares, diferenças estas, no entanto, que caracterizam etapas do processo de queratinização; os valores médios são, portanto, inadequados para estabelecer a correlação entre as variações dos diversos tipos de lípidos e as várias etapas da diferenciação do queratinócito.

Com a finalidade de contornar esses inconvenientes, análises bioquímicas foram feitas em populações de queratinócitos isolados, correspondentes apenas algumas etapas do processo de queratinização (GRAY & YARDLEY, 1975a). No entanto, as técnicas empregadas com esse intuito determinam perda ou degradação de alguns tipos de lípidos (ELIAS *et alii.*, 1979a). Por outro lado, os lípidos celulares geralmente formam complexos com proteínas, cujos constituintes se apresentam ligados com diversos graus de labilidade; durante o processamento bioquímico, as ligações podem romper-se, interferindo nos resultados.

Também a microscopia eletrônica não é adequada para a demonstração de lípidos na epiderme, uma vez que, na preparação dos tecidos para a análise ultraestrutural, são usados solventes, sendo a extração lipídica inevitável (KORN & WEISMAN, 1966). Embora esse inconveniente possa ser reduzido com o emprego de técnicas modificadas de desidratação (STEIN & STEIN, 1967), os inconvenientes não podem ser totalmente evitados. O uso obrigatório de solventes orgânicos tem sido admitido como capaz de interferir, também, na localização de enzimas, ou seja, de proteínas (SABATINI *et alii.*, 1963; BRUNK & ERICSSON, 1972), ao nível da microscopia eletrônica.

As evidências fornecidas por diferentes métodos, conforme se depreende da revisão bibliográfica efetuada, indicam que há grande influência dos lípidos na queratinização epidérmica; contudo, os dados histoquímicos relativos à demonstração de diferentes tipos de lípidos, na epiderme, são pouco numerosos, isto é, insuficientes para permitir que se estabeleça correlação direta entre lípidos e queratinização. Além disso, os resultados histoquímicos foram obtidos através de técnicas nem sempre dotadas de especificidade, o que os tornam pouco significativos. No entanto, deve ser salientado que a histoquímica constitui o elo de associação entre a morfologia e a bioquímica, pois possibilita a evidenciação de eventos bioquímicos in

situ, fornecendo importante complemento aos dados estruturais. Os resultados histoquímicos, embora sujeitos à críticas, permitem a localização topográfica em nível microscópico, de forma bem superior à obtida com as técnicas bioquímicas de fracionamento (OLSON *et alii.*, 1969). Por outro lado, os dados histoquímicos são suscetíveis de permitir localizar e correlacionar lípidos e substâncias lipossolúveis, com o decurso das diversas etapas do processo de queratinização; além disso, os resultados histoquímicos permitem relacionar os lípidos com as diferentes estruturas morfológicas, que ocorrem nos queratinócitos à medida que eles se diferenciam e se tornam queratinizados.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de utilizar técnicas histoquímicas capazes de fornecer resultados adequados para a interpretação dos eventos morfo-bioquímicos, que ocorrem durante o processo de queratinização, pois diante das considerações anteriormente efetuadas, no caso especial da investigação do processo de queratinização da epiderme, os resultados topográficos apresentam maior significado; quando obtidos com técnicas dotadas de especificidade e sensibilidade, proporcionam informações de grande interesse analítico. Estas informações, além disso, são adequadas para o estudo de populações celulares heterogêneas, que sofrem variações relacionadas com a dinâmica de um processo contínuo, tal como ocorre com a queratinização epidérmica.

Por esses motivos foram selecionadas, para serem usadas no presente trabalho, técnicas histoquímicas adequadas, isto é, específicas e dotadas de sensibilidade. Algumas destas técnicas são originais, mas foram convenientemente testadas antes de sua aplicação. Além dos resultados topográficos, obtidos através de técnicas histoquímicas convenientes, foram empregados, em concomitância, pré-tratamentos de diversas naturezas, o que permitiu a obtenção de maior número de informações, convenientes para a interpretação dos resultados e úteis para confirmar a especificidade das técnicas utilizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados fragmentos de pele de diversas espécies de mamíferos, quais sejam: homem, cão, gato, coelho, gambá, cobaio, rato e camundongo. De cada espécie animal, foram empregados, no mínimo, quatro exemplares. O material humano foi retirado por biópsia, principalmente das regiões torácica e abdominal e, também, da polpa digital. Os outros animais foram sacrificados por inalação de éter; destas espécies, foram retirados fragmentos de pele de diversas regiões do organismo, incluindo epiderme espessa, dotada de muitos extratos celulares, bem como epiderme delgada, dotada de número restrito de extratos celulares.

Os fragmentos de pele, com 2 a 5 mm de espessura, foram mergulhados em uma das seguintes soluções fixadoras: 1 - formalina a 15,0%, contendo 3,0% de cloreto de cálcio anidro (formalina-cálcio); 2 - formalina a 10,0%, contendo 5,0% de ácido acético glacial e 3,0% de bicloreto de mercúrio (formalina-bicloreto de mercúrio). O tempo de fixação variou entre 48 horas e várias semanas. Após a fixação, os fragmentos de pele foram cortados, em micrótomo de congelação, com 10 a 20 μ m de espessura. Os cortes histológicos foram conservados nas respectivas soluções fixadoras até o momento do uso, quando foram lavados em água destilada, durante 20 a 30 minutos, efetuando-se 4 a 5 trocas. A seguir, foram submetidos, diretamente, a uma das técnicas histoquímicas expostas ulteriormente, ou a um, ou mais, dos pré-tratamentos seguintes: 1 - solventes de lípides; 2 - hidrolisantes; 3 - inibidores; 4 - ribonuclease; 5 - metilação. Estes pré-tratamentos serão descritos posteriormente.

Os fragmentos de pele fixados em formalina-cálcio foram utilizados para a detecção histoquímica das seguintes substâncias: lípides totais, colesterol, vitamina D e 7-deidrocolesterol, tocoferol e substâncias dotadas do íon fosfato ou sulfato. Além disso, foram também usados para a demonstração de

grupos redutores (reatividade ao ferricianeto fêrrico ou ao reativo de Schiff), de grupos 1,2-glicólicos (reação do ácido periódico-Schiff, ou seja, reação do PAS), para avaliação da basofilia e para a demonstração de proteínas (reação da aloxana-Schiff e da 2,2'-di-hidroxi-6,6'-dinaftil-disulfeto, isto é, reação do DDD). O material fixado em formalina-bicloreto de mercúrio foi utilizado para a demonstração de lípidos contendo colina e para avaliar o efeito bloqueante do bicloreto de mercúrio, contido no fixador, sobre várias reações empregadas no presente trabalho, assim como seu efeito inibidor sobre alguns grupos redutores. Depois de efetuadas as técnicas histoquímicas, precedidas ou não de pré-tratamentos, os cortes histológicos foram lavados em água destilada (3 trocas, durante 20 min.), colocados sobre lâminas histológicas e desumidificados com papel de filtro; algumas lâminas, contendo cortes submetidos à maior parte das técnicas empregadas, foram desidratadas com etanol absoluto, diafanizadas com xilol e montadas em resina sintética; outras lâminas foram imediatamente montadas em polivinilpirrolidona (PVP), sem prévia desidratação. Os cortes histológicos submetidos às técnicas para demonstração de lípidos totais ou de lípidos contendo colina, foram sempre montados em PVP. Este mesmo tipo de montagem foi utilizado para alguns dos cortes submetidos à reação do DDD; outros foram desidratados com acetona, diafanizados com xilol e montados em resina sintética.

1 - Técnicas histoquímicas

1.1 - Técnica do negro de Sudan B

A evidenciação dos lípidos totais foi efetuada através da coloração pelo negro de Sudan B, utilizado em solução saturada recém preparada, em etanol 60%, segundo LISON (1960).

1.2 - Técnica para lípidos contendo colina

Os lípidos contendo colina foram demonstrados pela técnica de HADLER & SILVEIRA (1978). O princípio desta técnica consiste na formação de complexo insolúvel, que resulta da ligação dos íons Hg^{2+} e do fosfomolibdato $\left[\text{P} \left(\text{Mo}_3 \text{O}_{10} \right)_4 \right]^{3-}$, com a

colina; o complexo resultante é evidenciado pela difenilcarbá zida, apresentando coloração azul ou violeta. Esta técnica apresenta-se quase específica para colina, pois dentre os diversos produtos testados, além da colina, apenas as vitaminas A e D reagem positivamente, embora fracamente (HADLER & SILVEIRA, 1978).

1.3 - Técnica para demonstrar o íon PO_4^{3-}

A detecção de substâncias dotadas do íon PO_4^{3-} foi efetuada conforme as bases propostas por HADLER *et alii.* (1978). A técnica empregada, no presente trabalho, usa benzidina em solução tampão de veronal, em pH 7,3, com a finalidade de induzir a formação do fosfato de benzidina. Neste pH não há precipitação do íon SO_4^{2-} . O fosfato de benzidina precipitado é revelado pelo persulfato de sódio, fornecendo coloração azul ou azul-esverdeada, devido à formação do azul de benzidina.

A técnica consistiu em tratar os cortes histológicos, durante 2 a 3 minutos, à temperatura de 50 a 60°C, por 4,0 ml de solução, recém preparada, contendo 0,03 g de benzidina, dissolvidas em 2,0 ml de etanol absoluto, adicionada à 2,0 ml de solução tampão de veronal 0,2 M, pH 7,3. Em seguida, os cortes histológicos foram lavados em etanol 50%, por 2 vezes, durante 1 minuto cada vez; lavados em ácido acético a 0,5%, por 2 vezes, durante 5 minutos cada vez; lavados em água destilada, durante 2 a 3 minutos. Os cortes foram, a seguir, mergulhados, durante 2 a 3 minutos, no revelador contendo solução de persulfato de sódio a 2,0%, água destilada e ácido acético glacial, na proporção de 0,5:4,5:0,5 (vol./vol.), ao qual foram adicionadas 3 gotas de anilina e 3 gotas de etanol 95%. Os cortes foram, então, lavados em água destilada e montados.

Deve ser salientado que esta técnica foi sempre empregada em cortes histológicos fixados em solução de formalina-cálcio, cujo tempo total de fixação variou entre 48 horas e 2 semanas, no máximo, pois quando os cortes permanecem por mais tempo na solução fixadora a intensidade da reação é atenuada.

1.4 - Técnica para demonstrar o íon SO_4^{2-}

Substâncias dotadas do íon SO_4^{2-} foram demonstradas

pela técnica de HADLER *et alii.* (1978); a precipitação do íon SO_4^{2-} , pela benzidina, foi efetuada em meio fortemente ácido (pH 1,4).

O tempo de fixação dos tecidos, pela formalina-cálcio, não deve ultrapassar 2 semanas, para evitar atenuação da reatividade das substâncias dotadas do íon SO_4^{2-} .

1.5 - Técnica para demonstrar basofilia

A basofilia, de natureza ribonucleica ou decorrente da presença de outras substâncias dotadas de grupos ácidos, foi verificada através da coloração por solução de azul de toluidina a 1,0%, em ácido sulfúrico 2 N, pH 0,3, durante 20 a 30 minutos. Procedeu-se dessa forma com finalidade comparativa, pois a solução de azul de toluidina foi usada na mesma concentração e no mesmo pH que a empregada nas técnicas para detectar colesterol, vitamina D e tocoferol. A basofilia ribonucleica foi inferida através do teste da ribonuclease (efetuado conforme o item 2.1).

1.6 - Técnicas para demonstrar substâncias redutoras

1.6.1 - Reação com o reativo de Schiff

O reativo de Schiff foi empregado durante 10 minutos; a seguir, os cortes histológicos foram transferidos para solução de bisulfito de sódio a 0,5%, durante 3 minutos; esta última operação foi repetida por 2 vezes, seguida de lavagem em água destilada, durante 10 minutos (3 trocas). O reativo de Schiff foi usado, também, em cortes histológicos submetidos ao bloqueio do grupo carbonila, por tratamento com solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1).

1.6.2 - Reação do ferricianeto férrico

Esta reação foi efetuada conforme a técnica de ADAMS (1956).

1.7 - Técnica para demonstrar substâncias dotadas de grupos 1,2-glicólicos

A reação do ácido periódico-Schiff (PAS) foi efetuada segundo a técnica de McMANUS (1946), modificada por HOTCHKISS (1948).

Com a finalidade de verificar a presença de glicogênio, esta reação foi também combinada com o teste da hidrólise enzimática. Cortes histológicos foram, previamente, tratados pela amilase salivar, à temperatura de 37°C, durante 1 hora, ou pela diastase do malte, em solução a 0,1%, em tampão de fosfatos 0,02 M, pH 6,0, à temperatura de 40°C, durante 1 hora (conforme LILLIE & FULLMER, 1976); a seguir, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos à reação do PAS.

1.8 - Técnica para demonstrar proteínas

1.8.1 - Reação da aloxana-Schiff

Esta reação foi efetuada conforme a técnica de YASUMA & ICHIKAWA (1953).

1.8.2 - Reação do DDD

Foi usada com a finalidade de demonstrar as proteínas da epiderme, através da técnica de BARNETT & SELIGMAN (1958), que foi empregada diretamente ou em cortes previamente submetidos à solução a 3,0% de tioglicolato de sódio, em pH 8,0, à temperatura de 55°C, durante 3 horas.

1.9 - Técnica para demonstrar colesterol

Para a demonstração do colesterol não esterificado, foi utilizada a reação do ácido peracético-azul de toluidina, conforme HADLER & SILVEIRA (1977) e a reação do ácido peracético-reativo de Schiff, ambas efetuadas em material fixado em formalina-cálcio e formalina-bicloreto de mercúrio (segundo HADLER & SILVEIRA, 1981a).

1.9.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina

Para efetuar esta reação, cortes histológicos, fixados em formalina-cálcio, foram oxidados, durante 2 horas, pelo ácido peracético (preparado segundo GREENSPAN, 1946, pela técnica

ca modificada por LILLIE, 1954); após a oxidação, os cortes foram lavados em água destilada, durante 20 minutos, e corados por solução a 1,0% de azul de toluidina, em ácido sulfúrico 2 N (pH 0,3), durante 20 a 30 minutos. Depois de corados, os cortes foram lavados em água destilada (2 trocas), colocados sobre lâminas histológicas e desumidificados com papel de filtro; alguns foram desidratados com etanol absoluto, diafanizados com xilol e montados em resina sintética; outros foram montados em PVP, sem prévia desidratação.

Com o objetivo de evitar falsa interpretação, decorrente da coloração de substâncias dotadas de grupos ácidos, principalmente de natureza ribonucleica, a análise dos resultados foi sempre efetuada em comparação com cortes histológicos não oxidados, previamente tratados pela ribonuclease (conforme o item 2.1) ou submetidos à metilação (conforme o item 2.2), e corados por solução de azul de toluidina (conforme o item 1.5). A reação do ácido peracético-azul de toluidina foi sempre executada em cortes previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação.

A reação do ácido peracético-azul de toluidina foi também efetuada em cortes de pele fixada em formalina-bicloreto de mercúrio.

1.9.2 - Reação do ácido peracético-Schiff

Alguns cortes histológicos, previamente tratados pela ribonuclease (conforme o item 2.1) e por solução saturada de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1), foram lavados em água destilada, durante 30 minutos (várias trocas) e, subsequentemente, tratados pelo ácido peracético (conforme descrito no item 1.9.1). Após a oxidação, foram tratados pelo reagente de Schiff (conforme o item 1.6.1).

1.9.3 - Técnica para discriminar o colesterol não esterificado dos ésteres do colesterol

Foi utilizada a técnica de HADLER & SILVEIRA (1981a). Cortes histológicos, previamente tratados pela ribonuclease (conforme o item 2.1) ou sujeitos à metilação (conforme o item 2.2), foram submetidos à ação de um agente hidrolítico, lavados em água destilada, por 20 a 30 minutos e, subsequentemente,

submetidos à reação do ácido peracético-azul de toluidina; outros cortes, previamente tratados por solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1), foram, de maneira semelhante, submetidos à ação de um agente hidrolítico e, em seguida, à reação do ácido peracético-Schiff. Foram empregados os seguintes agentes hidrolíticos: ácido sulfúrico-ácido acético, peridrol-amônia e solução de carbonato-bicarbonato de potássio, que serão descritos posteriormente. Os agentes hidrolíticos foram utilizados com a finalidade de liberar o colesterol de seus ésteres, o qual passa a reagir positivamente à reação do ácido peracético-azul de toluidina e à reação do ácido peracético-reativo de Schiff. Desta forma consegue-se detectar o colesterol total cujos resultados, comparados com os concernentes ao colesterol livre, permitem deduzir quanto à presença de ésteres do colesterol.

Convém assinalar que estas técnicas permitem discriminar o colesterol de seus ésteres e ambos da vitamina D (HADLER & SILVEIRA, 1981a).

1.9.4 - Teste de Schultz

Este teste foi efetuado conforme SCHULTZ (1924).

Com a finalidade de conferir os resultados da reação do ácido peracético-azul de toluidina e do ácido peracético-Schiff, obtidos em cortes histológicos submetidos à ação de agentes hidrolíticos, os resultados fornecidos por estas técnicas foram comparados com os fornecidos pelo teste de Schultz, que é o mais usado, em histoquímica, para a demonstração de colesterol total.

1.10 - Técnica para demonstrar vitamina D e 7-deidrocolesterol

A detecção histoquímica da vitamina D e do 7-deidrocolesterol foi efetuada através das reações do permanganato alcalino-azul de toluidina e do permanganato alcalino-reativo de Schiff, combinadas com a ação inibidora da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio (SILVEIRA & HADLER, 1981a).

1.10.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina

Foi usada a técnica de HADLER & SILVEIRA (1977).

Convém mencionar que, com o intuito de evitar a interferência de substâncias basófilas sobre os resultados da reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, esta reação foi executada em cortes histológicos previamente submetidos à ação da ribonuclease ou ao efeito da metilação. Cortes histológicos fixados em formalina-cálcio, após terem sido submetidos a um desses tratamentos e lavados em água destilada, durante 20 a 30 minutos, foram mergulhados, durante 25 minutos, na seguinte solução oxidante: solução a 0,038 N de permanganato de potássio e solução a 0,125 N de hidróxido de sódio, adicionadas na proporção de 1:1. Em seguida, os cortes foram lavados, rapidamente, em água destilada e tratados por solução de bisulfito de sódio a 0,5%, até descoramento completo; foram novamente lavados, em água destilada, durante 20 minutos e corados por solução a 1,0% de azul de toluidina, em ácido sulfúrico 2 N, durante 20 a 30 minutos. Após a coloração, foram lavados em água destilada, colocados sobre lâminas histológicas, desumidificados com papel de filtro, desidratados com etanol absoluto, diafanizados e montados em resina sintética. Alguns cortes foram montados em PVP, sem prévia desidratação.

Cortes histológicos, não submetidos à oxidação e previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação, foram corados pela solução de azul de toluidina (pH 0,3), lavados em água destilada e montados (controle).

A reação do permanganato alcalino-azul de toluidina foi, também, efetuada em cortes de pele fixada em formalina-bicloreto de mercúrio.

Convém salientar que a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina não permite distinguir a vitamina D do 7-deidrocolesterol, mas permite discriminar ambos do colesterol e de seus ésteres.

1.10.2 - Reação do permanganato alcalino-Schiff

Foi efetuada conforme SILVEIRA & HADLER (resultados não publicados): cortes histológicos, previamente tratados com solução saturada de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1), foram lavados em água destilada e então oxidados pela solução de permanganato de potássio-hidróxido de sódio (conforme o item 1.10.1), lavados em água destilada, descorados pelo

bisulfito de sódio, novamente lavados em água destilada e tratados pelo reativo de Schiff (conforme o item 1.6.1).

Cortes histológicos, previamente tratados pela solução saturada de 2,4-dinitrofenil-hidrazina e lavados em água destilada, foram submetidos ao reativo de Schiff (conforme o item 1.6.1), sem prévia oxidação pelo permanganato de potássio-hidrôxido de sódio; estes cortes foram usados como controles da reação do permanganato alcalino-Schiff.

1.10.3 - Ação desmascarante de agentes hidrolíticos

Com a finalidade de desmascarar a vitamina D e o 7-deidrocolesterol, procedeu-se da seguinte maneira: a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina foi efetuada em cortes histológicos, previamente submetidos à ação da ribonuclease ou à metilação; a reação do permanganato alcalino-Schiff foi executada em cortes histológicos, previamente submetidos à solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina; em ambos os casos, as reações foram precedidas pelo tratamento por um dos seguintes agentes hidrolíticos: ácido sulfúrico-ácido acético, peridrol-amônea ou solução de carbonato-bicarbonato de potássio, conforme será indicado posteriormente.

1.11 - Técnica para demonstrar tocoferol

Foi efetuada de acordo com HADLER & SILVEIRA (1977, 1981c), em cortes histológicos fixados em formalina-cálcio e em formalina-bicloreto de mercúrio, através das reações do ácido perfórmico-azul de toluidina e do ácido perfórmico-reativo de Schiff.

1.11.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

Cortes histológicos, submetidos à ação da ribonuclease ou à metilação, foram lavados em água destilada (20 a 30 min.) e, então, oxidados, durante 4 horas, pelo ácido perfórmico (preparado conforme LILLIE, 1954); em seguida, foram lavados em água destilada, durante 20 minutos, corados por solução de azul de toluidina (conforme o item 1.5) e montados em resina sintética, após desidratação, ou em PVP, sem desidratação.

Cortes histológicos não oxidados, mas previamente sub

metidos à ação da ribonuclease ou à metilação, foram corados pela mesma solução de azul de toluidina e usados como controle.

1.11.2 - Reação do ácido perfórmico-reativo de Schiff

Cortes histológicos, previamente tratados por solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1), foram oxidados pelo ácido perfórmico, lavados em água destilada e tratados pelo reativo de Schiff (conforme o item 1.6.1).

Os resultados desta reação foram comparados com os obtidos em cortes histológicos, previamente tratados pela solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (conforme o item 2.5.1) e subsequentemente tratados pelo reativo de Schiff (conforme o item 1.6.1), em ausência de oxidação pelo ácido perfórmico.

1.11.3 - Ação inibidora da formalina-bicloreto de mercúrio

Cortes histológicos, fixados nesta solução, foram submetidos à reação do ácido perfórmico-azul de toluidina e do ácido perfórmico-Schiff. Os resultados foram comparados com os fornecidos pelas mesmas reações, efetuadas em cortes histológicos de material fixado em formalina-cálcio.

1.11.4 - Ação desmascarante de agentes hidrolíticos

Cortes histológicos foram previamente tratados pela ribonuclease, ou submetidos à metilação, ou tratados pela solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina; em todos os casos, subsequentemente, os cortes foram tratados por um agente hidrolítico, com a finalidade de desmascarar o tocoferol. Os agentes hidrolíticos usados foram: solução de hidróxido de potássio ou solução de peridrol-amônia, conforme será exposto posteriormente.

Convém assinalar que, procedimento semelhante foi usado com a finalidade de desmascarar a reatividade de outras substâncias.

No que se refere ao tocoferol, após o desmascaramento, foi efetuada a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina ou do ácido perfórmico-Schiff.

2 - *Pré-tratamentos*

Os pré-tratamentos foram usados isoladamente ou combinados; as técnicas empregadas serão expostas a seguir.

2.1 - Ribonuclease

O tratamento pela ribonuclease foi efetuado por solução da enzima a 0,5%, em tampão de fosfatos 0,01 M, pH 7,1, à temperatura de 38°C, durante tempo propositalmente longo (12 h., 24 h. ou 48 h.). A comparação dos resultados mostrou que o prolongamento do tempo de tratamento não interfere nos resultados.

2.2 - Metilação

A metilação foi realizada com metanol absoluto, contendo 1,0% de ácido clorídrico, à temperatura de 60°C, durante 4 a 6 horas.

2.3 - Solventes de lípidos

Dois solventes foram usados: metanol-clorofórmio e metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

2.3.1 - Metanol-clorofórmio

Foi usado na proporção de 1:1 (vol./vol.); o tratamento pelo metanol-clorofórmio foi efetuado à temperatura ambiente, durante 2 horas. Os cortes histológicos, após terem sido lavados em água destilada, foram mergulhados em metanol e depois transferidos para a solução de metanol-clorofórmio. Após o tratamento, os cortes foram lavados em metanol e depois em água destilada.

2.3.2 - Metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Esta solução foi usada na proporção de 1:1:0,2 respectivamente (vol./vol.), à temperatura de 60°C, durante 2 a 4 horas. Os cortes histológicos foram, inicialmente, lavados em água destilada; a seguir foram mergulhados em metanol, depois

em metanol-clorofórmio (1:1) e, finalmente, colocados na solução de metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, antecipadamente mantida à temperatura de 60°C.

Algumas vezes, a solução de metanol-clorofórmio-ácido clorídrico foi, também, empregada a 38°C, durante 2 a 4 horas.

Convém mencionar que além da ação extrativa, esta solução, também, apresenta efeito hidrolítico devido ao seu conteúdo em ácido clorídrico.

2.4 - Hidrolisantes

Com a finalidade de cindir ésteres ou de desmascarar grupos reativos, bloqueados, foram utilizados diversos agentes hidrolisantes. Deve ser lembrado, no entanto, que os hidrolisantes, além de seu efeito principal, apresentam efeitos secundários, dentre os quais se destacam a difusão e a extração de substâncias reativas. Em especial, convém salientar que os hidrolisantes atuam sobre substâncias basófilas de diversas naturezas, contidas na epiderme, principalmente o ácido ribonucleico; devido à hidrólise há difusão do material basófilo, que é adsorvido pelas diversas estruturas histológicas, interferindo nos resultados. Com a finalidade de evitar este inconveniente, os hidrolisantes foram sempre empregados em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação.

2.4.1 - Hidrólise pelo hidróxido de potássio

O tratamento foi efetuado por solução a 0,1 N, durante 20 ou 45 minutos, à temperatura ambiente.

2.4.2 - Hidrólise pelo ácido perfórmico

O ácido perfórmico, preparado segundo LILLIE (1954), foi empregado à temperatura ambiente; o tempo de hidrólise foi de 4 horas. Este ácido, algumas vezes, foi usado durante tempo mais longo (5 a 6 h.).

2.4.3 - Hidrólise dos ésteres de colesterol

Os agentes hidrolíticos, empregados com esta finalidade

de, foram os mesmos utilizados para hidrolisar outras substâncias, com a finalidade de desmascarar grupos reativos. Foram os seguintes os hidrolisantes usados:

2.4.3.1 - Solução de ácido sulfúrico-ácido acético

Constituída por volumes iguais de ácido sulfúrico concentrado e ácido acético glacial; os cortes histológicos, após terem sido lavados em água destilada, durante 20 minutos, foram mergulhados nesta solução, onde permaneceram por tempo variável de 4 a 16 minutos, à temperatura ambiente; foram lavados em água destilada (10 min.) e submetidos à reação desejada.

2.4.3.2 - Solução de peridrol-amônia

Foi preparada adicionando-se 6,3 ml de peridrol e 2,0 ml de hidróxido de amônio, em 10,0 ml de água destilada; cortes histológicos, previamente lavados, foram mergulhados nesta solução onde permaneceram 1 a 5 minutos, à temperatura ambiente; foram lavados em água destilada (10 min.) e submetidos à reação para evidenciar colesterol não esterificado ou à outra reação desejada.

2.4.3.3 - Solução de carbonato-bicarbonato de potássio

Constituída por 3,5 ml de solução de carbonato de potássio a 6,0%, 3,5 ml de solução de bicarbonato de potássio a 8,6% e 3,0 ml de metanol. A hidrólise foi efetuada à temperatura ambiente e o tempo variou entre 10 e 16 horas; em seguida os cortes histológicos foram lavados em água destilada (10 min.), tratados por solução a 1% de EDTA (ácido etilenodiaminatetracético), durante 5 minutos, e novamente lavados em água destilada, durante 20 minutos, estando então em condições de serem submetidos à reação desejada.

2.5 - Inibidores

Foram usadas soluções de 2,4-dinitrofenil-hidrazina e de bicloreto de mercúrio, com a finalidade de bloquear grupos redutores.

2.5.1 - Bloqueio pela solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Com o objetivo de bloquear o grupo carbonila, foi usada a solução saturada de 2,4-dinitrofenil-hidrazina, em solução de ácido clorídrico 0,2 N, durante 12 a 20 horas, à temperatura ambiente. Os cortes foram, em seguida, lavados em solução de ácido clorídrico 0,2 N, durante 5 minutos, e depois em água destilada, durante 10 minutos.

2.5.2 - Bloqueio pela solução de bicloreto de mercúrio

Este sal foi usado em solução aquosa saturada, durante 1 hora ou 14 horas, à temperatura ambiente.

RESULTADOS

Os resultados histoguímicos foram semelhantes nas diversas espécies de mamíferos estudadas. Por este motivo, serão descritos em conjunto; no entanto, algumas diferenças eventualmente ocorrem, as quais serão salientadas. Os resultados não apresentaram, também, variação sistemática relacionada com as diversas regiões do organismo; todavia, a epiderme espessa apresenta, geralmente, reações mais evidentes; por isto, este tipo de epiderme constitui material mais adequado, pois favorece a análise e a interpretação dos resultados.

Na interpretação dos resultados, serão considerados tanto os dados fornecidos, diretamente, pelas diversas técnicas empregadas quanto os obtidos após o efeito de pré-tratamentos por solventes de lípidos, por agentes hidrolíticos e por inibidores, além dos encontrados após a ação da ribonuclease e da metilação. Os pré-tratamentos fornecem informações complementares importantes, que além de facilitarem a interpretação conferem, ainda, maior segurança aos resultados.

Com a finalidade de simplificar a descrição dos resultados, a epiderme será considerada como integrada por duas porções: 1 - porção profunda, constituída pelas camadas basal, espinhosa e granulosa, na qual os queratinócitos apresentam grande atividade metabólica e a diferenciação celular é lenta e progressiva; 2 - porção superficial, que inclui as camadas lúcida e córnea, na qual a atividade metabólica é muito reduzida e a queratinização bruscamente se completa. Esta última porção é constituída pelas células queratinizadas, nas quais serão consideradas, separadamente, a região periférica que corresponde à membrana espessada e o citoplasma correspondente ao corpo celular.

- 1 - Detecção histoguímica de lípidos totais: coloração pelo negro de Sudan

Dois tipos de material sudanófilo devem ser considerados em relação com a epiderme: o primeiro se apresenta sob a forma de um filme superposto à camada córnea (filme lipídico cutâneo); o segundo tipo é constituído por substâncias sudanófilas situadas no interior da epiderme (lípidos epidérmicos). Estas últimas, de situação predominantemente intracelular, sofrem modificações durante a queratinização, sugerindo interrelação com o processo de formação da "queratina". Por este motivo, elas serão o objeto da análise dos resultados.

Na porção profunda da epiderme, ocorre discreta sudanofilia do citoplasma dos queratinócitos, cuja intensidade aumenta em direção à periferia (Figura 1); o citoplasma dos queratinócitos situados nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa apresenta-se mais corado e contém algumas granulações sudanófilas; porém, os grânulos de queratoilina não se coram. Além disso, tanto a membrana plasmática quanto o espaço intercelular se apresentam fracamente corados, principalmente nos extratos mais periféricos da porção profunda da epiderme. Convém assinalar que a distinção entre espaço intercelular e membrana plasmática não pode ser determinada com precisão.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa das células queratinizadas apresenta nítida sudanofilia (Figura 2), ao contrário do citoplasma que aparentemente não se cora; a intensidade de coloração da membrana espessada é menor nos extratos mais internos da camada córnea. Na camada lúcida (epiderme espessa), a membrana espessada se cora com menor intensidade.

1.1 - Ação do metanol-clorofórmio

Este tratamento, embora remova totalmente o material sudanófilo do filme lipídico cutâneo, aparentemente, não modifica a sudanofilia da porção profunda da epiderme nem a da porção superficial, onde a membrana espessada das células queratinizadas continua a corar-se com a mesma intensidade.

1.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Após a ação deste solvente, além da remoção do filme lipídico cutâneo, verifica-se que a sudanofilia da porção pro

funda da epiderme se apresenta atenuada, em toda a sua exten
são (Figuras 3 e 4); no entanto, nas áreas correspondentes às
camadas espinhosa e granulosa, os queratinócitos apresentam,
no citoplasma, pequenos grânulos sudanófilos, de situação pre
dominantemente justanuclear. Os grânulos de queratoialina, apa
rentemente, não se coram, nem se alteram, após esse tratamen-
to.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espesa
da das células queratinizadas sofre atenuação da sudanofilia ,
ao contrário do citoplasma que se torna sudanófilo (Figura 3;
comparar com Figura 2); a sudanofilia do citoplasma é, por ve
zes, tão intensa quanto a da membrana espessada (Figura 4; com
parar com Figura 1).

O tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídri
co, portanto, apresenta efeito desmascarante sobre lípidos do
citoplasma dos queratinócitos, tanto das camadas espinhosa e
granulosa quanto e, principalmente, das células queratiniza-
das, os quais não são extraídos. O tratamento sucessivo por so
lução de hidróxido de potássio 0,1 N determina extração dos lí
pidos desmascarados.

1.3 - Ação do hidróxido de potássio

Este tratamento, embora não remova totalmente o mate-
rial sudanófilo do filme lipídico cutâneo, reduz a sudanofilia
do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epider
me, mas não reduz a sudanofilia da membrana plasmática e do
espaço intercelular. No entanto, no citoplasma dos queratinóci-
tos da camada espinhosa permanece substância granulosa ou fila-
mentosa, discretamente sudanófila. Os grânulos de queratoiali-
na não se coram, aparecendo em imagem negativa.

Na porção superficial da epiderme, o tratamento pelo
hidróxido de potássio promove forte redução da sudanofilia da
membrana espessada das células queratinizadas. Por outro lado,
o tratamento pelo hidróxido de potássio extrai o material suda-
nófilo do citoplasma dessas células, quando previamente desmas-
carado pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

1.4 - Ação do ácido perfórmico

Na porção profunda da epiderme, o tratamento pelo áci

do perfórmico não altera a sudanofilia do espaço intercelular e da membrana plasmática dos queratinócitos, mas reduz fortemente a coloração do citoplasma. Os grânulos de queratoialina não se coram.

Na porção superficial da epiderme, o tratamento, aparentemente, não modifica a intensidade da sudanofilia, tanto da membrana espessada quanto do citoplasma das células queratinizadas; todavia, determina o aparecimento de material granular, intensamente sudanófilo, que se distribui de forma irregular no citoplasma das células queratinizadas; este material ocorre, principalmente, em algumas áreas, não sendo encontrado em outras. Esta heterogeneidade sugere que a substância granular sudanófila, ao mesmo tempo que é desmascarada, é parcialmente removida pelo ácido perfórmico.

O tratamento prévio pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico impede o aparecimento das granulações sudanófilas desmascaradas pelo ácido perfórmico.

1.5 - Síntese

Na porção profunda da epiderme, a coloração pelo negro de Sudan revela material sudanófilo na membrana plasmática e no citoplasma dos queratinócitos, principalmente dos situados na camada granulosa, onde ocorrem, além disso, pequenas granulações. Este material sudanófilo, aparentemente, não é extraído pelo metanol-clorofórmio, sendo extraído pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, pela hidrólise com hidróxido de potássio ou pela ação do ácido perfórmico. Deve ser assinalado que, embora o tratamento pelo hidróxido de potássio extraia grande parte do material sudanófilo, pequena parte do material sudanófilo permanece no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa; esta diferença de comportamento sugere que este último material forme complexos mais estáveis que o restante do material sudanófilo e, por isso, não é extraído por este tratamento.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessada das células queratinizadas apresenta sudanofilia, que não se altera pela ação do metanol-clorofórmio ou do ácido perfórmico, mas se reduz com o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou com o hidróxido de potássio.

Estes resultados indicam que o material sudanófilo,

tanto da membrana plasmática quanto do citoplasma dos queratinócitos, se relacione com a presença de complexos lipídicos, pois é pouco solúvel em solventes orgânicos (metanol-clorofórmio). No entanto, ele se torna parcialmente solúvel quando ao solvente se adiciona o ácido clorídrico. Por outro lado, o tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara lípidos do citoplasma das células queratinizadas e, em menor proporção, do citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa.

Convém destacar que o material sudanófilo, situado no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, embora se apresente sob a forma de complexos, provavelmente lipoprotéicos, é removido pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, com ácido perfórmico e, parcialmente, com hidróxido de potássio. Através destas propriedades, é possível distinguir este material sudanófilo do situado na membrana espessada das células queratinizadas, que é apenas parcialmente extraído por estes tratamentos, com exceção do ácido perfórmico, que aparentemente não extrai. Por outro lado, o material sudanófilo do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme deve ser distinguido dos lípides mascarados, tanto os localizados na porção superficial quanto os situados na porção profunda da epiderme. Os tratamentos pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e pelo ácido perfórmico permitem distinguir dois tipos de lípides mascarados, no citoplasma das células queratinizadas.

2 - Detecção histoquímica de lípidos contendo colina

A membrana plasmática dos queratinócitos e o espaço intercelular, nas camadas basal, espinhosa e granulosa, apresentam-se corados, sendo a coloração uniforme em toda a extensão da porção profunda da epiderme (Figura 5). Pequenas granulações são, por vezes, observadas no interior do espaço intercelular. O citoplasma dos queratinócitos não se apresenta corado nas camadas basal e espinhosa; no entanto, na camada granulosa há substância reativa, no interior do citoplasma, que aparece sob a forma de granulações coradas; estas granulações diferem, morfologicamente, dos grânulos que contêm vitamina D e dos grânulos refringentes de queratoialina, que não se coram.

Na porção superficial da epiderme, a reação é positiva

na membrana espessada das células queratinizadas (Figuras 5 e 6), ao contrário do citoplasma onde a reação é negativa ou apenas levemente positiva; neste último local, ocorrem grânulos pardo-amarelados que se assemelham aos grânulos de melanina (Figura 6). A intensidade de coloração da membrana espessada diminui em direção à periferia da camada córnea; na região mais interna da porção superficial, no entanto, a membrana espessa da também é menos corada e, neste local, o citoplasma apresenta substância reativa que confere coloração mais intensa às células queratinizadas; no entanto, essa coloração do citoplasma se atenua e desaparece bruscamente nos extratos imediatamente adjacentes. Portanto, lípidos contendo colina (não mascarados) ocorrem, inicialmente, no citoplasma das células córneas, onde a membrana espessada se cora mais fracamente. Quando a reatividade do citoplasma desaparece, aumenta a reatividade da membrana espessada, sugerindo relação entre ambas.

2.1 - Ação do metanol-clorofórmio

O tratamento por este solvente, aparentemente, não afeta a coloração da membrana plasmática dos queratinócitos e do espaço intercelular da porção profunda da epiderme. A membrana espessada das células queratinizadas, após este tratamento, sofre atenuação da reatividade apenas na região mais superficial da camada córnea, sugerindo que, nesta região, a ligação dos lípidos contendo colina com outros produtos da membrana espessada se torne mais lábil.

2.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este tratamento determina extração parcial dos lípidos contendo colina, situados na membrana plasmática dos queratinócitos e no espaço intercelular da porção profunda da epiderme e dos situados na membrana espessada das células queratinizadas. Além disso, na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células córneas passa a reagir positivamente após este tratamento, corando-se mais intensamente que a membrana espessada. Este resultado mostra que os lípidos que se tornam sudanófilos, após serem desmascarados pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, são, ao menos parcialmente, constituídos por lípidos contendo colina.

2.3 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

Este tratamento reduz muito pouco a reatividade da membrana plasmática dos queratinócitos e do espaço intercelular da porção profunda, assim como da membrana espessada das células queratinizadas da porção superficial da epiderme.

No entanto, na porção profunda da epiderme ocorrem dois fatos que se destacam: 1 - aparecimento de material de aspecto granular, no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais profundos da camada espinhosa; 2 - aparecimento de reatividade nos tonofilamentos dos queratinócitos dos extratos médios e superficiais da camada espinhosa. Estes resultados sugerem que lípidos contendo colina são desmascarados pelo hidróxido de potássio, aparecendo sob a forma de grânulos no citoplasma das células mais profundas da camada espinhosa; inicialmente são independentes e depois se relacionam com os tonofilamentos, conforme se verifica nas células mais periféricas da camada espinhosa (Figuras 7 e 8). Quando, após o tratamento pelo hidróxido de potássio, se efetua tratamento pelo ácido perfórmico, toda a substância que reagia positivamente à reação para lípidos contendo colina é extraída.

2.4 - Ação do ácido perfórmico

A reação para lípidos contendo colina, da porção profunda da epiderme, torna-se negativa após o tratamento pelo ácido perfórmico.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa da das células queratinizadas cora-se fracamente ou não se cora, após o tratamento pelo ácido perfórmico; a extração do material colina reativo, determinada por este tratamento, é mais intensa nas porções superficiais da camada córnea.

Estes resultados indicam que o ácido perfórmico apresenta efeito extrativo sobre os lípidos contendo colina da epiderme.

2.5 - Síntese

A distribuição dos lípidos contendo colina, na epiderme, é semelhante à do material sudanófilo, havendo, no entanto, algumas diferenças.

Na porção profunda da epiderme, lípidos contendo colina estão presentes na membrana plasmática dos queratinócitos, no espaço intercelular e no citoplasma das células da camada granulosa. Assim sendo, o material sudanófilo, situado no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa, não é constituído por lípidos contendo colina. Estes últimos ocorrem, também, na membrana espessada e no citoplasma das células queratinizadas dos extratos mais internos da camada córnea. Os lípidos contendo colina não são extraídos pelo metanol-clorofórmio, são parcialmente extraídos pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e pelo hidróxido de potássio e quase totalmente extraídos pelo ácido perfórmico. Convém assinalar que o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara lípidos contendo colina, situados no citoplasma das células queratinizadas, enquanto que a hidrólise pelo hidróxido de potássio apresenta efeito semelhante, mas em relação com lípidos associados aos tonofilamentos.

3 - Detecção histoquímica de substâncias dotadas do íon fosfato

Os ácidos nucleicos reagem positivamente com a técnica utilizada para a demonstração do íon fosfato. Para evitar a influência do ácido ribonucleico, que mais interfere no resultado desta reação, na epiderme, foram usados cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease. Na porção superficial da epiderme a proporção de ácidos nucleicos é desprezível, sendo dispensável o pré-tratamento pela ribonuclease.

3.1 - Reação para o íon fosfato, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Na porção profunda da epiderme, a positividade da reação para o íon fosfato ocorre, aparentemente, na membrana plasmática dos queratinócitos e, às vezes, em algumas áreas do espaço intercelular. Esta reatividade diminui progressivamente das regiões mais profundas para as mais superficiais da epiderme, de tal forma que na camada granulosa é muito fraca ou não ocorre.

A reação para o íon fosfato, na porção superficial da epiderme, é insignificante, uma vez que a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas é muito fraca ou au

sente e o citoplasma não apresenta reatividade.

3.2 - Efeito do peridrol-amônia sobre a reação para o íon fosfato, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Após estes tratamentos, a técnica para detecção histoquímica do íon fosfato revela, na porção profunda da epiderme, leve positividade do citoplasma dos queratinócitos, principalmente em algumas células dos extratos mais periféricos da cama da espinhosa e nos da camada granulosa. Este resultado sugere que o peridrol-amônia desmascare o íon fosfato, não ribonucleico, que então pode ser demonstrado histoquimicamente.

Na porção superficial da epiderme, devido ao efeito do tratamento pelo peridrol-amônia, ocorre maior reatividade das células queratinizadas, tanto do citoplasma quanto da membrana espessada, o que indica a presença de substâncias dotadas do íon fosfato, mas que só podem ser demonstradas após o desmascaramento.

3.3 - Efeito da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio

A reatividade do íon fosfato é inibida quando se efetua a fixação com formalina contendo bicloreto de mercúrio.

3.4 - Ação do metanol-clorofórmio

Este tratamento, quando empregado em cortes histolôgicos previamente tratados pela ribonuclease, não interfere no material que reage positivamente com a técnica para demonstração do íon fosfato. Este resultado indica que o material dotado de íon fosfato não é extraído por esse solvente.

3.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este tratamento extrai o material fosfato positivo, tanto da porção profunda quanto da porção superficial da epiderme.

3.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

O tratamento por solução de hidróxido de potássio determina diminuição da reatividade, das porções profunda e superficial da epiderme, para a técnica que revela o íon fosfato. A redução da reatividade é maior quando o tratamento pelo hidróxido de potássio é efetuado por tempo mais longo (45 minutos), sugerindo que este tratamento determine extração do material dotado do íon fosfato.

3.7 - Síntese

Íon fosfato, não ribonucleico, foi demonstrado no espaço intercelular e no citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa; neste último local se apresenta mascarado. Além disso, a reação para o íon fosfato é positiva no citoplasma e na membrana espessada das células queratinizadas, após desmascaramento conveniente.

Portanto, a positividade para o íon fosfato ocorre nos mesmos locais em que se demonstra a presença de lípidos contendo colina. Ocorre apenas discordância aparente relacionada com a membrana espessada das células queratinizadas, a qual, tendo em vista os resultados assinalados, parece conter maior proporção de colina do que de íon fosfato; no entanto, após a ação desmascarante do peridrol-amônia, essa aparente discordância deixa de existir.

Além disso, o material fosfato positivo comporta-se da mesma maneira que os lípidos contendo colina, diante dos solventes e das hidrólises usadas.

Correlacionando os resultados fornecidos pelo negro de Sudan, pela técnica para lípidos contendo colina e pela técnica para o íon fosfato, verifica-se que há evidências de que a maior porção do material sudanófilo é constituída por lípidos contendo colina; estes lípidos contêm, além disso, íon fosfato. Há, então, evidências de tratar-se de fosfatidilcolinas ou de esfingomielinas. Estas substâncias, por se apresentarem sob a forma de complexos, não são extraídas pelo metanol-clorofórmio; no entanto, são removidas quando se adiciona ácido clorídrico a esse solvente e o tratamento é efetuado a 60°C. Convém assinalar que os lípidos contendo colina, situados na membrana espessada das células queratinizadas, reagem fracamente com a técnica para o íon fosfato; após o desmascaramento pelo peridrol-amônia a reação é mais intensa. Por outro lado, as hi-

drólises ácida e alcalina desmascaram colina, respectivamente, no citoplasma das células queratinizadas e nos tonofilamentos, sugerindo a presença de lípidos contendo colina. No entanto, as hidrólises citadas não desmascaram o íon fosfato, o qual somente é desmascarado pelo tratamento com peridrol-amônia.

4 - Detecção histoquímica de substâncias basófilas pelo azul de toluidina, em pH 0,3

Em virtude da solução de azul de toluidina, em pH 0,3, ter sido empregada para evidenciar colesterol, vitamina D e tocoferol, após tratamentos oxidantes adequados, julgamos conveniente analisar o comportamento da epiderme quando submetida apenas ao tratamento por essa solução. Esses resultados servirão como termo de comparação para a verificação do efeito dos oxidantes utilizados. Após o tratamento pela solução de azul de toluidina, na porção profunda da epiderme, o citoplasma dos queratinócitos da camada basal e dos extratos mais internos da camada espinhosa apresenta forte basofilia; a intensidade da basofilia decresce em direção à periferia (Figura 9) sendo discreta na camada granulosa. Os grânulos de queratoialina, refringentes, não se coram; todavia, ao redor dos grânulos ocorre substância fortemente basófila.

A porção superficial da epiderme não se cora, indicando ausência de material basófilo nas células queratinizadas (Figura 10).

4.1 - Ação da ribonuclease

O tratamento por esta enzima, quando efetuado por tempo prolongado, remove quase totalmente as substâncias basófilas da epiderme, que se coram pela solução de azul de toluidina, em pH 0,3. Este resultado indica que essa basofilia é de natureza ribonucleica, em quase sua totalidade; inclusive o material basófilo, situado ao redor dos grânulos de queratoialina, é sensível à ação da ribonuclease.

4.2 - Ação da metilação

Este tratamento suprime, totalmente, a coloração da epiderme pela solução de azul de toluidina, em pH 0,3, revelando que

os grupos ácidos responsáveis pela basofilia são completamente bloqueados, pela metilação, ou eliminados.

4.3 - Ação do metanol-clorofórmio

O tratamento por este solvente, aparentemente, não interfere na intensidade da basofilia da porção profunda da epiderme.

4.4 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este solvente promove intensa remoção do material basófilo do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, revelando que é capaz de extrair ácido ribonucleico.

4.5 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

Nas condições empregadas, a hidrólise pelo hidróxido de potássio, quando efetuada durante 20 minutos, provoca pequena redução da basofilia da porção profunda da epiderme. Prolongando-se o tempo de hidrólise para 45 minutos, a redução da basofilia da porção profunda da epiderme é maior, ocorrendo o aparecimento, ao mesmo tempo, de basofilia difusa no citoplasma das células queratinizadas da porção superficial da epiderme, assim como no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da porção profunda. Essa basofilia é discreta, mas não é removida pela ribonuclease. A presença de íon fosfato mascarado, no citoplasma das células queratinizadas, conforme mostram nossos resultados, sugere que este íon poderia ser, parcialmente, responsável pela referida basofilia.

4.6 - Síntese

A basofilia da porção profunda da epiderme ao azul de toluidina, em pH 0,3, é quase totalmente de natureza ribonucleica. Apenas pequena proporção é proveniente de outros grupos ácidos, bloqueados pela metilação. A porção superficial da epiderme não apresenta basofilia, a não ser após a ação do mascarante do hidróxido de potássio; esta basofilia não é de natureza ribonucleica.

De acordo com estes resultados, as reações que empregam

o azul de toluidina, quando efetuadas na epiderme, devem ser precedidas pelo tratamento com a ribonuclease ou pela metilação, com a finalidade de evitar a interferência de substâncias basófilas normalmente presentes na porção profunda da epiderme.

5 - Detecção histoquímica do colesterol

5.1 - Detecção do colesterol não esterificado

5.1.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina

Com a finalidade de evitar a interferência do ácido ribonucleico, que se cora pelo azul de toluidina, em pH 0,3, principalmente após a oxidação pelo ácido peracético, a reação do ácido peracético-azul de toluidina foi efetuada em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação.

5.1.1.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Após este tratamento, na porção profunda da epiderme, a reação do ácido peracético-azul de toluidina é positiva no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e dos extratos periféricos da camada espinhosa (Figura 11); esta reatividade aparece sob a forma difusa ou finamente granular. Os grânulos de queratoialina não se coram. No compartimento extracelular não há material reativo.

Na porção superficial da epiderme, a membrana esgrossa da das células queratinizadas apresenta-se fortemente reativa e metacromática (Figura 11); a reatividade é mais intensa nas regiões mais internas da camada córnea. O citoplasma das células queratinizadas se apresenta levemente reativo (ortocromático) em algumas áreas, sendo destituído de reatividade em outras.

Estes resultados mostram a presença de material reativo, principalmente, na porção superficial da epiderme, o qual não é removido pelo pré-tratamento com a ribonuclease.

5.1.1.2 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina,

em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

Nos cortes histológicos submetidos à metilação, a reação do ácido peracético-azul de toluidina é negativa na porção profunda da epiderme. Este resultado indica que o efeito da metilação é mais intenso que o da ribonuclease, o que era esperado, pois o primeiro tratamento apresenta efeito bloqueante que atinge vários grupos ácidos; além disso, deve ser salientado que a metilação promove extração de material reativo, solúvel no metanol, o que não acontece com a ribonuclease.

Na porção superficial da epiderme, o efeito da metilação, aparentemente, não interfere na reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, principalmente nas regiões mais internas da camada córnea.

5.1.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio

Este fixador não modifica a reatividade, tanto da porção profunda quanto da porção superficial da epiderme, a reação do ácido peracético-azul de toluidina.

5.1.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio

Este solvente extrai, parcialmente, o material ácido peracético-azul de toluidina positivo dos queratinócitos da camada espinhosa e dos situados nos extratos mais profundos da camada granulosa. Devido a este efeito, os queratinócitos periféricos da camada granulosa apresentam reatividade mais aparente, pois o material reativo, presente nestas células, resiste à ação do metanol-clorofórmio.

A reatividade da membrana espessada, das células queratinizadas da porção superficial da epiderme, não é afetada pela extração com metanol-clorofórmio.

5.1.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este tratamento determina extração praticamente total do material ácido peracético-azul de toluidina positivo, tanto da porção profunda quanto da porção superficial da epiderme.

Este resultado indica que a ação hidrolítica do ácido clorídrico, adicionado ao metanol-clorofórmio, é responsável pela ruptura da ligação do material reativo com prováveis proteínas, o que determina sua extração. O comportamento do citoplasma das células queratinizadas não é afetado, indicando que os lípides desmascarados por esse tratamento (que são sudanófilos), não reagem positivamente à reação do ácido peracético-azul de toluidina.

5.1.1.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

O tratamento pelo hidróxido de potássio determina remoção do material ácido peracético-azul de toluidina positivo, da porção profunda da epiderme, exceto do situado no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada granulosa. Este efeito é mais nítido quando o tratamento é efetuado durante 45 minutos, em comparação com o tratamento realizado durante 20 minutos.

Na porção superficial da epiderme, a hidrólise pelo hidróxido de potássio determina redução muito pequena da reatividade da membrana espessada das células queratinizadas. Por outro lado, o citoplasma das células queratinizadas apresenta-se ligeiramente mais reativo e metacromático, sugerindo difusão do material reativo da membrana espessada.

5.1.1.7 - Síntese

A reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, ao ácido peracético-azul de toluidina, não é afetada pela ribonuclease, pela metilação, pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio e pelo tratamento com metanol-clorofórmio; é pouco atenuada pela hidrólise com hidróxido de potássio e quase totalmente abolida pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. Estes resultados indicam que o material reativo (colesterol não esterificado) da membrana espessada das células queratinizadas, se encontra firmemente ligado à proteínas, sendo o complexo lipoprotéico sensível à hidrólise ácida, nas condições usadas.

A fraca positividade da reação do ácido peracético-azul de toluidina, verificada no citoplasma das células queratinizadas, em algumas áreas da camada córnea, devido à irregula

ridade de distribuição e à fraca intensidade, foi interpretada como consequência da difusão do material reativo situado na membrana espessada.

Na porção profunda da epiderme, o material ácido peracético-azul de toluidina positivo é extraído pela metilação e pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; no entanto, o tratamento pelo metanol-clorofórmio e a hidrólise pelo hidróxido de potássio, nas condições empregadas, também extraem material reativo, com exceção do situado nos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada granulosa. Estes resultados sugerem a presença de colesterol não esterificado nas células mais periféricas da camada espinhosa e nas da camada granulosa; o efeito dos tratamentos assinalados sugere que nos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada granulosa o colesterol se apresente ligado à proteínas; a ligação aparentemente é lábil, uma vez que é rompida pelo tratamento por metanol-ácido clorídrico (metilação). No restante da porção profunda da epiderme, o colesterol parece não se apresentar ligado à proteínas, a julgar pelos resultados assinalados.

5.1.2 - Reação do ácido peracético-Schiff, em cortes histológicos sucessivamente tratados pela ribonuclease e pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Após estes pré-tratamentos, que tiveram por finalidade evitar a interferência do ácido ribonucleico e bloquear a reatividade do grupo carbonila, a reação do ácido peracético-Schiff apresentou-se levemente positiva no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e da camada granulosa da epiderme. Portanto, nos mesmos locais em que havia reatividade ao ácido peracético-azul de toluidina ocorre positividade da reação do ácido peracético-Schiff, o que coincide com o comportamento do colesterol não esterificado.

Na porção superficial da epiderme, tanto a membrana es pessaada quanto o citoplasma das células queratinizadas reagem positivamente, sendo a reatividade ligeiramente mais intensa na membrana espessada. A positividade da membrana espessada à reação do ácido peracético-Schiff, nas condições empregadas, confirma a presença de colesterol não esterificado, pois essa membrana reage positivamente ao ácido peracético-azul de tolui dina. A reatividade do citoplasma das células queratinizadas,

no entanto, parece decorrer da menor especificidade da reação do ácido peracético-Schiff, comparada com a reação do ácido peracético-azul de toluidina, que é negativa ou fracamente positiva nesse local.

5.2 - Detecção do colesterol total (colesterol e ésteres do colesterol)

Após a hidrólise prévia dos ésteres do colesterol, é possível demonstrar o colesterol, assim liberado, através da reação do ácido peracético-azul de toluidina. Desta forma, após a hidrólise, além do colesterol não esterificado seus ésteres passam a ser evidenciados.

Os agentes hidrolíticos foram empregados em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação.

5.2.1 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Após estes tratamentos, a reação do ácido peracético-azul de toluidina é fracamente positiva no citoplasma dos queratinócitos, tanto da camada basal quanto dos extratos mais profundos da camada espinhosa; a positividade aumenta nos extratos periféricos da camada espinhosa e, principalmente, na camada granulosa, onde se verifica metacromasia (Figura 12). Nos extratos periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa, além da positividade difusa do citoplasma dos queratinócitos, ocorrem pequenos grânulos que reagem positivamente; estes grânulos são mais numerosos e mais metacromáticos na camada granulosa. Quando o tempo de hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético é mais longo (10 a 16 min.), o número de grânulos reativos, aparentemente, diminui, o que sugere extração pelo agente hidrolítico.

Após os tratamentos assinalados, material ácido peracético-azul de toluidina positivo aparece, também, no interior do compartimento extracelular, em correspondência com a camada granulosa; a reatividade é discreta e se apresenta sob a forma granular ou amorfa, por vezes simulando espessamento da membra

na plasmática.

Na porção superficial da epiderme, os tratamentos referidos intensificam a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, à reação do ácido peracético-azul de toluidina. O aumento da reatividade é mais evidente nas áreas mais externas da camada córnea. Estes resultados sugerem a presença de ésteres do colesterol, na membrana espessada das células queratinizadas, cuja proporção parece aumentar em direção à periferia da camada córnea. Excepcionalmente, em algumas áreas cutâneas, de algumas espécies animais, como ocorre na pele do focinho do cão, a reatividade da porção superficial da epiderme à reação do ácido peracético-azul de toluidina é muito fraca; no entanto, após a hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético a reatividade aumenta fortemente, indicando o predomínio dos ésteres sobre o colesterol não esterificado, nesse local. Na epiderme de outras regiões do organismo predomina o colesterol não esterificado, na membrana espessada das células queratinizadas.

O tratamento pelo ácido sulfúrico-ácido acético, além de hidrolisar os ésteres do colesterol, parece determinar extração parcial do material reativo, principalmente quando a hidrólise é efetuada durante tempo mais longo (10 a 16 min.).

5.2.2 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

Em cortes histológicos submetidos a estes tratamentos, a reação do ácido peracético-azul de toluidina é positiva no citoplasma dos queratinócitos, tanto dos situados nos extratos médios e periféricos da camada espinhosa quanto nos da camada granulosa. A positividade se traduz, inicialmente, por coloração difusa e, nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa, por granulações finas, localizadas, principalmente, na periferia da célula; estas granulações, às vezes, são metacromáticas. O material granular metacromático aumenta nos extratos periféricos da camada granulosa (Figura 13). Os grânulos de queratoialina não se coram e distinguem-se pelo elevado índice de refração.

O compartimento extracelular apresenta, às vezes, subs

tância reativa em correspondência com a camada granulosa e com os extratos mais periféricos da camada espinhosa, simulando es pes samento da membrana plasmática.

Na porção superficial da epiderme, a membrana es pes sada das células queratinizadas se apresenta fortemente reativa; no entanto, a reatividade geralmente é menor do que nos cor tes histol ógicos tratados pela ribonuclease, sugerindo que a me tila ção promova extração parcial do material reativo.

5.2.3 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônea, em cortes histológicos previamente tratados pela ri bonu cle ase

A reatividade dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, à reação do ácido peracético-azul de toluidina, após estes tratamentos, é discreta nos extratos mais periféricos da camada espinhosa, aumentando na camada granulosa, onde ocor rem, por vezes, algumas finas granulações. No compartimento ex tracelular, apenas excepcionalmente é encontrado material rea tivo.

Na porção superficial da epiderme, a membrana es pes sada das células queratinizadas se apresenta fortemente reativa.

5.2.4 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônea, em cortes histológicos previamente submetidos à me tila ção

A reação do ácido peracético-azul de toluidina, efe tua da em cortes histológicos assim tratados, demonstra material reativo em alguns queratinócitos mais periféricos da porção profunda da epiderme; o material reativo se apresenta difuso, não granular. Este resultado revela que a metilação seguida da hidrólise pelo peridrol-amônea promove extração do material re ati vo. O compartimento extracelular apresenta-se isento de material reativo.

A membrana espessada das células queratinizadas da por ção superficial da epiderme, quando comparada com cortes histo lógicos previamente tratados pela ribonuclease, se apresenta menos corada, sugerindo que a metilação promova extração par

cial do material reativo.

5.2.5 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Após estes tratamentos, a reação do ácido peracético-azul de toluidina é fracamente positiva no citoplasma dos queratinócitos da camada basal e dos situados nos extratos mais profundos da camada espinhosa; nos extratos médios da camada espinhosa a reação é pouco mais intensa. No entanto, nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa não há material reativo, no citoplasma dos queratinócitos, a não ser excepcionalmente; este material, quando presente, aparece sob a forma de raros grânulos, no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa. O compartimento extracelular não evidencia material reativo. Estes resultados sugerem que este hidrolisante promova extração parcial do material reativo da porção profunda da epiderme.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa das células queratinizadas cora-se mais intensamente, em comparação com cortes não submetidos à hidrólise, o que indica ausência de extração.

5.2.6 - Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

A reação do ácido peracético-azul de toluidina, após estes tratamentos, é positiva apenas em pequenos grânulos situados no citoplasma de raros queratinócitos da camada granulosa. O compartimento extracelular não apresenta material reativo.

A reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, da porção superficial da epiderme, apresenta-se diminuída após estes tratamentos, sugerindo que a metilação determine extração parcial do material reativo.

5.2.7 - Síntese

A comparação dos resultados da reação do ácido peracético-azul de toluidina, obtidos em ausência de hidrólise e observados após o emprego dos agentes hidrolíticos, na porção profunda da epiderme, sugere a presença de ésteres do colesterol, no citoplasma dos queratinócitos situados nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa; nestes locais, o material reativo se apresenta sob forma difusa ou finamente granular, sendo parcialmente extraído pela metilação e por um dos agentes hidrolisantes usados. Na camada espinhosa a técnica para colesterol total fornece resultados pouco mais intensos que os fornecidos pela técnica adequada para revelar colesterol não esterificado, sugerindo ser pequena a proporção de ésteres; nos queratinócitos da camada granulosa, a técnica para colesterol total fornece resultados bem mais intensos, indicando aumento da proporção de ésteres do colesterol.

No compartimento extracelular, em correspondência com a camada granulosa, foi verificada a presença de reatividade discreta, que ocorre apenas após a ação dos agentes hidrolíticos, principalmente do ácido sulfúrico-ácido acético.

A comparação dos resultados sugere que, na porção superficial da epiderme, ésteres do colesterol ocorram na membrana espessada das células queratinizadas, principalmente nos extratos mais periféricos. Convém salientar que, embora a proporção de ésteres do colesterol aumente em direção à periferia da epiderme, o colesterol não esterificado ocorre em maior proporção que o esterificado, mesmo na camada córnea, na qual, principalmente o colesterol não esterificado é encontrado na membrana espessada das células queratinizadas.

5.3 - Detecção do colesterol total pelo teste de Schultz

Este teste fornece reação positiva, de fraca intensidade, na porção profunda da epiderme e pouco mais forte na porção superficial.

Na porção profunda da epiderme, a reação é mais nítida nas camadas espinhosa e granulosa, do que na camada basal; nesta última, os queratinócitos apresentam contorno nítido, pois a membrana plasmática se cora mais fortemente do que o citoplasma. O espaço intercelular, inclusive as espinhas de união, se apresentam discretamente corados, nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa.

Na porção superficial da epiderme, a reação é pouco mais intensa nas áreas mais profundas do que nas periféricas. A membrana espessada das células queratinizadas apresenta-se mais corada do que o citoplasma, principalmente nas regiões mais internas da camada córnea. Na epiderme espessa, por vezes, ocorre faixa menos reativa correspondente à camada lúcida.

Comparando-se os resultados obtidos pelo teste de Schultz com os fornecidos pela reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise dos ésteres do colesterol, verifica-se que embora exista alguma correspondência, entre ambos, esta não é total. Assim, na porção profunda da epiderme, o compartimento extracelular apresenta mais material Schultz positivo do que ácido peracético-azul de toluidina positivo; na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células queratinizadas apresenta maior reatividade ao teste de Schultz do que à técnica do ácido peracético-azul de toluidina. Esta discordância não decorre de maior sensibilidade do teste de Schultz, conforme pôde ser por nós demonstrado em modelos de papel de filtro (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados). Além disso, a análise dos resultados, em modelos de papel de filtro, revela que o teste de Schultz é positivo com o colesterol e seus ésteres, com o 7-deidrocolesterol e com a vitamina D. Por outro lado, no teste de Schultz ocorre difusão do produto corado, o que determina localização imprecisa do material reativo, nos cortes histológicos. Por estes motivos, a detecção histoquímica do colesterol e seus ésteres, baseada na reação do ácido peracético-azul de toluidina, é menos sujeita a causas de erro.

6 - Detecção histoquímica da vitamina D e do 7-deidrocolesterol

6.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina

Esta reação foi efetuada em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação, com a finalidade de evitar a interferência de substâncias basófilas, principalmente do ácido ribonucleico, nos resultados desta reação.

6.1.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente trata
dos pela ribonuclease

Na porção profunda da epiderme, a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após este tratamento, revela material reativo no citoplasma dos queratinócitos dos estratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa; este material se apresenta sob a forma de finas granulações, cujo número aumenta na camada granulosa, na maioria das espécies animais estudadas. No entanto, em uma destas espécies (gambá), as granulações são excepcionalmente grosseiras e muito abundantes, cujo diâmetro aumenta em direção à periferia (Figura 14); os queratinócitos da camada granulosa apresentam o citoplasma totalmente preenchido pelas granulações. Convém salientar que, em todas as espécies estudadas, as granulações reativas desaparecem bruscamente, no momento em que os queratinócitos da camada granulosa se transformam em células córneas, dotadas de membrana espessada.

Em todas as espécies animais estudadas, os grânulos de queratoialina não apresentam reatividade, indicando que no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa ocorrem grânulos de diversas naturezas. Dentre estes grânulos, cumpre destacar os de pequenas dimensões e diâmetro uniforme, que reagem positivamente ao permanganato alcalino-azul de toluidina, mesmo após o tratamento pela ribonuclease; estes grânulos situam-se entre os de queratoialina e sua reatividade indica a presença de vitamina D.

O compartimento extracelular não apresenta material reativo.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa da das células queratinizadas apresenta-se fortemente reativa, ao contrário do citoplasma que reage fracamente ou não reage. Algumas vezes, a membrana espessada apresenta aspecto irregular, sugerindo justaposição de grânulos em sua face interna. Este resultado sugere, além disso, relação entre o espessamento da membrana plasmática e os grânulos reativos, presentes na periferia do citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa.

A intensidade da reatividade da membrana espessada das células queratinizadas diminui em direção à periferia da camada córnea. Na epiderme delgada, a reatividade da membrana es-

pessada é maior do que na epiderme espessa.

6.1.2 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, em cortes histológicos submetidos à metilação

Em cortes previamente metilados, a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina é positiva no citoplasma dos queratinócitos dos extratos periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa (Figura 15), sendo a reatividade semelhante à dos cortes tratados pela ribonuclease. O material reativo se apresenta sob a forma de fina granulação metacromática, situada no interior do citoplasma. Este resultado indica que o material reativo não é extraído pelo metanol-ácido clorídrico, usado para a metilação, sugerindo que a vitamina D e o 7-deidrocolesterol estão complexados com proteínas; isto ocorre na maioria das espécies estudadas, nas quais o material reativo é finamente granular. No entanto, no gambá a metilação remove quase totalmente os grânulos reativos grosseiros, situados no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, sugerindo que, nesta espécie, a vitamina D esteja livre ou labilmente ligada à proteínas.

No compartimento extracelular não há material reativo ao permanganato alcalino-azul de toluidina, na porção profunda.

Na porção superficial da epiderme, a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas não é afetada pela metilação, pois a intensidade da reação é comparável à dos cortes histológicos tratados pela ribonuclease.

6.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio

Cortes histológicos de pele, assim fixada, apresentam forte inibição da reatividade do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme e, também, da membrana espessada das células queratinizadas, à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina. Este comportamento é idêntico ao apresentado pela vitamina D, cuja reatividade é inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio; porém, difere do comportamento do colesterol, cuja reatividade não é inibida por esta fixação.

6.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio

O tratamento por este solvente não modifica, aparentemente, a reatividade, tanto dos queratinócitos da porção profunda quanto das células queratinizadas da porção superficial da epiderme, à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina. Estes resultados indicam que o material reativo não é extraído pelo metanol-clorofórmio. No entanto, em uma espécie animal (gambá) ele é extraído pelo metanol-ácido clorídrico (metilação), sugerindo que a vitamina D esteja complexada com proteínas e o complexo, embora resista ao efeito de um solvente polar (metanol-clorofórmio), é afetado por solvente polar adicionado de ácido clorídrico. Na maioria das espécies estudadas, todavia, o material reativo não é extraído pelo metanol-ácido clorídrico.

6.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este solvente, nas condições usadas, extrai quase totalmente o material reativo da epiderme, sugerindo que o complexo vitamina D-proteína é cindido por este tratamento.

6.1.6 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

O material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo, do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, é pouco afetado pela ação hidrolítica do hidróxido de potássio. Após este tratamento, o número de grânulos reativos, situados no interior dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, parece diminuir, principalmente os de menor diâmetro; este resultado sugere extração parcial do material reativo.

Na porção superficial da epiderme, o tratamento pelo hidróxido de potássio, também, extrai parcialmente o material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo, da membrana espessada das células queratinizadas, principalmente quando o tratamento é efetuado por 45 minutos.

6.1.7 - Ação do ácido perfórmico

Os cortes histológicos previamente tratados com ácido

perfôrmico e depois submetidos à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina se desintegram inteiramente, o que impede a aplicação desse tratamento.

6.1.8 - Síntese

A reação do permanganato alcalino-azul de toluidina é positiva no citoplasma dos queratinócitos situados nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa; o material reativo apresenta aspecto granular. Esta reatividade não é afetada pela ribonuclease, nem pelo tratamento com metanol-clorofôrmio, é diminuída pelo efeito do metanol-ácido clorídrico, em apenas uma das espécies animais estudadas.

A reatividade da membrana espessada das células queratinizadas não é afetada pela ribonuclease, pelo metanol-clorofôrmio, nem pelo metanol-ácido clorídrico usado para a metilação. A fraca reatividade do citoplasma das células queratinizadas, presente em algumas áreas, foi interpretada como decorrençia da difusão do material reativo contido na membrana espessada.

Por outro lado, a reatividade, tanto da porção superficial da epiderme quanto da porção profunda, é inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, o que coincide com o comportamento da vitamina D.

Uma vez que o material reativo dos queratinócitos não é extraído pelo metanol-clorofôrmio, é parcialmente extraído pelo hidróxido de potássio e quase totalmente removido pelo metanol-clorofôrmio-ácido clorídrico, pode-se supor que esteja ligado com proteínas. O tratamento pelo metanol-ácido clorídrico, usado para a metilação, que extrai o material reativo dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa de uma das espêcies animais estudadas, sugere que a estabilidade do complexo protéico apresente diferença quanto ao grau de estabilidade, em relação com a espécie animal.

6.2 - Reação do permanganato alcalino-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Após este tratamento, os queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, cujo citoplasma reage positivamente à reação

ção do permanganato alcalino-azul de toluidina, reagem, também, ao permanganato alcalino-Schiff, o que constitui argumento a favor de ser a vitamina D responsável pela reação positiva. No entanto, em cortes histológicos previamente oxidados pelo permanganato alcalino, a coloração pelo reativo de Schiff é menos seletiva do que a desenvolvida pelo azul de toluidina, o que indica que a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina é mais específica.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa da das células queratinizadas é permanganato alcalino-Schiff positiva (Figura 16). Embora não ocorra grande seletividade da coloração, a membrana espessada reage como se contivesse vitamina D ou 7-deidrocolesterol.

6.3 - Efeito de agentes hidrolíticos sobre a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina

Os agentes hidrolíticos empregados foram os mesmos que se mostraram aptos em hidrolisar os ésteres de colesterol; seu efeito foi testado em relação à vitamina D com a finalidade de se demonstrar complexos da vitamina D ou do 7-deidrocolesterol. Os agentes hidrolíticos foram empregados em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease ou submetidos à metilação.

6.3.1 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Após estes tratamentos, a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina é positiva no citoplasma dos queratinócitos dos extratos periféricos da camada espinhosa; a positividade é mais intensa na camada granulosa, onde ocorrem granulações positivas, que são extraídas quando a hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético é efetuada por 10 minutos ou mais. Os grânulos de queratoialina não se coram. O espaço intercelular se apresenta preenchido por substância reativa em toda extensão da porção profunda da epiderme; a reatividade do compartimento extracelular, no entanto, é mais intensa nas imediações da camada granulosa.

Na porção superficial da epiderme, a hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético não altera a reatividade das células queratinizadas, principalmente de sua membrana espessada.

6.3.2 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

Em cortes histológicos submetidos a estes tratamentos, a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, na porção profunda da epiderme, revela reatividade do citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa e, principalmente, da camada granulosa (Figura 17). Na camada espinhosa a reatividade cresce em direção à periferia e adquire aspecto granuloso, que se conserva na camada granulosa. O espaço intercelular apresenta material reativo em toda a extensão da porção profunda da epiderme, sendo a intensidade da reatividade maior nas áreas próximas à camada granulosa (Figura 18), onde o material reativo pode se apresentar sob forma granular.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessada é fortemente reativa (Figuras 17 e 18), ao contrário do citoplasma das células queratinizadas que não se cora ou apresenta leve reatividade.

6.3.3 - Síntese

Após a hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético sobrevém aparecimento de substância reativa no espaço intercelular; a reatividade do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme e da membrana espessada das células queratinizadas é pouco afetada pela hidrólise. Assim sendo, a hidrólise torna reativo o material do compartimento extracelular, que se apresentava mascarado, devido à presença de complexos. Por outro lado, foi também observado que quando o tempo de hidrólise é mais curto (4 a 5 min.), o desmascaramento da reatividade do material extracelular é menor (Figura 17); quando o tempo de hidrólise é mais longo (10 a 16 min.), o desmascaramento é mais evidente, mas simultaneamente ocorre extração do material reativo intracitoplasmático (Figura 18).

6.3.4 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

A reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após estes tratamentos, fornece resultados semelhantes aos encontrados nos cortes histológicos não submetidos à hidrólise; no entanto, o material reativo de aspecto granular, do citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, torna-se mais evidente (Figura 19). Além disso, a reatividade do espaço intercelular também é evidenciada após este tratamento; o material reativo, situado entre os queratinócitos dos estratos mais profundos da camada granulosa, simula espessamento da membrana plasmática. Os grânulos de queratoialina não se coram.

Na porção superficial da epiderme, esses tratamentos não alteram a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas.

Convém assinalar que o tratamento pelo peridrol-amônia determina, também, aparecimento de material ferricianeto férrico positivo no espaço intercelular, da porção profunda da epiderme, nos mesmos locais em que a substância permanganato alcalino-azul de toluidina é desmascarada (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados). Considerando que a vitamina D e 7-deidrocolesterol reagem positivamente à reação do ferricianeto férrico, este resultado constitui argumento em favor de que o material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo, desmascarado pelo peridrol-amônia, seja constituído pela vitamina D e pelo 7-deidrocolesterol, ao menos em parte.

6.3.5 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

A reatividade dos queratinócitos da porção profunda da epiderme e do compartimento extracelular, após estes tratamentos, é semelhante à verificada nos cortes tratados pela ribonuclease, embora seja mais fraca. Fato semelhante ocorre com a membrana espessada das células queratinizadas.

6.3.6 - Síntese

Os resultados obtidos após a ação hidrolítica do peridrol-amônea são semelhantes aos fornecidos pelo ácido sulfúrico-ácido acético; porém, a intensidade da reatividade do compartimento extracelular é menor, sugerindo menor efeito desmascarante. Por outro lado, o efeito extrativo, deste agente hidrolítico, sobre os grânulos intracitoplasmáticos dos queratinócitos da porção profunda da epiderme é menor, permitindo visualizar nitidamente granulações reativas grosseiras, situadas no citoplasma das células da camada granulosa. Como estas granulações não eram observadas em ausência da hidrólise, é possível supor que os agentes hidrolíticos tenham desmascarado a vitamina D e o 7-deidrocolesterol, contidos nestes grânulos.

6.3.7 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

O efeito destes tratamentos, no que se refere ao material reativo do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, é semelhante ao dos tratamentos pelos hidrolisantes precedentes. No entanto, no compartimento extracelular não aparece material reativo, sendo difícil avaliar se este fato é devido ao menor efeito desmascarante ou se resulta de extração pelos reativos utilizados.

Na porção superficial da epiderme, ocorre redução da reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, revelando que a hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio extrai, parcialmente, o material reativo.

6.3.8 - Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo carbonato-bicarbonato de potássio, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

A reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, quando efetuada após estes tratamentos, revela grande diminuição da reatividade, tanto dos queratinócitos da porção profunda quanto das células queratinizadas da porção superficial da epiderme; estes resultados sugerem intensa extração do material reativo, o que revela serem estes tratamentos inadequados.

É interessante assinalar que, em relação ao colesterol, estes tratamentos apresentam efeito extrativo muito menos intenso, pois o colesterol, situado na membrana espessada das células queratinizadas, é apenas parcialmente extraído. Estes resultados sugerem que a estabilidade da ligação do colesterol com proteínas seja maior do que a da ligação entre a vitamina D e proteínas.

6.3.9 - Síntese

Estes tratamentos são inadequados para o desmascaramento da vitamina D e do 7-deidrocolesterol, situados nos queratinócitos epidérmicos, pois eles apresentam grande efeito extrativo.

7 - Detecção histoquímica do tocoferol

7.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

O azul de toluidina, em pH 0,3, revela a presença de material basófilo nos queratinócitos da porção profunda da epiderme; esta basofilia é quase totalmente abolida pelo tratamento com a ribonuclease e suprimida pela metilação; por estes motivos e para facilitar a interpretação dos resultados, a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina foi analisada em cortes histológicos submetidos a um destes tratamentos.

7.1.1 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina , em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

Na porção profunda da epiderme, em cortes histológicos tratados pela ribonuclease, os resultados desta reação são negativos (Figura 20). Tanto os queratinócitos quanto o compartimento extracelular não apresentam reatividade. Os grânulos de queratoialina também não se coram.

Na porção superficial da epiderme, ao contrário, a membrana espessada das células queratinizadas reage fortemente (Figura 20); o citoplasma não se apresenta reativo ou, por vezes, apresenta fraca reatividade; esta última foi considerada destituída de significado (difusão).

Estes resultados revelam, também, que o material fortemente reativo da membrana espessada das células queratinizadas não é afetado pelo tratamento com a ribonuclease.

7.1.2 - Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos submetidos à metilação

Após a metilação, a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina é negativa na porção profunda da epiderme. Na porção superficial, a membrana espessada das células queratinizadas é fortemente reativa, principalmente nos extratos mais internos da camada córnea (Figura 21). Estes resultados indicam que a metilação não interfere na reatividade da membrana espessada das células queratinizadas.

7.1.3 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

Em cortes histológicos assim fixados, a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina é negativa em toda a epiderme, inclusive na membrana espessada das células queratinizadas. Este resultado revela que o comportamento do material reativo é semelhante ao apresentado pelo tocoferol, cuja reatividade é inibida por esta fixação, em modelos de papel de filtro.

O efeito inibidor da formalina-bicloreto de mercúrio, sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, é parcialmente revertido quando se efetua hidrólise pelo hidróxido de potássio 0,1 N, durante 20 a 45 minutos, antes de se realizar a reação. Nestas circunstâncias, a membrana espessada das células queratinizadas torna-se reativa, da mesma forma que a membrana plasmática dos queratinócitos e o espaço intercelular da porção profunda da epiderme, que também passam a reagir fracamente.

7.1.4 - Ação do metanol-clorofórmio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

Este solvente não modifica a reatividade dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, à reação do ácido perfórmico-azul de toluidina. Todavia, em uma das espécies animais

estudadas (gambá), após o tratamento pelo metanol-clorofórmio, o citoplasma dos queratinócitos dos extratos periféricos da camada espinhosa apresenta reatividade muito discreta, que ocorre sob a forma granular, a qual desaparece na camada granulosa. Devido a este fato e por ser esta reatividade totalmente inibida pela metilação, é provável tratar-se de basofilia de outra natureza, que é desmascarada pelo tratamento com metanolclorofórmio. Por outro lado, as granulações levemente reativas, ao ácido perfórmico-azul de toluidina, situadas no citoplasma dos queratinócitos, apresentam diferenças morfológicas quando comparadas com as granulações de vitamina D; estas últimas, além disso, são encontradas, também, na camada granulosa onde, aliás, são mais numerosas e apresentam maiores dimensões. Devido a estes motivos, estas granulações não devem ser identificadas às de vitamina D; sua natureza não pôde ser determinada.

Na porção superficial da epiderme, o tratamento pelo metanol-clorofórmio, aparentemente, não modifica a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, à reação do ácido perfórmico-azul de toluidina.

7.1.5 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

Após este tratamento, a membrana espessada das células queratinizadas, que é a única estrutura epidérmica que reage positivamente à reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, não mais reage positivamente ou apenas reage muito fracamente. Este resultado indica que o solvente, nas condições usadas, é capaz de extrair o material reativo da membrana espessada das células queratinizadas.

Estes resultados são obtidos, em cortes histológicos, quando o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico é empregado a 60°C; quando o tratamento é efetuado a 38°C ou à temperatura ambiente, a remoção do material reativo da porção superficial da epiderme é parcial, embora seja intensa.

7.1.6 - Ação do hidróxido de potássio sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina

A hidrólise pelo hidróxido de potássio reduz a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, principalmente quando efetuada durante 45 minutos.

Por outro lado, este tratamento determina aparecimento de reatividade no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme; o material reativo se cora metacromaticamente, dispõe-se de forma heterogênea, geralmente é amorfo ou, às vezes, granular.

Estes resultados sugerem que a hidrólise pelo hidróxido de potássio apresenta efeito desmascarante sobre o tocoferol contido no compartimento extracelular; são observados, também, em cortes previamente tratados pelo metanol-clorofórmio, indicando que a extração prévia de lípides livres não determina extração do tocoferol mascarado.

7.1.7 - Ação da hidrólise pelo peridrol-amônea sobre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease

A reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, após este conjunto de tratamentos, mostra material reativo de aspecto granular, corado metacromaticamente em púrpura, no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme (Figuras 22 e 23). A reatividade é discreta e heterogênea; além disso, inicialmente aumenta proporcionalmente com o tempo de tratamento pelo peridrol-amônea; ultrapassado determinado tempo (3 min.) a reatividade diminui, sugerindo que o material reativo é progressivamente desmascarado e sucessivamente extraído pelo tratamento.

A membrana espessada das células queratinizadas, da porção superficial da epiderme, continua ácido perfórmico-azul de toluidina reativa, após estes tratamentos, embora a intensidade da coloração, por vezes, se atenua, sugerindo extração parcial do material reativo. Esta extração é tanto maior quanto mais longo o tempo de tratamento pelo peridrol-amônea. Além disso, quando o tratamento é prolongado são observadas pequenas gotículas reativas, superpostas à membrana espessada, o que corrobora com a hipótese de ser extraído o material reativo.

7.1.8 - Ação da hidrólise pelo peridrol-amônea so

bre a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em cortes histológicos previamente submetidos à metilação

Após a metilação, o material reativo situado no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme não é encontrado, a não ser em raros locais, sugerindo que a metilação apresente efeito extrativo sobre o material reativo.

Na porção superficial da epiderme, a metilação não extrai o material reativo da membrana espessada das células queratinizadas (Figura 24).

7.2 - Reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Esta reação, quando efetuada nestas condições, apresenta positividade no mesmo local em que a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina é positiva, ou seja, na membrana espessada das células queratinizadas. No entanto, embora a membrana espessada reaja mais intensamente, também o citoplasma das células queratinizadas apresenta reatividade ao ácido perfórmico-Schiff, o que indica menor especificidade desta última reação. Este resultado revela que a membrana espessada das células queratinizadas reage positivamente ao ácido perfórmico-azul de toluidina e ao ácido perfórmico-Schiff, da mesma forma que o tocoferol.

7.2.1 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

A fixação em formalina-bicloreto de mercúrio inibe a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas à esta reação. Este resultado é semelhante ao que se verifica com o tocoferol.

7.2.2. - Ação do metanol-clorofórmio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff

O tratamento por este solvente não interfere na reatividade da membrana espessada das células queratinizadas à reação do ácido perfórmico-Schiff, da mesma forma que não altera a reatividade da membrana espessada à reação do ácido perfórmico-azul de toluidina.

Na porção profunda da epiderme, o tratamento pelo metanol-clorofórmio não modifica a reatividade à reação do ácido perfórmico-Schiff.

7.2.3 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff

Após este tratamento, o material ácido perfórmico-Schiff positivo, da membrana espessada das células queratinizadas, é quase totalmente extraído, da mesma maneira que ocorre com o material ácido perfórmico-azul de toluidina positivo.

7.2.4 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

A hidrólise alcalina extrai, parcialmente, o material reativo da membrana espessada das células queratinizadas. Este efeito é semelhante ao verificado com a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina.

No que diz respeito à porção profunda da epiderme, a hidrólise pelo hidróxido de potássio determina o aparecimento de material fracamente reativo no espaço intercelular. Este resultado é também semelhante ao verificado com a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina.

7.2.5 - Ação do peridrol-amônia sobre a reação do ácido perfórmico-Schiff, em cortes histológicos previamente tratados pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina

Este tratamento determina o aparecimento de material ácido perfórmico-Schiff positivo, no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme, o qual apresenta aspecto granular. Por outro lado, a membrana espessada das células querati-

nizadas, aparentemente, não modifica sua reatividade após este tratamento. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com a reação do ácido perfórmico-azul de toluidina.

7.3 - Síntese

A reação do ácido perfórmico-azul de toluidina revela ausência de material reativo na porção profunda da epiderme; no entanto, após a hidrólise com hidróxido de potássio ou com peridrol-amônia aparece material reativo, no compartimento extracelular dessa porção da epiderme, devido ao efeito desmascarante desses tratamentos.

A membrana espessada das células queratinizadas reage fortemente ao ácido perfórmico-azul de toluidina, reatividade esta inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, mas não afetada pelo tratamento com metanol-clorofórmio; a substância reativa é extraída quase totalmente pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e parcialmente removida pela hidrólise com hidróxido de potássio ou com peridrol-amônia.

Nos mesmos locais em que ocorre positividade da reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, ocorre positividade da reação do ácido perfórmico-Schiff, que também é inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio; o material reativo é extraído por metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. Por outro lado, a hidrólise alcalina e a ação do peridrol-amônia determinam aparecimento de material ácido perfórmico-Schiff positivo, no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme.

Estes resultados indicam que o material ácido perfórmico-azul de toluidina positivo apresenta as propriedades químicas do tocoferol.

8 - Detecção histoquímica de grupos redutores

8.1 - Reação do ferricianeto férrico

Na porção profunda da epiderme, a reação do ferricianeto férrico é fraca, em comparação com a porção superficial (Figuras 25 e 26). A membrana plasmática e o espaço intercelular coram-se mais intensamente do que o citoplasma. Na região mais periférica da porção profunda da epiderme, correspondente à ca

mada granulosa, há estreita faixa mais reativa (Figuras 25 e 26), onde se encontram poucos grânulos corados, no citoplasma dos queratinócitos, os quais não correspondem aos grânulos refringentes de queratoialina, que não se coram.

Na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células queratinizadas cora-se fortemente (Figuras 25 e 26); a membrana espessada cora-se mais fracamente (Figura 26). Este resultado é bem evidente na epiderme espessa. Na região mais interna da porção superficial da epiderme espessa, na área correspondente à camada lúcida, ocorre estreita faixa aparentemente não reativa (Figuras 25 e 26).

8.1.1 - Ação do bicloreto de mercúrio

8.1.1.1 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio

A fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio, geralmente, determina diminuição da intensidade da reação do ferricianeto férrico, principalmente na porção superficial da epiderme (Figura 27; comparar com Figura 25), a qual atinge tanto o citoplasma quanto a membrana espessada das células queratinizadas. Algumas vezes, também a intensidade da reação da porção profunda apresenta-se diminuída; a maior reatividade da região correspondente à camada granulosa continua a ocorrer, mesmo após esta fixação.

Na porção superficial desaparece a estreita faixa menos corada, correspondente à camada lúcida. A intensidade da inibição, provocada pela formalina-bicloreto de mercúrio, varia com o tempo de fixação, sendo fraca em tecidos fixados por até 48 horas e intensa em tecidos mantidos no fixador por vários meses.

8.1.1.2 - Ação do bicloreto de mercúrio, em cortes histológicos de pele fixada em formalina-cálcio

Quando o bicloreto de mercúrio é usado em solução saturada, durante 1 hora, em cortes histológicos previamente fixados em formalina-cálcio, o efeito é menor; ocorre inibição da reatividade, à reação do ferricianeto férrico, principalmente nas regiões mais internas da porção profunda da epiderme. Na

porção superficial a inibição é pequena e a camada lúcida continua se apresentando muito pouco reativa. Quando o tempo de tratamento, pela solução saturada de bicloreto de mercúrio, é prolongado durante 14 horas, ocorre diminuição da reatividade da camada granulosa e alargamento da faixa pouco reativa, correspondente à camada lúcida.

8.1.2 - Ação do metanol-clorofórmio

Este solvente, aparentemente, não tem efeito sobre a reatividade da epiderme à reação do ferricianeto férrico. Este resultado sugere que o material ferricianeto férrico positivo não é constituído por lípides livres.

8.1.3 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

O tratamento por este solvente intensifica a reatividade da porção profunda da epiderme, onde os queratinócitos passam a apresentar coloração mais intensa do citoplasma, embora não apresentem granulações; a membrana plasmática dos queratinócitos e o espaço intercelular são fracamente reativos, em comparação com o citoplasma.

Na porção superficial da epiderme, ocorre diminuição da reatividade do citoplasma das células queratinizadas; ao contrário, a membrana espessada, que era fracamente reativa, antes do tratamento, torna-se bem reativa, corando-se mais intensamente que o citoplasma. Por outro lado, após a ação do solvente a estreita faixa com menor reatividade, localizada na área correspondente à camada lúcida, desaparece.

Estes resultados indicam que, sob a ação deste solvente, ocorre modificação da reatividade das células queratinizadas; onde a reatividade era fraca torna-se forte e vice-versa. Estes resultados indicam, também, que além de extração, este solvente determina desmascaramento de material reativo.

Na membrana espessada das células queratinizadas, o tratamento sucessivo por metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e por ácido perfórmico extrai o material reativo à reação do ferricianeto férrico.

O tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, seguido do tratamento por ácido perfórmico, determina extração do material ferricianeto férrico positivo, de aparência

granular, situado no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, e que apresenta aspecto morfológico semelhante ao dos grânulos de queratoialina; determina, também, maior extração do material reativo situado no citoplasma das células queratinizadas.

8.1.4 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

Quando a hidrólise é efetuada durante 20 minutos, na porção profunda da epiderme ocorre aumento da reatividade do citoplasma dos queratinócitos, principalmente dos situados nos extratos mais externos, correspondentes à camada granulosa (Figura 28), onde ocorrem granulações reativas. Devido à reatividade do citoplasma, as células da camada espinhosa apresentam-se bem delimitadas, uma vez que a membrana plasmática e o espaço intercelular coram-se mais fracamente, ao contrário do que ocorria em ausência do tratamento pelo hidróxido de potássio. As granulações reativas, desmascaradas pelo tratamento com hidróxido de potássio, apresentam morfologia e localização comparáveis às apresentadas pelas granulações que contêm vitamina D. Essa correspondência morfológica e topográfica é verificada, com maior evidência, na epiderme do gambá, onde os grânulos permanganato alcalino-azul de toluidina positivos são grosseiros e bastante numerosos (Figura 28).

A porção superficial da epiderme apresenta diferenças pouco significativas, quando cortes histológicos não tratados são comparados com cortes tratados pelo hidróxido de potássio.

Quando a hidrólise pelo hidróxido de potássio é efetuada durante 45 minutos, o material reativo é extraído, parcialmente, tanto o da porção profunda quanto o da porção superficial da epiderme.

8.1.5 - Ação do ácido perfórmico

Após este tratamento, há aumento da intensidade da reação do ferricianeto férrico na porção profunda da epiderme, principalmente em suas camadas mais periféricas (Figura 29); a reatividade se localiza no citoplasma dos queratinócitos e se apresenta difusa ou sob forma granular. O material reativo, desmascarado pelo ácido perfórmico, apresenta situação e características morfológicas semelhantes aos grânulos de queratoiali-

na. A distribuição das células contendo grânulos citoplásmicos, no entanto, atinge área mais ampla, em comparação com a ocupada pelas células que contêm grânulos refringentes de queratoialina (verificados em cortes histológicos em série, mas não corados). Não obstante esta pequena discordância, estes resultados sugerem que os grânulos de queratoialina sejam ferricianeto férrico positivos, após a ação desmascarante do ácido perfórmico. Convém assinalar que, quando se prolonga o tempo de tratamento pelo ácido perfórmico, há extração do material ferricianeto férrico reativo, tanto do mascarado, situado na porção profunda da epiderme, quanto do não mascarado, localizado no citoplasma das células queratinizadas.

Após o tratamento pelo ácido perfórmico, na porção superficial da epiderme, sobrevém diminuição da reatividade do citoplasma das células queratinizadas (Figura 29), ao contrário da membrana espessada que se apresenta aparentemente mais reativa do que em ausência do tratamento. Além disso, na área mais interna da porção superficial, correspondente à camada lúcida, observa-se estreita faixa de maior reatividade citoplásmica, em oposição ao que ocorria em ausência do tratamento pelo ácido perfórmico. Esses resultados indicam que o ácido perfórmico desmascara material ferricianeto férrico positivo, situado na membrana espessada das células queratinizadas.

8.1.6 - Síntese

A reação do ferricianeto férrico mostra reatividade, principalmente, da porção superficial da epiderme e, também, dos extratos mais periféricos da porção profunda.

A reatividade da porção profunda diminui quando se efetua fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio, não é afetada pelo tratamento com metanol-clorofórmio e aumenta quando se efetua tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; este último resultado, provavelmente, depende do desmascaramento de material reativo. Fato semelhante ocorre quando se realiza a hidrólise pelo hidróxido de potássio ou quando se processa o tratamento pelo ácido perfórmico. O material reativo, do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, desmascarado pelo tratamento com hidróxido de potássio, apresenta localização e aspecto morfológico semelhantes aos apresentados pelos grânulos de vitamina D; estes resultados sugerem que o

material ferricianeto fêrrico positivo, desmascarado por este tratamento, poderia ser vitamina D, que também é ferricianeto fêrrico positiva.

Ao contrário, o material granular ferricianeto fêrrico positivo, desmascarado pelo ácido perfôrmico, foi interpretado como granulações de queratoialina, tendo em vista as características morfológicas e a ausência de reatividade dos grânulos de vitamina D, após desmascaramento pelo ácido perfôrmico, conforme pôde ser bem evidenciado na epiderme do gambá.

Na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células queratinizadas reage fortemente à reação do ferricianeto fêrrico, reatividade esta que é inibida, parcialmente, pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, não é afetada pelo tratamento com metanol-clorofôrmio e é reduzida pelo tratamento com metanol-clorofôrmio-ácido clorídrico. Ao contrário, este último tratamento determina aumento da reatividade da membrana espessada. Efeito semelhante apresenta o tratamento pelo ácido perfôrmico, que reduz fortemente a reatividade do citoplasma e determina aumento da reatividade da membrana espessada das células queratinizadas. Ao contrário, a fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio inibe, parcialmente, a reatividade da membrana espessada.

8.2 - Reatividade ao reativo de Schiff

Esta reatividade constitui termo de comparação para a reação do PAS, para as reações do ácido peracético-Schiff, do permanganato alcalino-Schiff, do ácido perfôrmico-Schiff e da aloxana-Schiff.

Os queratinócitos da porção profunda da epiderme e as células queratinizadas da porção superficial, reagem muito fracamente ao reativo de Schiff. Esta fraca reatividade se apresenta diminuída quando se efetua fixação com formalina-bicloreto de mercúrio ou quando os cortes histológicos são extraídos com metanol-clorofôrmio. Este último resultado indica que parte da positividade é proveniente da presença de lípidos livres.

O tratamento com metanol-clorofôrmio-ácido clorídrico determina, ao contrário, pequeno aumento da reatividade do citoplasma das células queratinizadas. Este resultado sugere liberação de grupos redutores, Schiff positivos, devido à ação hidrolítica do ácido clorídrico. O tratamento pelo hidróxido de

potássio determina, também, leve aumento da reatividade da porção superficial da epiderme.

O bloqueio pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina inibe totalmente a reatividade da epiderme ao reativo de Schiff, sugerindo ser ela decorrente da presença de grupos carbonila.

Estes resultados sugerem a presença de material contendo grupos carbonila, na epiderme, o qual é parcialmente extraído pelo metanol-clorofórmio (natureza lipídica) e se apresenta, em parte, mascarado, conforme sugerem os tratamentos pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e pelo hidróxido de potássio.

9 - Detecção histoquímica de material PAS reativo

A reação do PAS é fracamente positiva no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, principalmente nas áreas mais basais, onde o espaço intercelular não se cora; nas regiões mais periféricas, ocorrem granulações coradas que progressivamente se fundem corando o espaço intercelular com maior intensidade, cujo máximo é atingido na camada granulosa (Figura 30). No citoplasma dos queratinócitos desta camada são encontrados alguns grânulos PAS positivos; estes são diferentes dos grânulos de queratoialina, os quais são fortemente refringentes e não reativos.

Na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células queratinizadas não se cora ou cora-se fracamente, ao contrário da membrana espessada que cora-se fortemente (Figura 30). A intensidade de coloração da membrana espessada diminui em direção à periferia.

Convém salientar que a intensidade da reação do PAS, do espaço intercelular da camada granulosa, é maior em comparação com a da membrana espessada das células queratinizadas. Este resultado sugere mascaramento parcial do material PAS positivo, na membrana espessada das células queratinizadas.

9.1 - Ação da amilase e da diastase do malte

O tratamento pela amilase ou pela diastase do malte remove parcialmente o material PAS positivo, situado no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, o qual é assim identificado ao glicogênio. No entanto, não tem ação sobre o material PAS positivo, contido tanto no espaço intercelu

lar da porção profunda da epiderme quanto na membrana espessa da das células queratinizadas, o qual não é constituído por glicogênio.

9.2 - Ação da fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio

Esta fixação inibe, parcialmente, a reação do PAS do espaço intercelular da porção profunda da epiderme e, principalmente, da membrana espessada das células queratinizadas, na qual a positividade desaparece quase totalmente; inibe, parcialmente, também, a reatividade de granulações contidas nos queratinócitos da camada granulosa.

9.3 - Ação do metanol-clorofórmio

Aparentemente, este solvente não extrai o material PAS positivo da epiderme, tanto o situado no espaço intercelular quanto o localizado na membrana espessada das células queratinizadas, indicando que este material apresenta-se ligado à proteínas.

9.4 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Este solvente determina extração intensa do material PAS positivo, situado tanto no espaço intercelular da porção profunda da epiderme quanto na membrana espessada das células queratinizadas. Este resultado indica que a ação hidrolítica do ácido clorídrico libera o material PAS positivo do complexo protéico, extraindo-o.

9.5 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

A hidrólise pelo hidróxido de potássio aumenta a reatividade, à reação do PAS, do espaço intercelular da porção profunda da epiderme (Figura 31); por este motivo, mesmo nos extratos mais profundos da camada espinhosa existe material reativo, no interior do espaço intercelular, o qual, no entanto, somente é demonstrável após desmascaramento pelo hidróxido de potássio.

Na porção superficial da epiderme, ao contrário, a hi-

drólise provoca diminuição da reatividade da membrana espessa da das células queratinizadas.

Estes resultados indicam que a hidrólise libera material reativo no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme, o qual não é removido; no que se refere à membrana espessada das células queratinizadas, a hidrólise provoca extração do material reativo.

9.6 - Síntese

No citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, a reação do PAS, combinada com o teste da amilase, revela a presença de glicogênio. No espaço intercelular da porção profunda da epiderme, assim como na membrana espessada das células queratinizadas, ocorre a presença de material PAS positivo, que não é afetado pelo tratamento com amilase ou com metanol-clorofórmio, mas é removido pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. No interior dos queratinócitos da camada granulosa ocorrem finos grânulos PAS positivos, que apresentam as mesmas propriedades do material do compartimento extracelular. Além disso, a reação do PAS é inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, tanto no que concerne ao compartimento extracelular da porção profunda quanto à membrana espessada das células queratinizadas; também as granações PAS positivas, situadas nos queratinócitos da camada granulosa, são inibidas por esta fixação, perdendo a reatividade.

Estes resultados sugerem que o material granular, PAS positivo, situado no interior do citoplasma dos queratinócitos, seja semelhante ao localizado no compartimento extracelular.

A membrana espessada das células queratinizadas apresenta material PAS positivo, cujas propriedades são, também, semelhantes às do material situado no espaço intercelular da porção profunda da epiderme, sugerindo relação entre ambos. Por outro lado, tendo em vista a solubilidade, nos solventes usados, esse material não deve ser lípide livre.

Os resultados fornecidos pela hidrólise com hidróxido de potássio indicam, entretanto, desmascaramento de material PAS positivo, no espaço intercelular da porção profunda da epiderme e extração do material situado na membrana espessada das células queratinizadas; essa diferença de comportamento sugere diversidade quanto ao grau de ligação com outras substâncias,

provavelmente protéicas.

10 - Detecção histoquímica de substâncias dotadas do íon sulfato

Os resultados revelam que substâncias contendo o íon sulfato estão presentes no citoplasma dos queratinócitos das camadas basal e espinhosa; a intensidade da reação diminui em direção à camada granulosa, onde a reatividade do citoplasma se torna pouco intensa (Figura 32).

Na porção superficial da epiderme, ocorre positividade da reação para o íon sulfato apenas nas regiões mais internas, principalmente em algumas áreas (Figura 32). Esta irregularidade da reatividade sugere que o material reativo esteja parcialmente mascarado. Embora os resultados da reação para o íon sulfato não permitam distinguir, com precisão, os componentes das células queratinizadas, nas regiões mais internas da camada córnea o citoplasma parece reagir mais fortemente do que a membrana espessada.

A reação para o íon sulfato é inibida quando se efetua a fixação por solução de formalina contendo bicloreto de mercúrio.

O material contendo o íon sulfato, situado na porção profunda da epiderme, é extraído quando se efetua o tratamento dos cortes histológicos por metanol-clorofórmio e metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, o que sugere ser de natureza lipídica e se apresentar livre. Também o tratamento por solução de hidróxido de potássio extrai, quase totalmente, esse material reativo. Ao contrário, o pré-tratamento por ribonuclease não remove o material reativo dos queratinócitos da porção profunda da epiderme.

Em síntese, o material dotado do íon sulfato, situado na porção profunda da epiderme, parece ser de natureza lipídica, estando livre, pois é removido pelo tratamento por metanol-clorofórmio. Este material apresenta propriedades diferentes do PAS positivo e pode ser responsável pela basofilia dos queratinócitos, que persiste após o tratamento com a ribonuclease; é possível tratar-se de lípide sulfatado. Na porção superficial da epiderme, o íon sulfato parece estar constituindo o complexo e, por isso, se apresenta mascarado.

11 - Detecção histoquímica de proteínas

11.1 - Reação da aloxana-Schiff

A reatividade, tanto da porção profunda da epiderme quanto da superficial, à reação da aloxana-Schiff, é pouco intensa (Figura 33); o citoplasma dos queratinócitos é responsável pela reatividade da porção profunda da epiderme. Na porção superficial, a membrana espessada das células queratinizadas cora-se com a mesma intensidade do citoplasma.

Convém salientar que a reação da aloxana-Schiff cora levemente os grânulos de queratoialina. Além disso, nos queratinócitos da camada granulosa esta reação cora grânulos menores, arredondados e de tamanho uniforme. Estes grânulos assemelham-se, topográfica e morfologicamente, aos grânulos que reagem positivamente à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina.

11.1.1 - Ação do metanol-clorofórmio

Aparentemente, a extração por este solvente não altera a intensidade da reação da aloxana-Schiff da epiderme.

11.1.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

O tratamento por este solvente não altera a intensidade da reação da aloxana-Schiff, da porção profunda da epiderme. Todavia, determina aumento da reatividade da porção superficial da epiderme, tanto no que diz respeito ao citoplasma quanto à membrana espessada das células queratinizadas. Este resultado sugere que, devido à ação hidrolítica do ácido clorídrico, grupos reativos são desmascarados na porção superficial da epiderme. Como este tratamento, também, aumenta a sudanofilia do citoplasma das células queratinizadas, é possível que a hidrólise ácida promova a cisão de complexos lipoprotéicos, cujos produtos resultantes são reativos, sendo responsáveis tanto pela mais intensa reação da aloxana-Schiff quanto pela sudanofilia.

Quando se efetua o tratamento por solução de hidróxido de potássio, após tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, diminui a intensidade da reação da aloxana-Schiff da

porção superficial da epiderme; este resultado indica que a hidrólise pelo hidróxido de potássio remove o material reativo, liberado pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

11.1.3 - Ação da hidrólise pelo hidróxido de potássio

O tratamento pelo hidróxido de potássio não modifica, em geral, a reatividade da epiderme à reação da aloxana-Schiff. Contudo, após este tratamento, grânulos com a mesma morfologia e a mesma localização dos de queratoialina, tornam-se pouco mais reativos, sugerindo ação desmascarante desse tratamento.

11.1.4 - Ação do ácido perfórmico

O tratamento pelo ácido perfórmico intensifica a reação da aloxana-Schiff na epiderme (Figura 34). Na porção profunda, o citoplasma dos queratinócitos reage mais fortemente do que em ausência desse tratamento e a intensidade da reação aumenta em direção à camada granulosa. Nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa ocorrem finas granulações no citoplasma dos queratinócitos, as quais se coram mais intensamente do que o restante do citoplasma. Estes grânulos correspondem, morfológica e topograficamente, aos que reagem positivamente ao permanganato alcalino-azul de toluidina (Figura 34; comparar com Figura 14), conforme pode ser bem verificado na epiderme do gambá.

Os grânulos assinalados não se coram pelo ácido perfórmico-Schiff, sugerindo não conterem tocoferol; no entanto, contêm proteínas que são desmascaradas pelo ácido perfórmico. Deve ser salientado que os grânulos de queratoialina são menos corados pela reação da aloxana-Schiff, após o tratamento pelo ácido perfórmico, sugerindo que esse tratamento extraia material protéico, desses grânulos. Por outro lado, esse mesmo tratamento desmascara material ferricianeto férrico reativo, dos grânulos de queratoialina.

Na porção superficial da epiderme, a maior intensidade da reação decorre do aumento da reatividade, tanto do citoplasma quanto da membrana espessada das células queratinizadas. No entanto, a reação do ácido perfórmico-Schiff é intensa no citoplasma das células queratinizadas; este resultado sugere que o aumento da reatividade observada seja inespecífico, pois tam-

bem ocorre em ausência de tratamento pela aloxana.

11.2 - Reação do DDD

Esta reação foi empregada com a finalidade de demonstrar substâncias de natureza protéica, pois conforme tem sido geralmente admitido, as proteínas epidérmicas, principalmente as relacionadas com a "queratina", são dotadas de grupos capazes de reagir com o DDD.

A reação do DDD é positiva em toda a extensão da epiderme, corando-se o citoplasma dos queratinócitos. Na porção profunda, a reação é menos intensa do que na porção superficial da epiderme. Nas áreas mais basais da porção profunda, o espaço intercelular não se cora, enquanto que na região mais periférica o espaço intercelular cora-se com a mesma intensidade do citoplasma, o que impede a delimitação celular (Figura 35). Este resultado indica a presença de material protéico no espaço intercelular. Os grânulos de queratoialina coram-se com a mesma intensidade do citoplasma.

Na porção superficial da epiderme, a região central do citoplasma das células queratinizadas reage fortemente (Figura 35), ao contrário da região cortical que reage fracamente. A membrana espessada se comporta da mesma maneira que a região cortical das células queratinizadas. Este resultado sugere maior concentração de proteínas reativas na região central do citoplasma das células queratinizadas.

11.2.1 - Ação do metanol-clorofórmio

O tratamento por este solvente, aparentemente, não modifica a reatividade, tanto da porção profunda quanto da porção superficial da epiderme, à reação do DDD.

11.2.2 - Ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico

Na porção profunda da epiderme, este tratamento, aparentemente, não altera a reatividade dos queratinócitos à reação do DDD. Na porção superficial da epiderme, ao contrário, o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico determina grande extração do material reativo, principalmente do situado no citoplasma das células queratinizadas. O efeito extrativo sobre a membra

na espessada das células queratinizadas é menos intenso, principalmente, no que diz respeito aos extratos mais internos da camada córnea.

Este resultado indica que o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico extrai proteínas das células queratinizadas, situadas em seu citoplasma.

11.2.3 - Ação do ácido perfórmico

O tratamento pelo ácido perfórmico modifica a reatividade da epiderme à reação do DDD. Na porção profunda da epiderme o citoplasma dos queratinócitos não sofre alteração da reatividade, após o tratamento com ácido perfórmico; ao contrário, o espaço intercelular cora-se mais fortemente, principalmente nas áreas mais superficiais, onde simulam espessamento da membrana plasmática, em queratinócitos ainda dotados de núcleo. Os grânulos de queratoialina coram-se com a mesma intensidade do restante do citoplasma, o que sugere não ser afetada sua reatividade.

Na porção superficial da epiderme, o citoplasma das células queratinizadas cora-se muito fracamente, ao contrário da membrana espessada que reage fortemente. Este resultado indica que o tratamento pelo ácido perfórmico extrai o material intracelular que reage positivamente à reação do DDD; no entanto, além de não extrair proteínas da membrana espessada determina, ainda, desmascaramento, pois aumenta sua reatividade.

11.2.4 - Reação do DDD em cortes histológicos previamente tratados pelo tioglicolato de sódio

O tratamento pelo tioglicolato de sódio, efetuado antes da reação do DDD, intensifica a reatividade da epiderme.

Na porção profunda da epiderme ocorre, no espaço intercelular, a presença de material levemente reativo, relacionado com as espinhas de união (Figura 36). Algumas vezes, nas áreas mais periféricas, em correspondência com a camada granulosa, o espaço intercelular cora-se uniformemente e pouco mais intensamente do que o citoplasma. Os grânulos de queratoialina, presentes no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, se apresentam corados com a mesma intensidade do restante do citoplasma. Além disso, nestas mesmas células ocorrem granula-

ções menores, de dimensões mais uniformes, que se coram mais fortemente e que correspondem aos grânulos de vitamina D, que reagem positivamente à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessa da das células queratinizadas apresenta reatividade (Figura 37). Na região correspondente à camada lúcida, a membrana espessa da se apresenta bem corada; na região mais periférica a coloração da membrana se atenua. Em toda a extensão da porção superficial da epiderme, no entanto, a membrana espessada apresenta-se mais delgada do que quando corada pela reação do ácido perfórmico-azul de toluidina. Este resultado sugere que o componente protéico, reativo à reação do DDD após o tratamento pelo tioglicolato de sódio, não atinja toda a espessura da estrutura que foi por nós considerada como membrana espessada das células queratinizadas.

Após o pré-tratamento com o tioglicolato de sódio, o citoplasma das células queratinizadas apresenta-se reativo em maior extensão, pois a forte reatividade, além de ocorrer na região central da célula, abrange, também, a região cortical. Convém assinalar que esta última região é fracamente reativa em ausência do tratamento pelo tioglicolato de sódio. Embora sobrevenham estas modificações, a reatividade da região central das células queratinizadas continua maior do que a da cortical.

11.2.5 - Síntese

As reações histoquímicas que revelam substâncias de natureza protéica indicam, na porção profunda da epiderme, a presença de grânulos, no citoplasma dos queratinócitos dos extratos superiores da camada espinhosa e nos da camada granulosa, principalmente quando se efetua o tratamento com hidróxido de potássio ou com ácido perfórmico, seguido da reação da aloxana-Schiff. Dois tipos de grânulos aloxana-Schiff positivos podem ser distinguidos: 1 - os semelhantes aos grânulos de queratolialina, cuja reatividade é acentuada pelo tratamento com hidróxido de potássio; 2 - os grânulos semelhantes aos que contêm vitamina D, cuja reatividade é desmascarada pelo pré-tratamento com ácido perfórmico.

No espaço intercelular da porção profunda da epiderme, a reação do DDD indica a presença de material protéico, princi

palmente, quando efetuada após o tratamento pelo ácido perfórmico ou pelo tioglicolato de sódio.

Na porção superficial da epiderme, as células queratinizadas reagem mais fortemente, à reação da aloxana-Schiff, após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou pelo ácido perfórmico. Convém lembrar que a reação do ácido perfórmico-Schiff é intensa no citoplasma das células queratinizadas. Assim sendo, a intensificação da reatividade à reação da aloxana-Schiff, após o tratamento pelo ácido perfórmico, pode ser inespecífica, pois poderia ocorrer em ausência do tratamento pela aloxana. São favoráveis à hipótese da inespecificidade da reação da aloxana-Schiff, efetuada após o tratamento pelo ácido perfórmico, no citoplasma das células queratinizadas, os resultados fornecidos pela reação do DDD; segundo estes últimos, o pré-tratamento pelo ácido perfórmico determina extração do material reativo, do citoplasma, das células queratinizadas. Por outro lado, o tratamento pelo metanol-clorofórmio - ácido clorídrico, também, determina grande extração do material DDD positivo, situado no citoplasma das células queratinizadas, o que é favorável à hipótese aventada. Estes resultados indicam, além disso, que a reação da aloxana-Schiff e a do DDD não fornecem resultados superponíveis.

A reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, à reação do DDD, é intensificada pelo tratamento com ácido perfórmico ou com tioglicolato de sódio. A ação do ácido perfórmico, sobre a reatividade à reação do DDD, é oposta no citoplasma e na membrana espessada das células queratinizadas, sugerindo diferenças quanto à relação entre as proteínas, situadas em ambos locais, e os outros componentes, principalmente os de natureza lipídica.

12 - Documentação fotomicrográfica

Figuras: 1, 2, 3 e 4

Figura 1: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Negro de Sudan.

Porção profunda da epiderme: Sudanofilia do citoplasma dos queratinócitos, cuja intensidade aumenta na camada granulosa; presença de material sudanófilo no compartimento extracelular.

Porção superficial da epiderme: Sudanofilia da membrana espessada da célula queratinizada; ausência de sudanofilia do citoplasma.

Figura 2: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Negro de Sudan.

Porção superficial da epiderme: Sudanofilia da membrana espessada da célula queratinizada, cuja intensidade é menor nos extratos internos da camada córnea; o citoplasma não apresenta sudanofilia.

Figura 3: Pele de coxim plantar de gambá; 370X. Negro de Sudan, após tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

Porção profunda da epiderme: Intensa atenuação da sudanofilia, persistindo apenas grânulos sudanófilos justanucleares (seta).

Porção superficial da epiderme: Pequena atenuação da sudanofilia da membrana espessada da célula queratinizada; sudanofilia do citoplasma da célula queratinizada, devido ao desmascaramento de material sudanófilo.

Figura 4: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Negro de Sudan, após tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

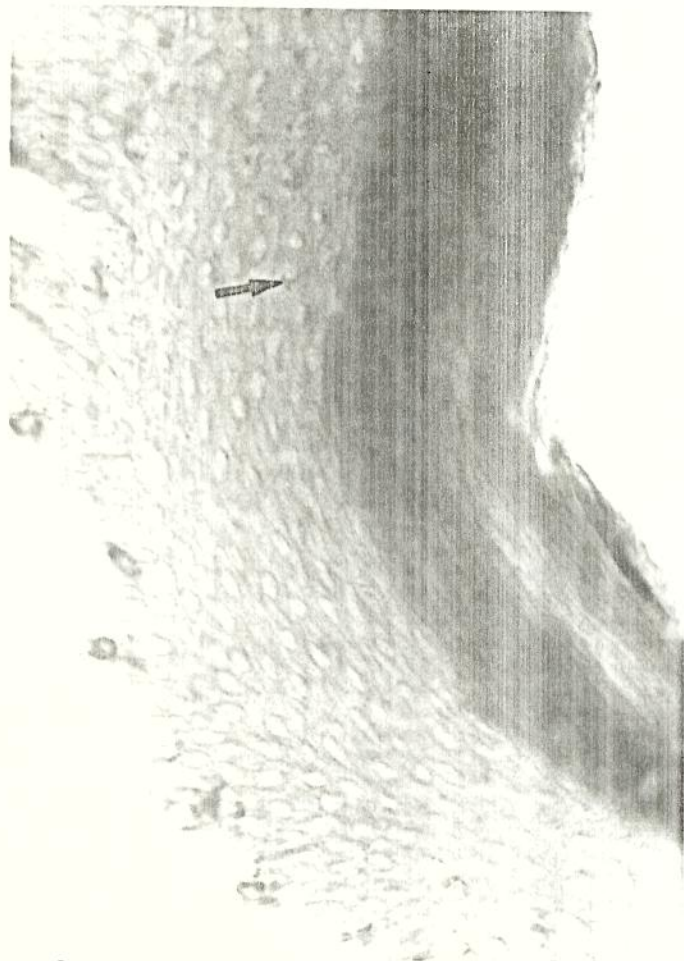
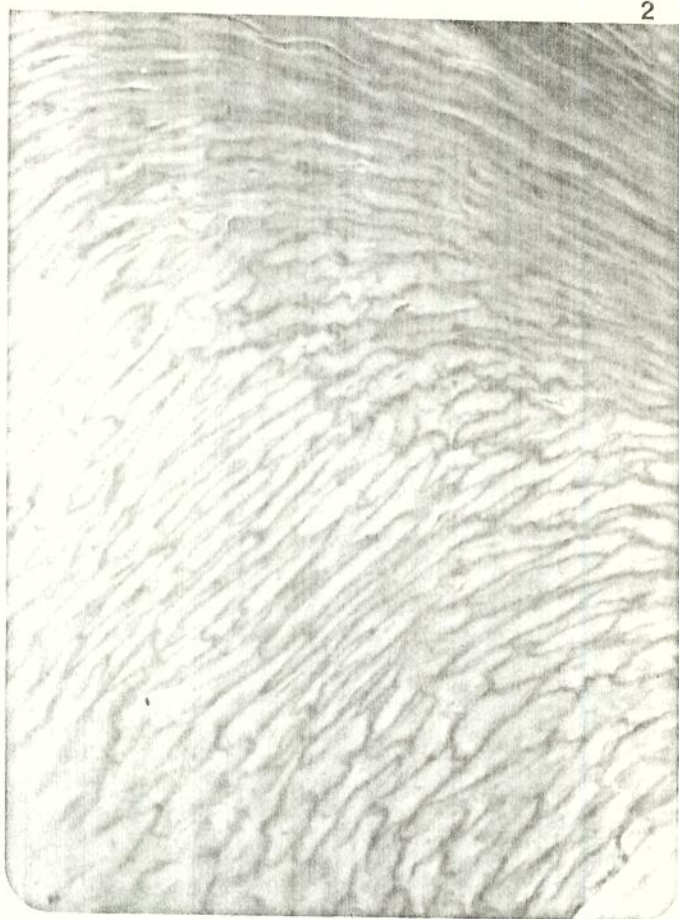
Porção profunda da epiderme: Redução da sudanofilia.

Porção superficial da epiderme: Sudanofilia do citoplasma da célula queratinizada (desmascaramento), tornando difícil a individualização da membrana espessada.

1



2



3



4

Figuras: 5, 6, 7 e 8

Figura 5: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Detecção de lípidos contendo colina.

Porção profunda da epiderme: (A): Discreta coloração da membrana plasmática e do espaço intercelular. O citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais internos não é reativo. A comparação com a Figura 1 indica que a maior parte do material sudanófilo do citoplasma dos queratinócitos não é constituída por lípidos contendo colina.

Porção superficial da epiderme: Reação positiva na membrana espessada e negativa no citoplasma da célula queratinizada, a não ser nos extratos mais internos da camada córnea, onde o citoplasma é reativo, enquanto que a reatividade da membrana espessada é menor.

Figura 6: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Detecção de lípidos contendo colina.

Porção superficial da epiderme: Reação positiva na membrana espessada e negativa no citoplasma da célula queratinizada.

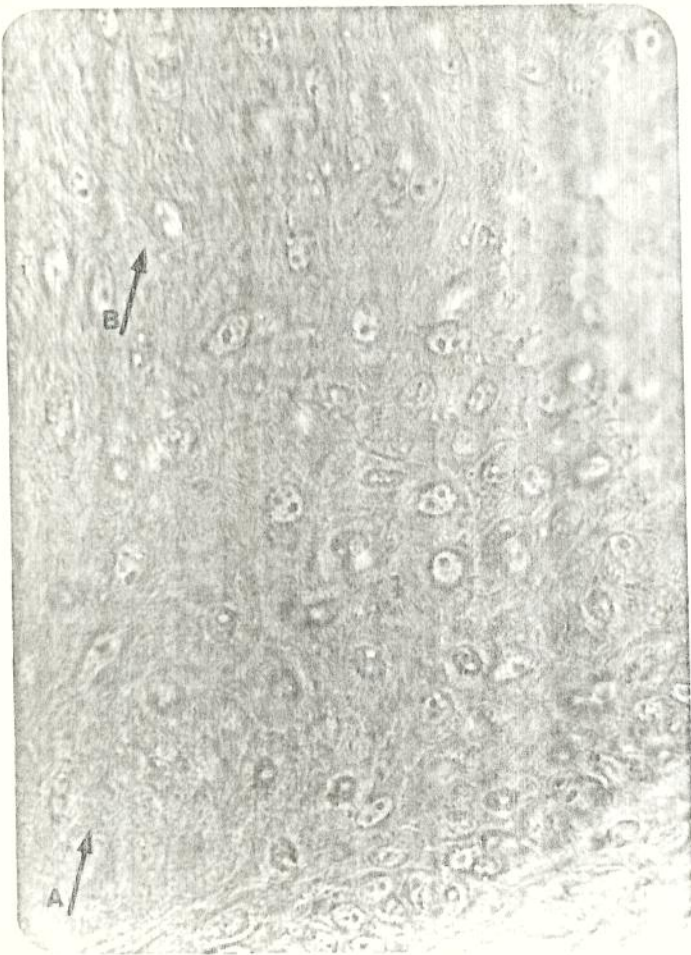
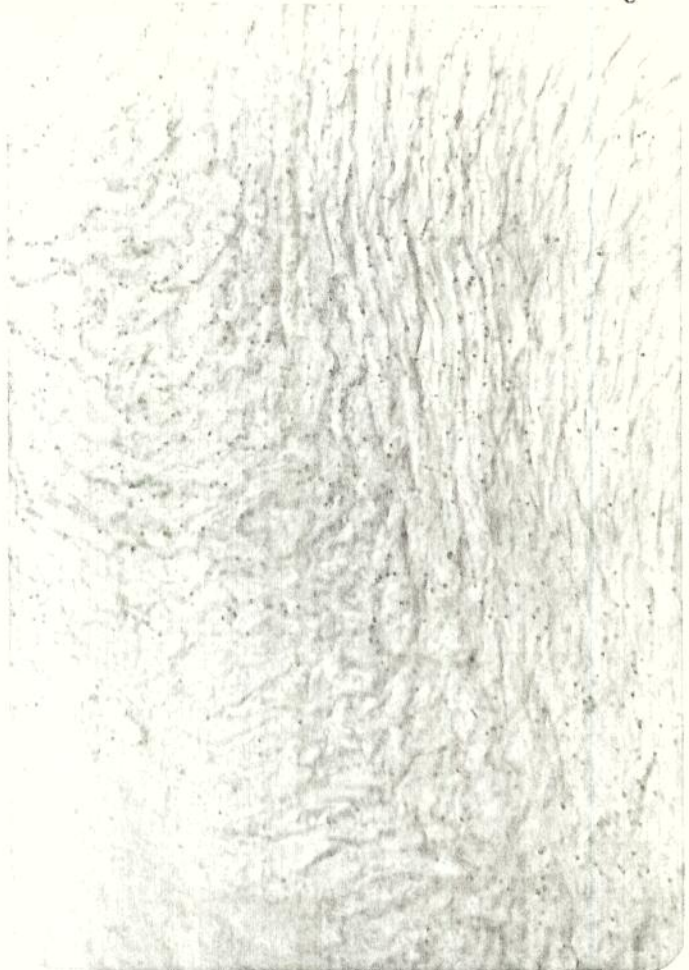
Figuras 7 e 8: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Detecção de lípidos contendo colina, após tratamento pelo hidróxido de potássio (45 min.).

Porção profunda da epiderme: Material reativo, de aspecto granular, no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais profundos da camada espinhosa (A: seta); material de estrutura filamentosa, nos extratos mais periféricos (B: seta) da camada espinhosa, que corresponde aos tonofilamentos.

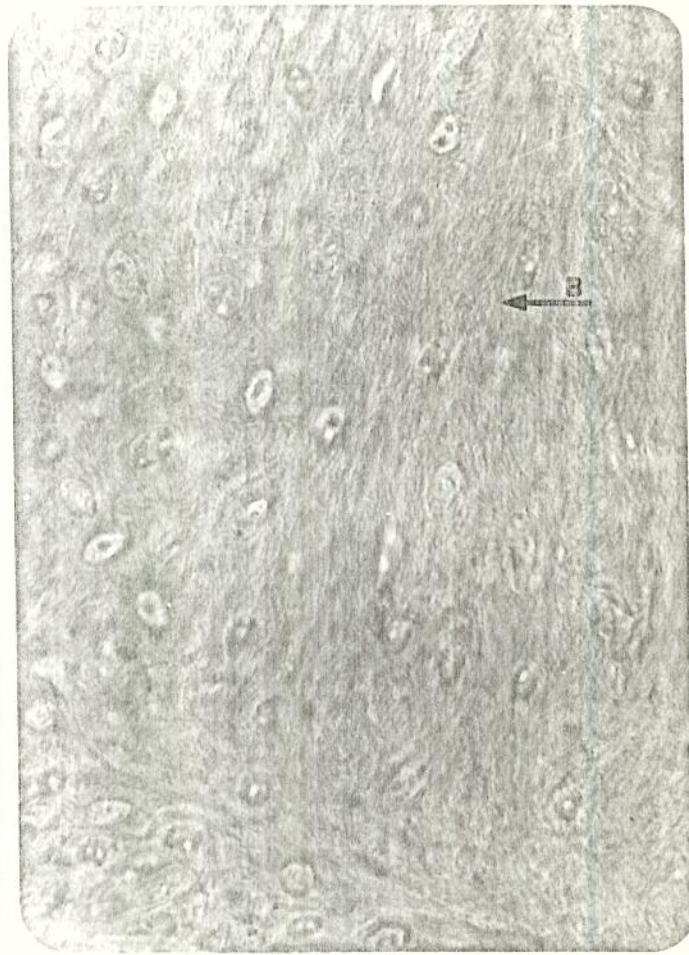
5



6



7



8

Figuras: 9, 10, 11 e 12

Figura 9: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Azul de toluidina, pH 0,3.

Porção profunda da epiderme: Forte basofilia do citoplasma dos queratinócitos da camada basal e dos extratos mais internos da camada espinhosa.

Figura 10: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Azul de toluidina, pH 0,3.

Porção profunda da epiderme: Basofilia do citoplasma dos queratinócitos.

Porção superficial da epiderme: Ausência de coloração, tanto do citoplasma quanto da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 11: Pele de abdome de gambá; 590X. Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após tratamento pela ribonuclease (Colesterol não esterificado).

Porção profunda da epiderme: Discreta positividade difusa do citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e de alguns queratinócitos mais periféricos da camada espinhosa.

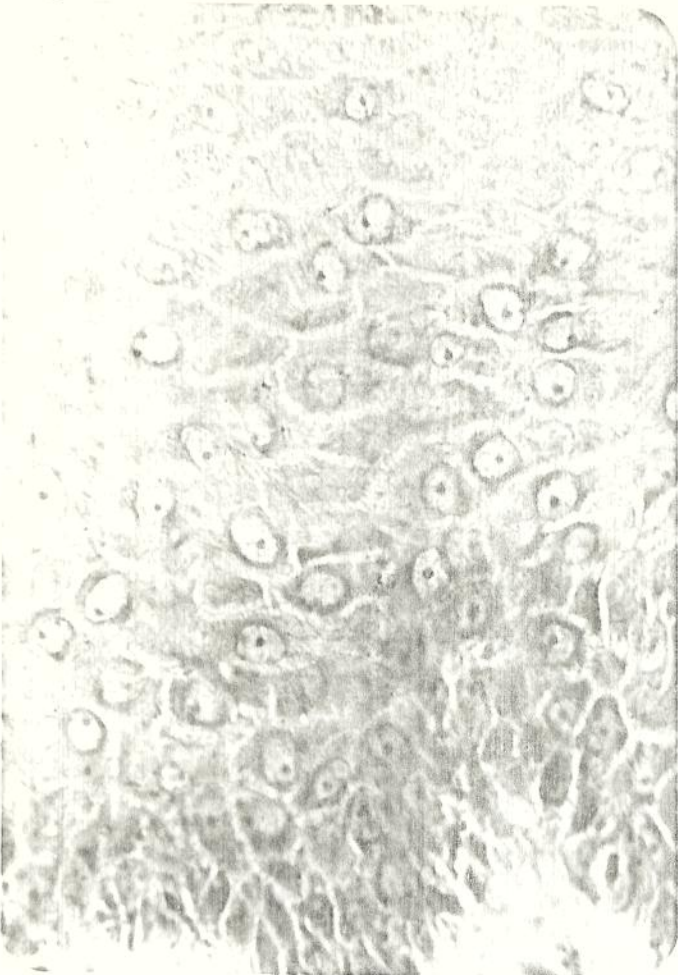
Porção superficial da epiderme: Reatividade da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 12: Pele de orelha de gambá; 1480X. Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease (Colesterol total).

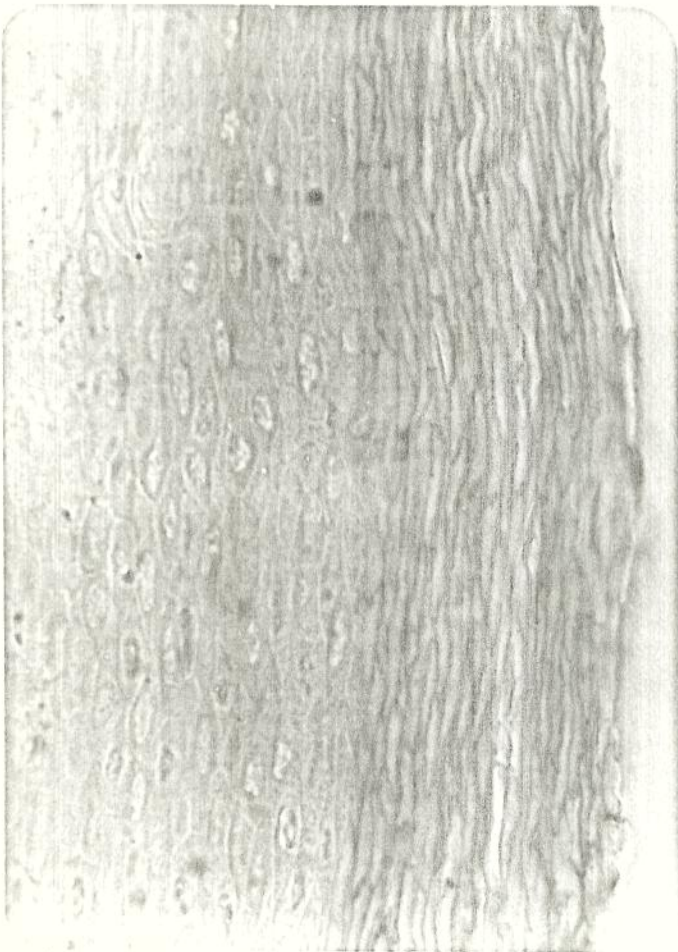
Porção profunda da epiderme: A positividade da reação aumenta nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e, principalmente, na camada granulosa, onde ocorrem pequenas granulações metacromáticas.

Porção superficial da epiderme: A membrana espessada da célula queratinizada é fortemente reativa; a reação é mais intensa do que em cortes histológicos não submetidos à hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético.

9



10



11



12

Figuras: 13, 14, 15 e 16

Figura 13: Pele de orelha de coelho; 1480X. Reação do ácido peracético-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético (4 min.), em corte histológico previamente submetido à metilação (Colesterol total).

Porção profunda da epiderme: Reação positiva no citoplasma dos queratinócitos dos estratos mais periféricos da camada espinhosa e, principalmente, nos da camada granulosa; nestes últimos, ocorrem granulações metacromáticas. Compartimento extracelular não reativo.

Porção superficial da epiderme: Membrana espessada da célula queratinizada fortemente reativa.

Figura 14: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease.

Porção profunda da epiderme: O material reativo se apresenta sob a forma de abundantes granulações grosseiras, situadas no citoplasma dos queratinócitos dos estratos médios e periféricos da camada espinhosa e dos situados na camada granulosa. Compartimento extracelular não reativo.

Porção superficial da epiderme: Membrana espessada da célula queratinizada reativa.

Figura 15: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, em corte histológico previamente submetido à metilação.

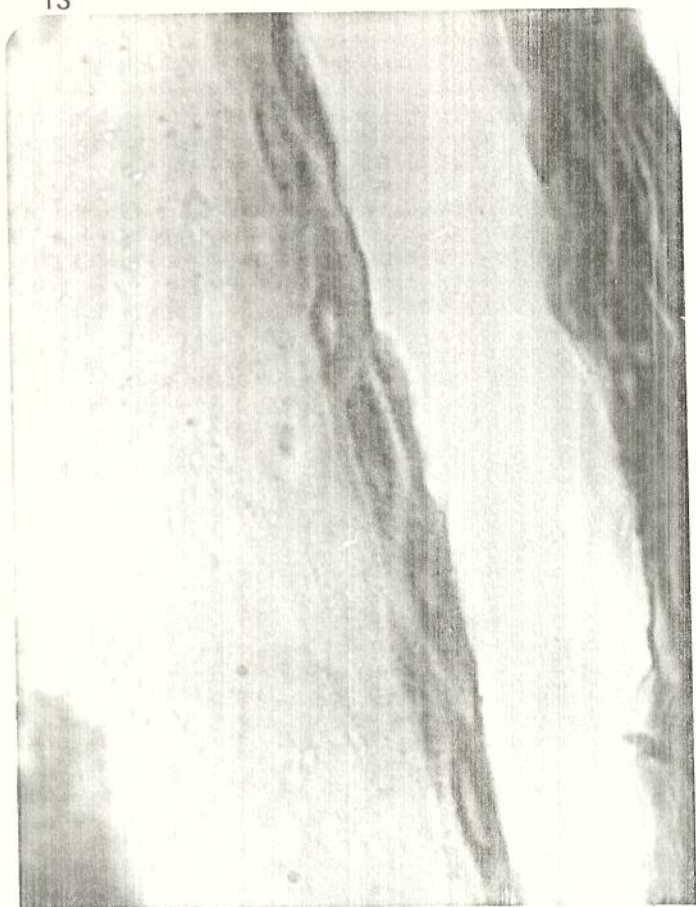
Porção profunda da epiderme: Nos queratinócitos dos estratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa, o citoplasma apresenta material reativo, não granular (ortocromático) e granular (metacromático); as granulações são finas e mais abundantes nos queratinócitos da camada granulosa. Compartimento extracelular não reativo.

Porção superficial da epiderme: Membrana espessada da célula queratinizada reativa.

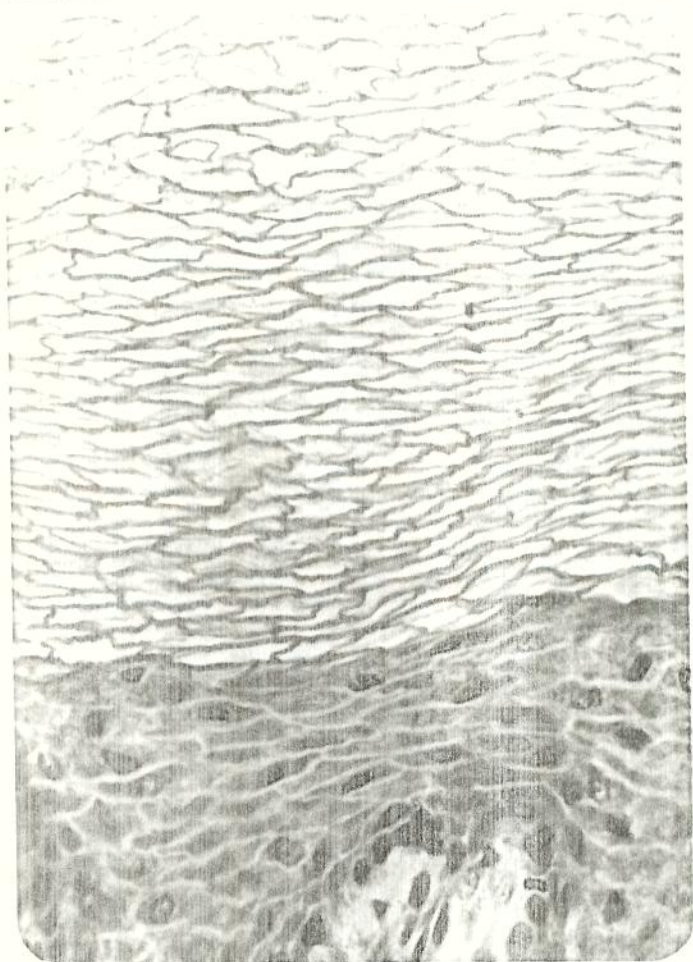
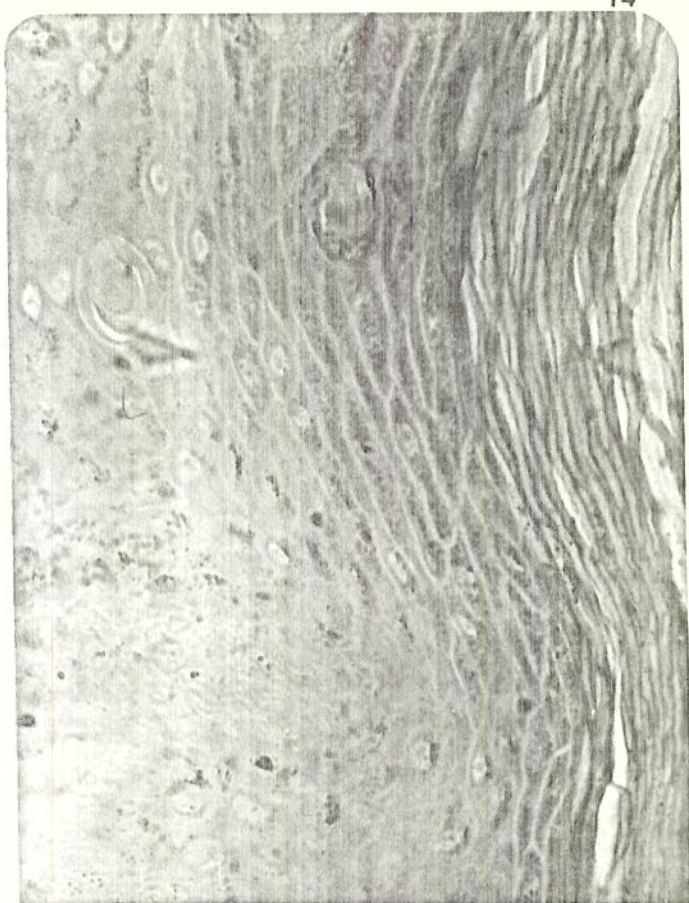
Figura 16: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do permanganato alcalino-Schiff, em corte histológico previamente tratado pela 2,4-dinitrofenil-hidrazina.

Porção superficial da epiderme: A membrana espessada da célula queratinizada reage mais intensamente do que o citoplasma; a reatividade do citoplasma decorre da menor especificidade desta reação.

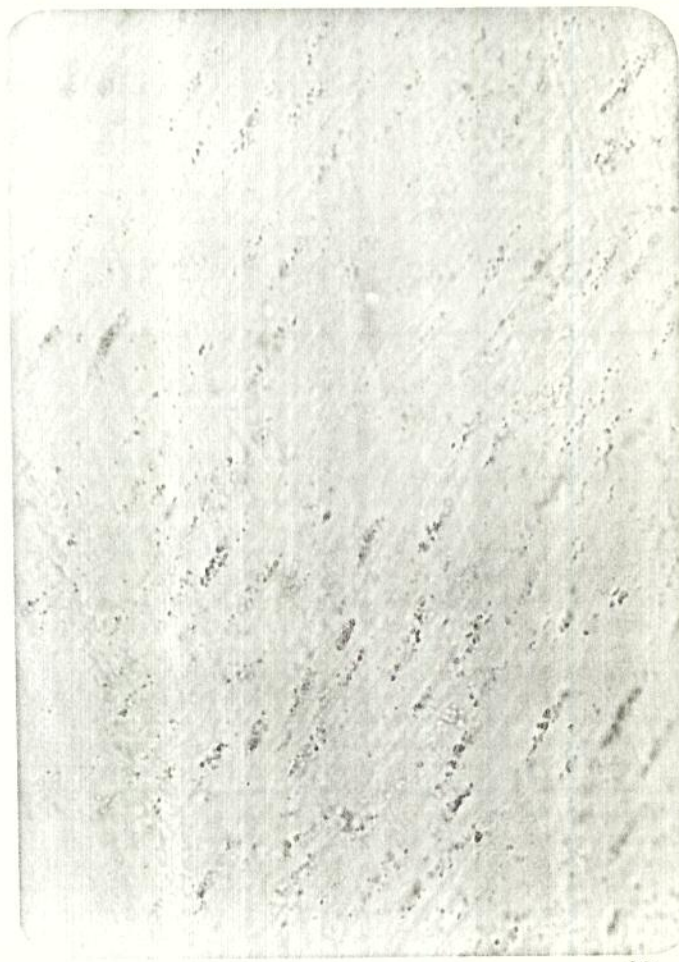
13



14



15



16

Figuras: 17, 18, 19 e 20

Figura 17: Pele de coxim plantar de cão; 370X. Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético (4 min.), em corte histológico previamente submetido à metilação.

Porção profunda da epiderme: O citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa apresenta-se reativo (ortocromático). Presença de material reativo, levemente metacromático, no espaço intercelular.

Porção superficial da epiderme: Reatividade da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 18: Pele de coxim plantar de coelho; 590X. Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo ácido sulfúrico-ácido acético (10 min.), em corte histológico previamente submetido à metilação.

Porção profunda da epiderme: O aumento do tempo de tratamento pelo ácido sulfúrico-ácido acético determina extração parcial do material reativo do citoplasma dos queratinócitos, ao mesmo tempo que aumenta a reatividade do espaço intercelular.

Porção superficial da epiderme: Reatividade da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 19: Pele de focinho de cão; 1480X. Reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease.

Porção profunda da epiderme: Material reativo de aspecto granular, às vezes metacromático, no citoplasma dos queratinócitos das camadas granulosa e espinhosa.

Figura 20: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação do ácido perfrômico-azul de toluidina, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease.

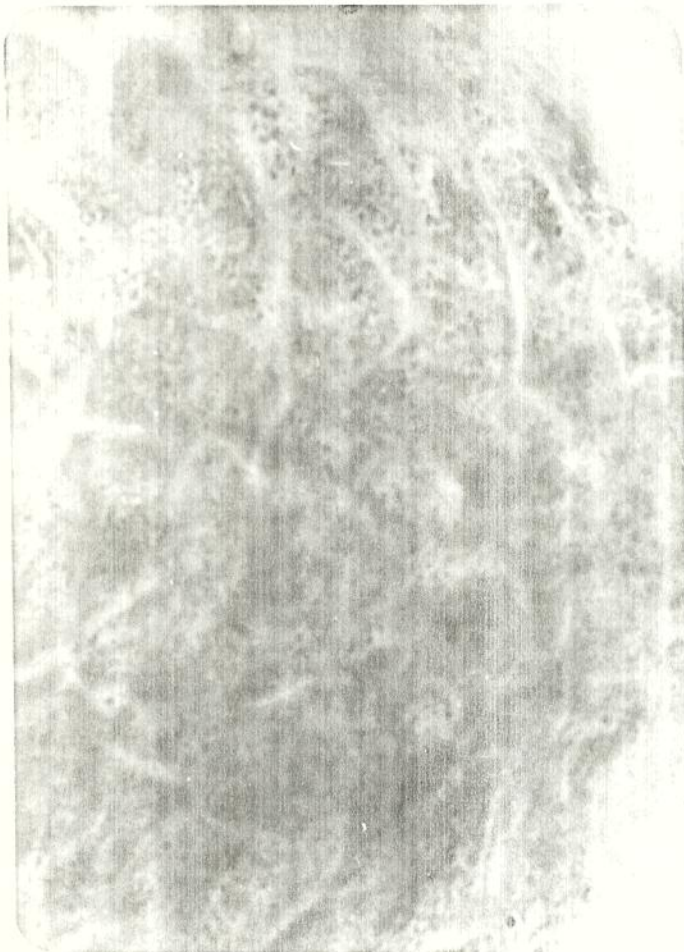
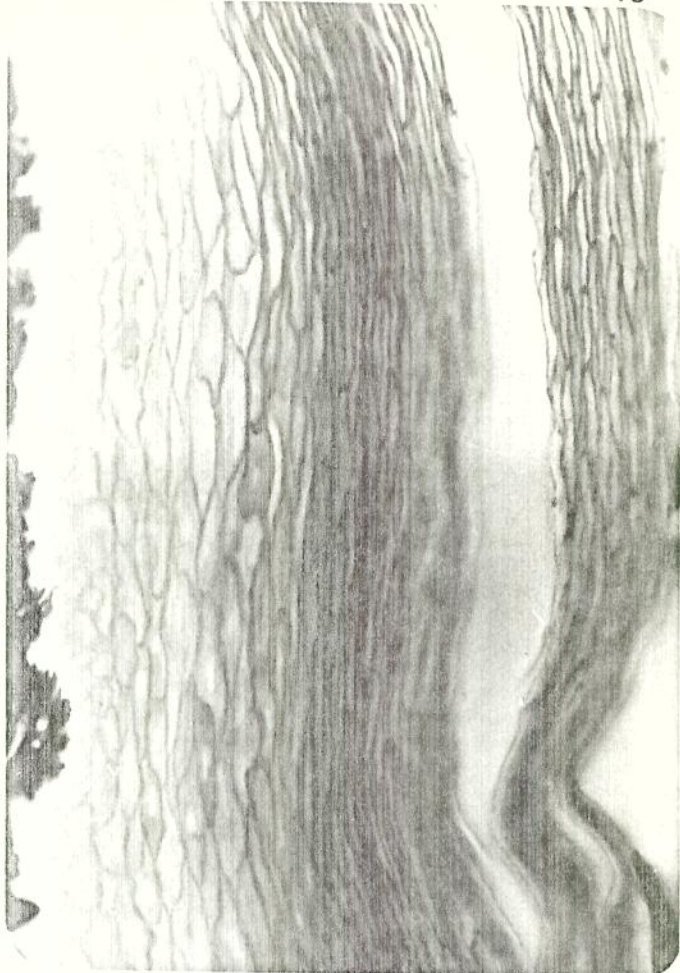
Porção profunda da epiderme: Tanto os queratinócitos quanto o compartimento extracelular não apresentam reatividade (exceto ao redor do duto excretor de glândula sudorípara; seta).

Porção superficial da epiderme: Forte reatividade da membrana espessada da célula queratinizada.

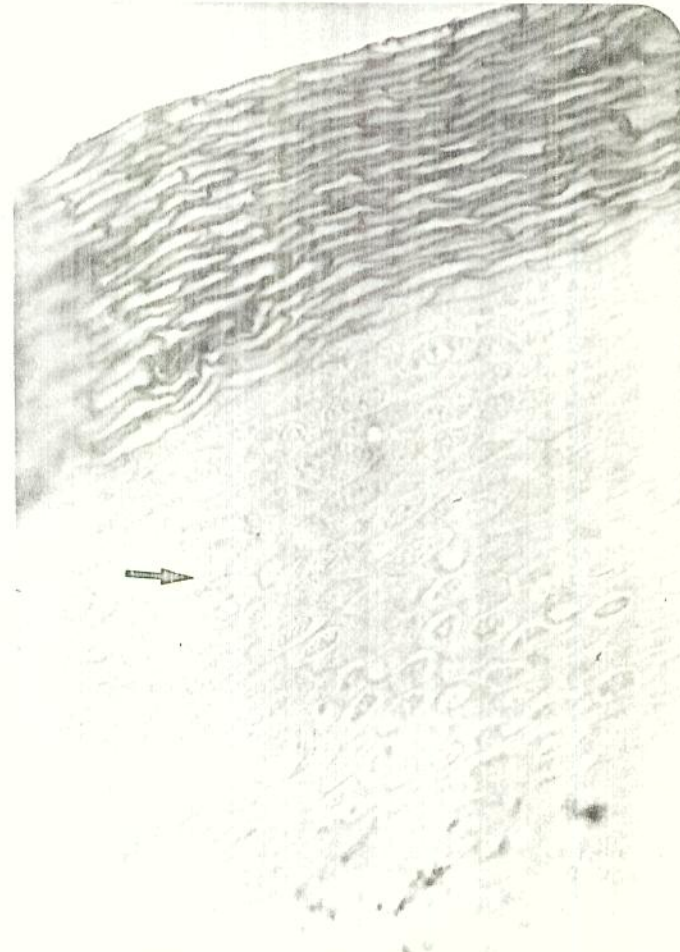
17



18



19



20

Figuras: 21, 22, 23 e 24

Figura 21: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, em corte histológico previamente submetido à metilação.

Porção superficial da epiderme: A membrana espessada da célula queratinizada se apresenta fortemente reativa.

Figura 22: Pele de focinho de cão; 590X. Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease.

Porção profunda da epiderme: Presença de material reativo no compartimento extracelular (metacromático).

Figura 23: Pele de focinho de cão; 1230X. Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em corte histológico previamente tratado pela ribonuclease.

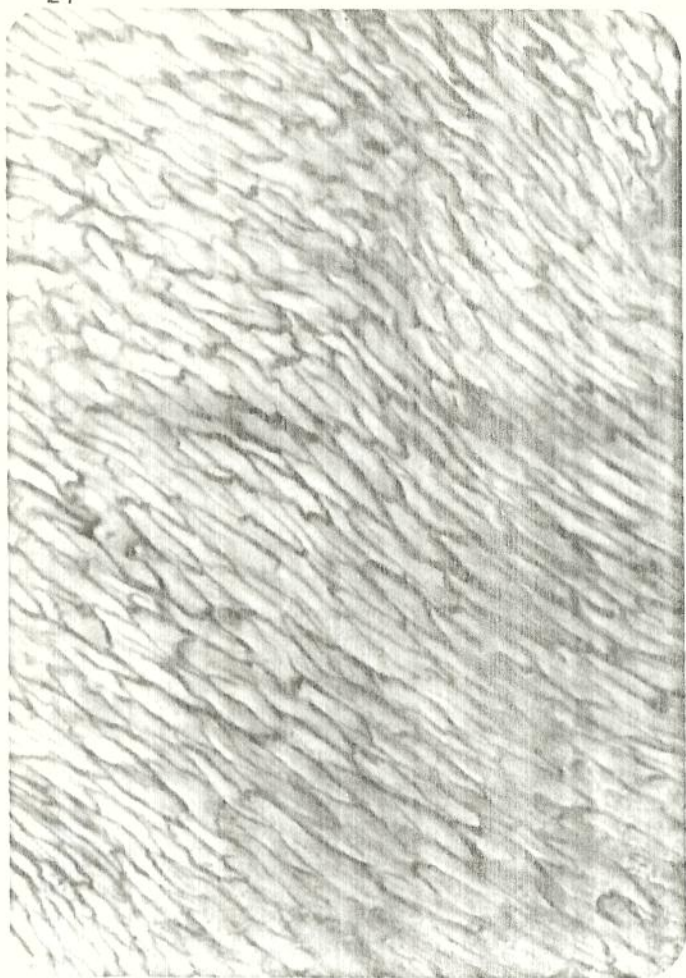
Porção profunda da epiderme: O material reativo do espaço intercelular se apresenta com aspecto em paliçada, por se interpor às espinhas de união. O núcleo dos queratinócitos apresenta-se corado (ortocromático).

Figura 24: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Reação do ácido perfórmico-azul de toluidina, após hidrólise pelo peridrol-amônia, em corte histológico previamente submetido à metilação.

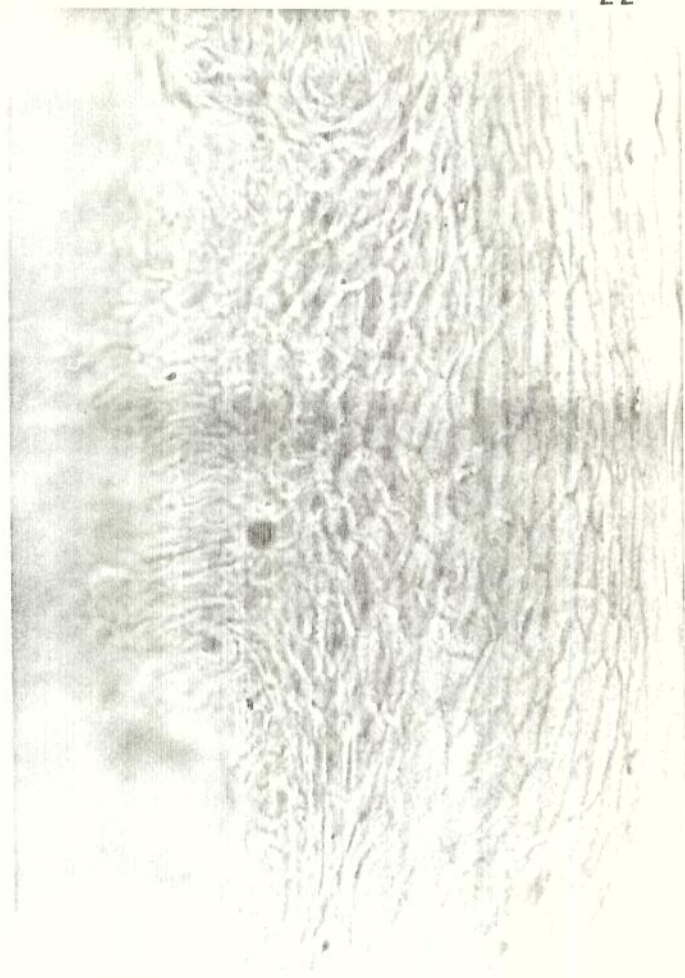
Porção profunda da epiderme: A metilação extrai o material reativo do espaço intercelular.

Porção superficial da epiderme: O material reativo da membrana espessada da célula queratinizada não é extraído.

21



22



23



24

Figuras: 25, 26, 27 e 28

Figura 25: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Reação do ferricianeto férrico, em pele fixada em formalina-cálcio.

Porção profunda da epiderme: Reatividade mais fraca que a da porção superficial; presença de faixa mais reativa correspondente à camada granulosa.

Porção superficial da epiderme: As células queratinizadas coram-se intensamente, com exceção das situadas na camada lúcida que não se coram.

Figura 26: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do ferricianeto férrico, em pele fixada em formalina-cálcio.

Porção profunda da epiderme: A membrana plasmática e o espaço intercelular coram-se mais fortemente do que o citoplasma dos queratinócitos.

Porção superficial da epiderme: O citoplasma da célula queratinizada cora-se mais fortemente que a membrana espessada. A camada lúcida não se apresenta corada.

Figura 27: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Reação do ferricianeto férrico, em pele fixada em formalina-bicloreto de mercúrio.

Porção profunda da epiderme: A fixação pela formalina-bicloreto de mercúrio, aparentemente, não determina diminuição da reatividade dos queratinócitos.

Porção superficial da epiderme: A camada lúcida cora-se como a camada córnea, a qual, contudo, apresenta a reatividade do citoplasma da célula queratinizada bastante diminuída, em comparação com corte histológico de pele fixada em formalina-cálcio.

Figura 28: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação do ferricianeto férrico, em pele fixada em formalina-cálcio; o corte histológico foi previamente submetido à hidrólise pelo hidróxido de potássio (20 min.).

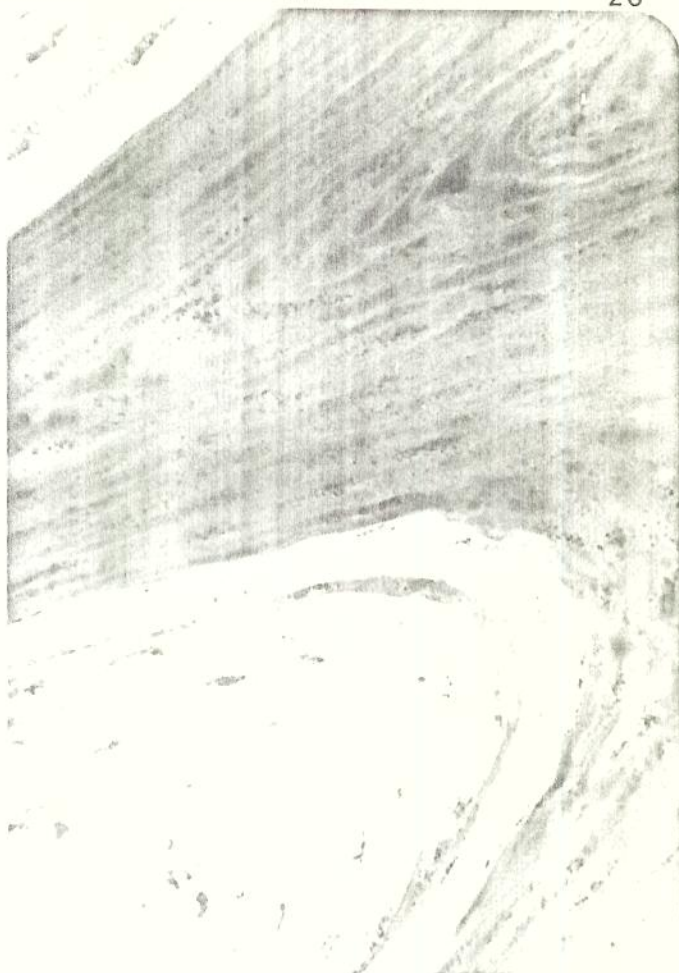
Porção profunda da epiderme: Aumento da reatividade do citoplasma dos queratinócitos; presença de grânulos reativos nos queratinócitos dos estratos médios e periféricos da camada espinhosa e, principalmente, nos da camada granulosa. Os grânulos reativos correspondem aos que se coram com a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina (Figura 14). Compartimento extracelular pouco reativo.

Porção superficial da epiderme: O tratamento pelo hidróxido de potássio, aparentemente, não altera a reatividade da célula queratinizada.

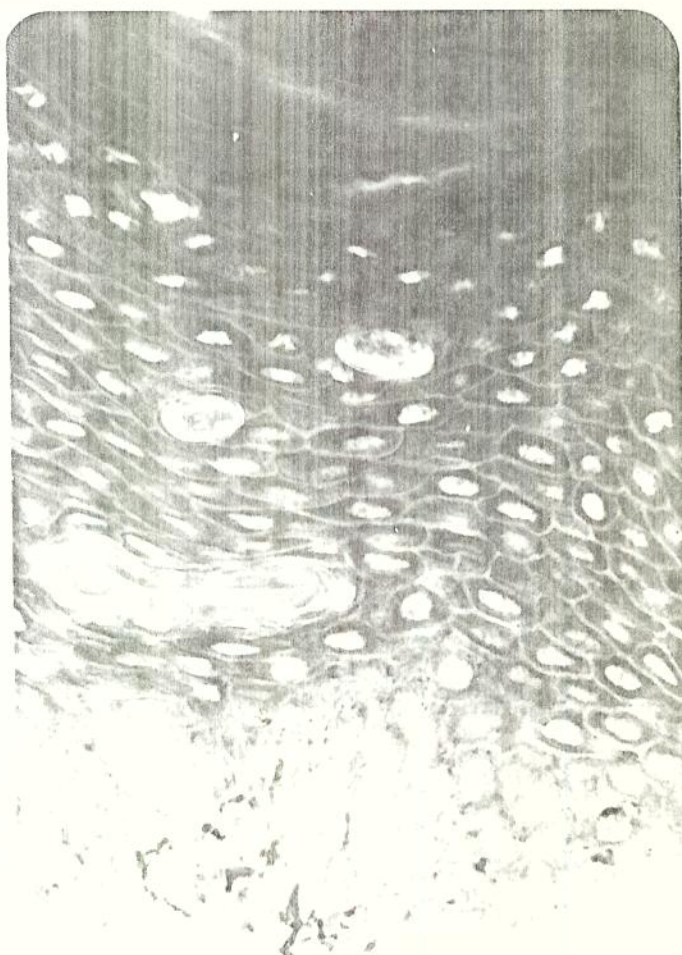
25



26



27

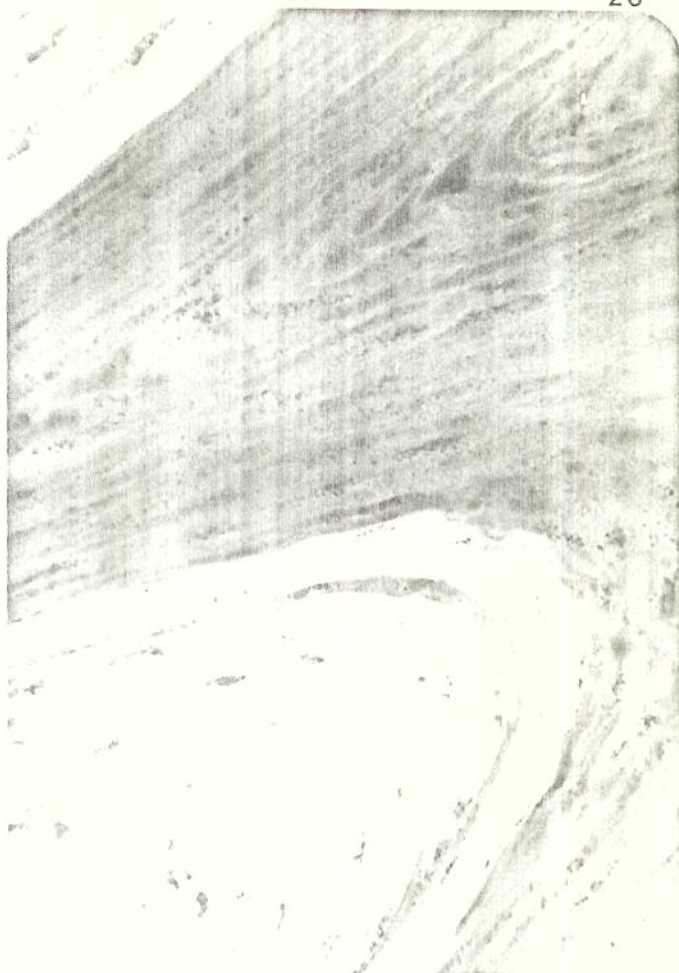


28

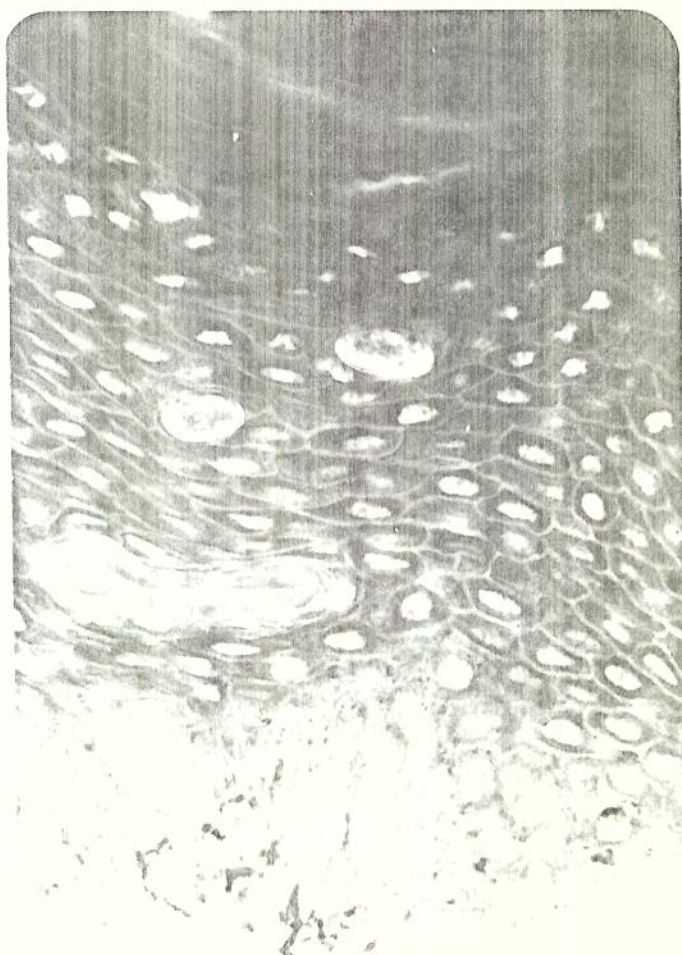
25



26



27



28

Figuras: 29, 30, 31 e 32

Figura 29: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do ferricianeto fêrrico, após tratamento pelo ácido perfôrmico, em corte histológico de pele fixada em formalina-cálcio.

Porção profunda da epiderme: Aumento da intensidade da reatividade do citoplasma dos queratinócitos, especialmente dos situados na camada granulosa.

Porção superficial da epiderme: Intensa diminuição da reatividade do citoplasma da célula queratinizada; a membrana espessada, ao contrário, apresenta-se bem reativa. Na região correspondente à camada lúcida o citoplasma da célula apresenta discreta reatividade.

Figura 30: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do ácido periódico-reativo de Schiff (PAS).

Porção profunda da epiderme: Discreta reatividade do citoplasma dos queratinócitos; o compartimento extracelular apresenta substância reativa, nos extratos médios e periféricos da camada espinhosa; a reatividade do compartimento extracelular aumenta em direção à camada granulosa.

Porção superficial da epiderme: A membrana espessada da célula queratinizada é fortemente reativa, ao contrário do citoplasma que é fracamente reativo ou não reage.

Figura 31: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação do ácido periódico-reativo de Schiff (PAS), após hidrólise pelo hidróxido de potássio (45 min.).

Porção profunda da epiderme: Intensa reatividade do compartimento extracelular.

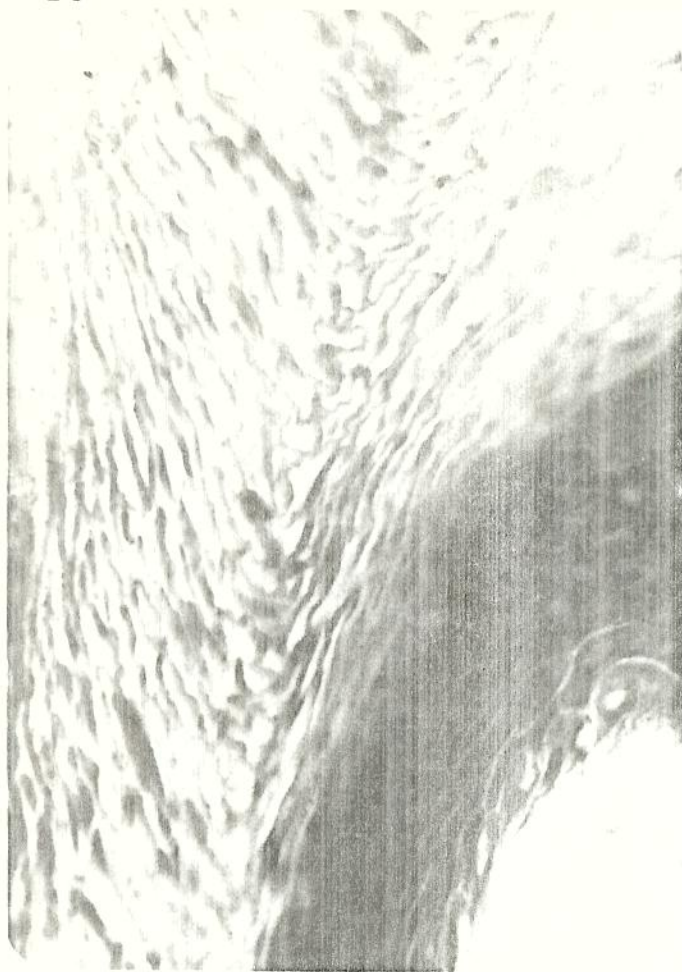
Porção superficial da epiderme: Diminuição da intensidade da reação da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 32: Pele de coxim plantar de cão; 148X. Reação para íon sulfato.

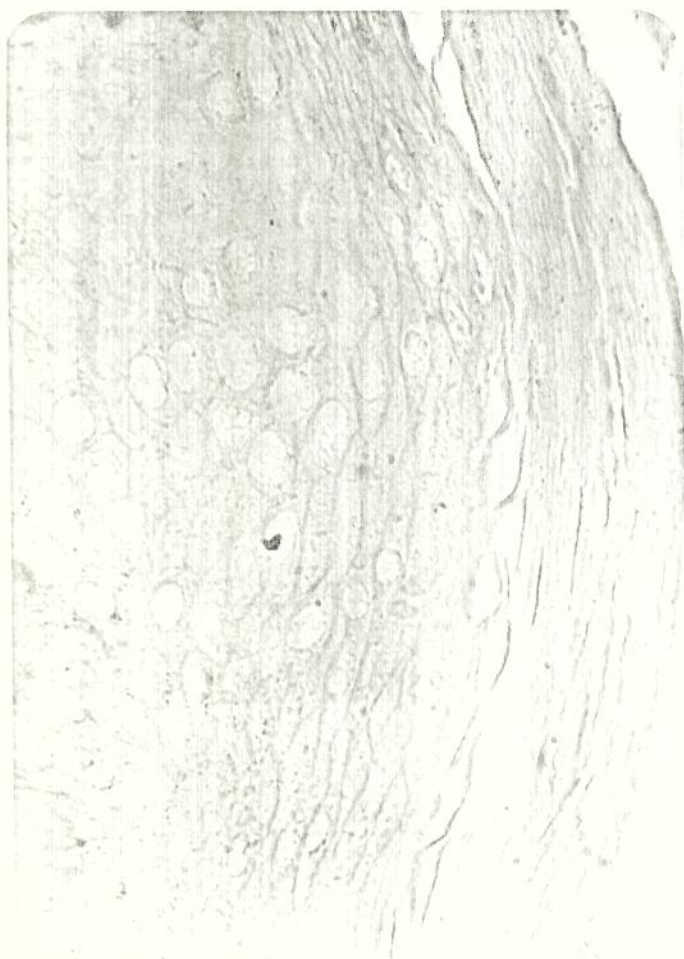
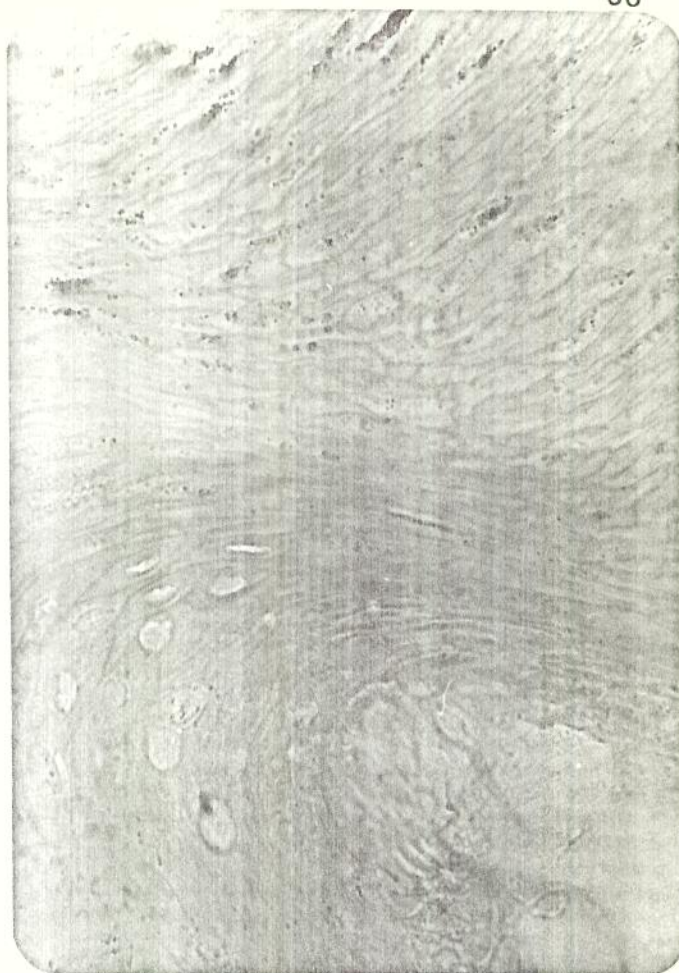
Porção profunda da epiderme: A reação é fortemente positiva no citoplasma dos queratinócitos da camada basal e nos extratos mais profundos da camada espinhosa, atenuando-se bruscamente nos extratos mais periféricos e na camada granulosa.

Porção superficial da epiderme: A reação é positiva apenas em algumas áreas situadas mais internamente na camada córnea.

29



30



31



32

Figuras: 33, 34, 35, 36 e 37

Figura 33: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação da aloxana-Schiff.

Porção profunda da epiderme: Discreta reatividade do citoplasma dos queratinócitos.

Porção superficial da epiderme: A reatividade do citoplasma e da membrana espessada da célula queratinizada é pouco mais intensa que a da porção profunda.

Figura 34: Pele de coxim plantar de gambá; 590X. Reação da aloxana-Schiff, após tratamento pelo ácido perfômico.

Porção profunda da epiderme: O pré-tratamento pelo ácido perfômico intensifica a reatividade do citoplasma dos queratinócitos, principalmente dos situados nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa, onde ocorrem granulações grosseiras reativas (efeito demascarante). Estas granulações são comparáveis às que contêm vitamina D (Figura 14).

Porção superficial da epiderme: Aumento da reatividade tanto do citoplasma quanto da membrana espessada da célula queratinizada.

Figura 35: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação da 2,2'-di-hidroxi-6,6'-dinaftil-disulfeto (DDD).

Porção profunda da epiderme: Reação discretamente positiva no citoplasma dos queratinócitos.

Porção superficial da epiderme: Intensa reatividade da região central da célula queratinizada.

Figura 36: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do DDD, após tratamento pelo tioglicolato de sódio.

Porção profunda da epiderme: Intensificação da reatividade do citoplasma dos queratinócitos e presença de material reativo no espaço intercelular, principalmente nos extratos mais periféricos.

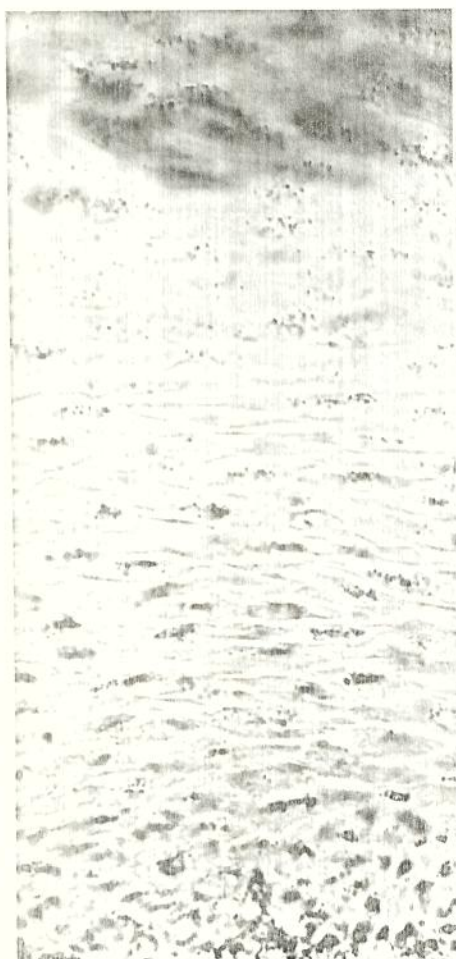
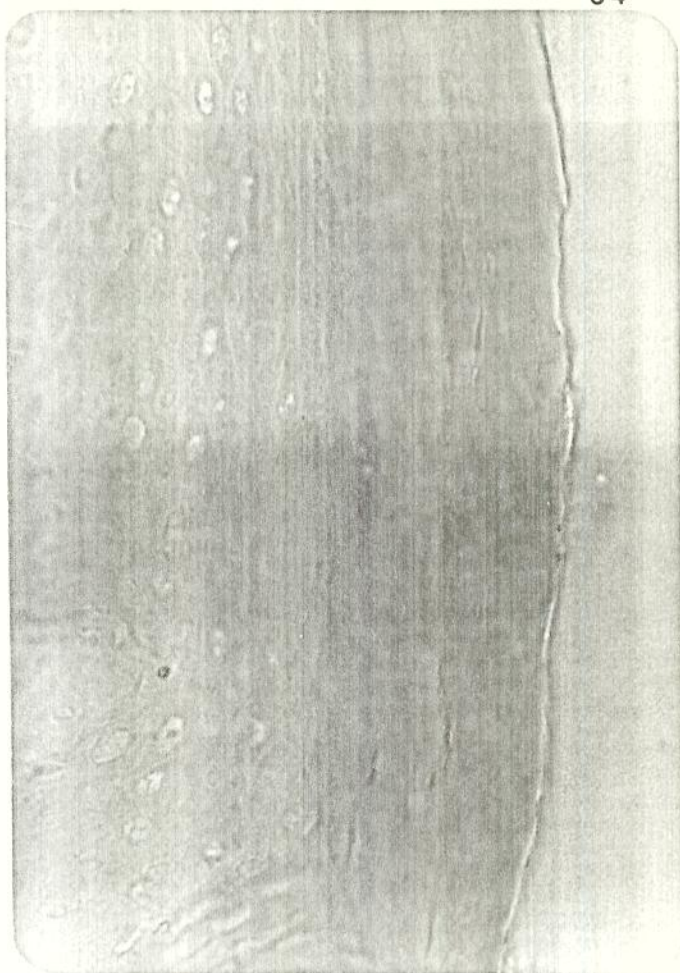
Figura 37: Pele de coxim plantar de cão; 590X. Reação do DDD, após tratamento pelo tioglicolato de sódio.

Porção superficial da epiderme: A membrana espessada da célula queratinizada apresenta-se reativa. O citoplasma da célula queratinizada é, também, reativo, tanto na sua região central quanto na cortical.

33



34



35



36



37

DISCUSSÃO

As técnicas histoquímicas, empregadas no presente trabalho, permitem a detecção de lípidos em tecidos não submetidos à ação de solventes orgânicos, excluindo, portanto, os inconvenientes decorrentes da ação extrativa desses solventes. Estas técnicas oferecem, além disso, a vantagem da localização topográfica dos lípidos no interior da epiderme, o que não ocorre com as técnicas bioquímicas; por estes motivos, foram consideradas adequadas para a análise das modificações que se processam durante a evolução da queratinização epidérmica e para correlacionar a "queratina" com os lípidos intraepidérmicos.

Algumas considerações gerais devem ser feitas, preliminarmente, a respeito das modificações sofridas pelos lípidos durante a diferenciação celular e a queratinização epidérmica. As variações quantitativas dos lípidos, ocorridas durante o processo de queratinização epidérmica e estimadas através de comparações, atingem nível diferente nas diversas categorias de lípidos; por este motivo, os resultados obtidos para os diversos tipos de lípidos serão discutidos separadamente, procurando-se correlacionar as variações encontradas com as principais etapas do processo de queratinização; em uma segunda abordagem, as variações dos diversos tipos de lípidos serão comparadas entre si. Será dado maior ênfase às variações apresentadas pelos lípidos situados nas camadas epidérmicas mais diretamente relacionadas com a formação da célula queratinizada; assim sendo, serão destacados os resultados obtidos na camada granulosa, onde ocorrem bruscas modificações celulares e na camada córnea, onde a célula apresenta-se plenamente queratinizada. Na camada córnea serão considerados a célula queratinizada e o espaço intercelular. Na célula queratinizada, por sua vez, serão discutidos o citoplasma (constituído por fibrilas de "queratina" e matriz interfilamentosa) e a membrana espessada. As técnicas empregadas, no presente trabalho, no entanto,

não permitem estabelecer distinção entre a membrana espessada e o espaço intercelular; devido a este motivo, ambos serão considerados em conjunto, sob a denominação de membrana espessada da célula queratinizada.

Na porção profunda da epiderme, serão considerados, separadamente, os queratinócitos e o compartimento extracelular; este último compreende os espaços intercelulares e suas delimitações, efetuadas pela membrana plasmática dos queratinócitos; estes dois componentes serão considerados em conjunto, devido às dificuldades em se determinar, com precisão, seus limites; não obstante, muitas vezes esses dois componentes foram analisados separadamente, quando as condições permitiam melhor individualização.

1. - Lípides epidérmicos demonstrados pelo negro de Sudan

A detecção histoquímica de lípidos, através do negro de Sudan, nas condições empregadas no presente trabalho, revela material sudanófilo agranular, no citoplasma e na membrana plasmática dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, especialmente na camada granulosa, onde ocorrem, também, pequenas granulações. Os lípidos, assim demonstrados, não se apresentam livres, pois não são extraídos pelo tratamento com metanol-clorofórmio, em cortes de pele fixada em formalina-cálcio. Há evidências de que se encontrem sob a forma de complexos, provavelmente com proteínas, pois a hidrólise ácida (metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; ácido perfórmico) ou alcalina (hidróxido de potássio), promove a extração parcial dos lípidos. Por outro lado, o material sudanófilo não se apresenta sob a forma de gotículas, como ocorre na maioria das vezes com os lípidos celulares livres, corroborando com essa interpretação.

Há evidências de que o material sudanófilo, presente nos queratinócitos da porção profunda da epiderme, seja constituído por complexos lipoprotéicos e integre algumas estruturas celulares, principalmente as citomembranas; faz exceção parte do material contido nos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa, nos quais, além disso, é maior a sudanofilia. Como os lípidos dos queratinócitos dessas camadas não apresentam as características dos lípidos livres, não devem ser interpretados como simples deri

vados da degeneração de orgânulos ou de estruturas membranosas celulares (lipofanerose), mas sim como produtos complexos, cuja síntese pode, eventualmente, estar relacionada com o processo de queratinização epidérmica. Esta hipótese será discutida quando forem analisadas as diversas categorias de lípidos responsáveis pela sudanofilia das camadas espinhosa e granulosa.

Através do emprego do ácido 8-anilina-1-naftaleno sulfônico, em tecidos não fixados, ELIAS *et alii*. (1977b) demonstraram, através de fluorescência, lípidos difusamente dispostos no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa. Nossos resultados confirmam a presença de lípidos, através de sudanofilia difusa, no citoplasma dessas células, revelando, além disso, a existência de granulações onde o lípido parece estar associado à proteínas, conforme sugere o tratamento com solventes de lípidos.

Nos queratinócitos da camada basal da epiderme do rato (PARAT, 1928) e da epiderme humana (NICOLAU, 1911) foram assinaladas gotículas de lípidos; porém, estas gotículas não foram encontradas nos queratinócitos das camadas mais periféricas. Foi verificado, também, em várias espécies de mamíferos, que as células epidérmicas das camadas basal e espinhosa apresentam gotículas de lípidos perinucleares, enquanto que as células da camada granulosa raramente apresentam lípidos demonstráveis através da sudanofilia (MONTAGNA, 1950). Nossos resultados não revelam a presença de gotículas sudanófilas, não concordando, totalmente, com os encontrados por esses autores; contudo, as discordâncias talvez advenham da fixação da epiderme pela formalina contendo cloreto de cálcio, que preserva melhor os lípidos e impede o aparecimento de gotículas.

Na porção superficial da epiderme, a coloração pelo negro de Sudan revela, na membrana espessada das células queratinizadas, a presença de material sudanófilo que parece formar complexos com prováveis proteínas, pois resiste ao tratamento pelo metanol-clorofórmio e pelo ácido perfórmico. Este último resultado sugere que a associação lípido-proteína, na membrana espessada, seja mais estável que a dos lípidos presentes nos queratinócitos da camada granulosa, os quais são removidos pelo ácido perfórmico.

O material sudanófilo da membrana espessada, contudo, é extraído quando se efetua o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou pelo hidróxido de potássio, revelando

que tanto a hidrólise ácida quanto a alcalina determinam ruptura dos complexos. Deve ser destacado que a membrana espessada, aparentemente, não apresenta alterações morfológicas, ao microscópio eletrônico, quando submetida à ação de solução de hidróxido de sódio 0,1 N (FARBMAN, 1966). Todavia, a solução de hidróxido de potássio 0,1 N, nas condições por nós empregadas, remove o material sudanófilo, o que sugere que a porção proteica da membrana espessada tenha maior significado na manutenção da integridade morfológica da membrana, mesmo quando analisada através da microscopia eletrônica. Esta interpretação concorda com a observação de WOLFF & SCHREINER (1971), os quais verificaram, ao microscópio eletrônico, que a membrana espessada é lisada por proteases.

A presença de lípidos, na membrana espessada das células queratinizadas, foi assinalada, também, através da análise química efetuada em extratos de membranas previamente isoladas (MATOLTSY & PARAKKAL, 1967); os resultados da análise revelaram 66,0% de proteínas, 33,0% de lípidos e 1,0% de glúcidos.

Material sudanófilo, na camada córnea, foi anteriormente assinalado em diversas espécies de mamíferos, inclusive no homem (MONTAGNA *et alii.*, 1948; MONTAGNA & HAMILTON, 1949) e interpretado como sendo constituído por lípidos neutros. Sua desvinculação da secreção sebácea foi admitida através da destruição experimental destas glândulas e da observação efetuada em pele de espécies animais (toninhas e golfinhos) desprovidas dessas glândulas (MONTAGNA & CHASE, 1950). Na epiderme das aves há abundante material sudanófilo nas células epidérmicas (PARAKKAL & MATOLTSY, 1968; MATOLTSY, 1969; FREINKEL, 1972 a,b), embora nesta classe de animais não ocorram glândulas sebáceas.

Nossos resultados confirmam a presença de material sudanófilo na camada córnea, embora revelem a presença de lípidos, não mascarados, apenas na membrana espessada das células queratinizadas, o que concorda com os resultados de ELIAS *et alii.* (1977b, 1979a). Estes autores, usando a técnica do ácido 8-anilina-1-naftaleno sulfônico verificaram, na camada córnea, que a membrana espessada das células queratinizadas apresentava forte fluorescência, indicadora da presença de lípidos, ao contrário do citoplasma que exibía fluorescência muito fraca. A fluorescência atingia, aparentemente, o espaço intercelular. Aliás, a maior parte dos lípidos da camada córnea está situada entre as células queratinizadas, conforme fora an

teriormente assinalado por BLANK (1953). Os resultados do presente trabalho não permitem distinguir a membrana espessada do espaço intercelular, o que impede discussão mais pormenorizada a este respeito.

No entanto, ELIAS *et alii*. (1979a) referem que os lípides das células queratinizadas são extraíveis por solventes, o que discorda dos nossos resultados. Deve ser salientado, todavia, que enquanto os resultados do presente trabalho foram obtidos em tecidos fixados em formalina-cálcio, os autores citados empregaram tecidos não fixados, nos quais o efeito dos solventes é muito mais intenso.

Por outro lado, através do emprego do *oil red O*, ELIAS *et alii*. (1979a) verificaram forte coloração da membrana espessada das células queratinizadas, mas ausência de coloração do citoplasma; interpretaram essa coloração como significando a presença de lípidos neutros, o que será discutido oportunamente.

Tanto os nossos resultados quanto os de outros autores, aqui discutidos, revelam que na camada córnea os lípidos estão situados na membrana espessada das células queratinizadas; o citoplasma destas células, entretanto, não parece apresentar, histoquimicamente, lípidos em quantidade detectável.

No entanto, a difração dos raios X revela que no citoplasma das células córneas existem lípidos (SWANBECK & THYRESSON, 1962; GOLDSMITH & BADEN, 1970), os quais envolveriam as fibrilas de "queratina". Além disso, MATOLTSY & BALSAMO (1955) mostraram, através de técnicas bioquímicas, a presença de lípidos nas células queratinizadas, lípidos estes situados na membrana espessada e na matriz interfilamentosa destas células. Também, com base em resultados bioquímicos, MATOLTSY (1958) enfatizou a presença de lípidos, na matriz interfilamentosa das células córneas, sugerindo sua relação com a "queratina", o que foi confirmado por SCHEUPLEIN & BLANK (1971).

O aparente paradoxo, proveniente da discordância assinalada, foi esclarecido pelos nossos resultados que demonstram a presença de lípidos mascarados no citoplasma das células córneas. Após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, material sudanófilo é demonstrado no citoplasma das células queratinizadas, ou seja, no local onde ocorre o característico "padrão de queratina". Este resultado constitui decorrência do efeito do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que

desmascara lípidos do citoplasma das células queratinizadas. De acordo com estes resultados, na porção superficial da epiderme há lípidos, tanto na membrana espessada quanto no citoplasma das células queratinizadas. Na membrana são demonstráveis independentemente de outros tratamentos, enquanto que no citoplasma o material sudanófilo só é evidenciável após desmascaramento. Uma vez que em ambos os locais os lípidos estão associados com proteínas, esta diferença de comportamento, provavelmente, se relacione com o grau de estabilidade dessa associação.

Deve ser assinalado que o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara lípidos, também, do citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e, principalmente, dos da granulosa. Estes resultados sugerem que o mascaramento dos lípidos, na epiderme, seja progressivo, iniciando-se antes da célula se tornar totalmente queratinizada; sugerem, também, relação entre os lípidos mascarados e a queratinização.

Os grânulos de material sudanófilo, que ocorrem depois do tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, nos queratinócitos mais periféricos da porção profunda da epiderme, devem ser discutidos quanto ao que foi interpretado como decorência de seu desmascaramento. Isto porque eles são bem evidenciados após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que extrai o restante do material sudanófilo do citoplasma dos queratinócitos desse local. No entanto, em ausência do tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, eles poderiam ser, também, sudanófilos, embora não distinguíveis do restante do material sudanófilo aí existente. Se isso ocorresse, esses grânulos não conteriam lípidos mascarados, mas sim lípidos resistentes ao tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e que, ulteriormente, se tornariam mascarados nas células queratinizadas. Embora haja dificuldade em se estabelecer qual a correta interpretação da sudanofilia que remanece após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, esses lípidos serão referidos sob a denominação de mascarados. Estes resultados sugerem, além disso, que os lípidos mascarados, da porção profunda da epiderme, estejam relacionados com os lípidos mascarados do citoplasma das células queratinizadas.

O tratamento pelo ácido perfórmico, também apresenta efeito desmascarante sobre lípidos situados no citoplasma das

células queratinizadas; todavia, os lípides assim desmascarados se apresentam sob forma de granulações sudanófilas e não de substância sudanófila difusa, conforme ocorre quando se efetua o desmascaramento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. Esta diferença sugere que as substâncias lipídicas, desmascaradas por esses dois tratamentos, não sejam idênticas. Por outro lado, após o tratamento prévio pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desaparece o material sudanófilo desmascarado pelo ácido perfórmico, sugerindo que ele foi extraído. Este comportamento indica, também, que este material sudanófilo é diferente do que é desmascarado pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, o qual não é extraído por este solvente.

Por outro lado, tanto os lípides da membrana espessada quanto os intracitoplásmicos, das células queratinizadas, são extraídos pelo tratamento com hidróxido de potássio, principalmente após o desmascaramento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

Convém salientar que é bem conhecida a impossibilidade de detecção histoquímica de lípides mascarados, ou seja, de lípidos ligados a outras substâncias, através das técnicas habituais; no que se refere aos lípidos ligados à proteínas, a detecção histoquímica torna-se possível após o tratamento por proteases ou por solventes de lípidos, os quais dissociam o lipídeo da proteína (CIACCIO, 1910; PARAT, 1928; KIRKMAN & SEVERINGHAUS, 1938a, b, c; HIRSCH, 1939; HOAGLAND *et alii.*, 1940; BLIX *et alii.*, 1941; BOURNE, 1942). No caso particular da epiderme, foi necessário, para o desmascaramento, o emprego de um solvente de lípidos, adicionado de ácido, ou de um ácido forte.

Nossos resultados indicam, contudo, que nem sempre a associação de lípidos com proteínas mascara a sudanofilia, pois os lípidos da membrana espessada, embora ligados à proteínas, são sudanófilos; sugerem, por outro lado, que o mascaramento decorra de uma associação mais complexa e mais íntima e que, por isso, apresente maior grau de estabilidade, exigindo, portanto, tratamento mais drástico para que a ligação seja rompida.

2 - Lípidos contendo colina presentes na epiderme

A metodologia empregada, no presente trabalho, permitiu demonstrar a presença de lípidos contendo colina na membrana

plasmática dos queratinócitos, das camadas mais internas da porção profunda da epiderme e no espaço intercelular desta porção; além disso, no citoplasma das células da camada granulosa, também, ocorrem lípidos contendo colina.

Após a ação do hidróxido de potássio, que tem efeito desmascarante, foi possível demonstrar, no interior do citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa, a presença de lípidos contendo colina associados com os tonofilamentos. Este tratamento determina, também, o aparecimento de material reativo, de aspecto granular, no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais internos da camada espinhosa. Convém destacar, contudo, que a técnica empregada demonstra a presença de colina ionizável; assim sendo, após a ação do hidróxido de potássio, não pode ser afastada a hipótese de estar sendo desmascarada colina de origem não lipídica. Contudo, a colina, seus sais e seus compostos não lipídicos, são hidrossolúveis, não sendo preservados em material fixado em formalina-bicloreto de mercúrio (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados); portanto, a colina detectável pela técnica histológica, por nós utilizada, provavelmente, é de natureza lipídica e assim foi por nós considerada.

Os lípidos contendo colina, relacionados com os tonofilamentos, não somente são desmascarados como remanecem após o tratamento pelo hidróxido de potássio, o que sugere estabilidade da ligação entre os lípidos e as proteínas dos tonofilamentos. Essa estabilidade, todavia, não resiste ao tratamento pelo ácido perfórmico, o qual extrai o material colina positivo, desmascarado pelo hidróxido de potássio, relacionado com os tonofilamentos.

Convém assinalar que o tratamento pelo hidróxido de potássio extrai a maior parte do material sudanófilo do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme; contudo, parte do material sudanófilo permanece no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa. É possível que o material sudanófilo remanecente seja constituído pelos lípidos contendo colina, desmascarados pelo tratamento com hidróxido de potássio.

Na porção superficial da epiderme, tanto a membrana espessa das células queratinizadas quanto o seu citoplasma apresentam lípidos contendo colina, uma vez que o tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara este tipo de lípidos, no citoplasma das células queratinizadas, da mesma ma

neira que ocorre com o material sudanófilo mascarado. A reatividade da membrana espessada é mais intensa nos extratos mais periféricos da camada córnea, ao contrário da reatividade do citoplasma que é maior nos extratos mais internos, desta camada, sugerindo que os lípidos contendo colina, inicialmente, situem-se no citoplasma das células queratinizadas e, posteriormente, se depositem na face interna da membrana espessada.

Contudo, não pode deixar de ser considerada a hipótese segundo a qual a maior reatividade do citoplasma das células queratinizadas, para a técnica que revela lípidos contendo colina, nos extratos mais internos da camada córnea, seja consequência do menor grau de bloqueio desses lípidos; segundo esta hipótese, o bloqueio da reatividade seria progressivamente tanto mais intenso quanto mais periférico o extrato da camada córnea. Esta hipótese, não é favorável à deposição de lípidos contendo colina, do citoplasma das células queratinizadas, na face interna da membrana espessada.

A presença de lípidos contendo colina, na epiderme e em outros epitélios queratinizados, de várias espécies de mamíferos, fora assinalada por HADLER & SILVEIRA (1976). Esses resultados foram confirmados no presente trabalho.

Os lípidos contendo colina, da epiderme, se apresentam formando complexos, provavelmente com proteínas, uma vez que não são extraídos pelo metanol-clorofórmio, são parcialmente extraídos pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e pela hidrólise com hidróxido de potássio, e quase totalmente extraídos pelo tratamento com ácido perfórmico. Convém salientar que o material sudanófilo, da membrana espessada das células queratinizadas, aparentemente, não é extraído pelo tratamento com ácido perfórmico. Este resultado indica que o material sudanófilo da membrana espessada é constituído por diversas substâncias de natureza lipídica, algumas extraíveis pelo ácido perfórmico (lípidos contendo colina) e outras não (parte do material sudanófilo).

OTTENSTEIN *et alii*. (1952) e MONTAGNA (1962) sugeriram que fosfolípidos contendo colina, da epiderme, se apresentavam ligados à "queratina" através da colina. Nossos resultados revelam que, após a ação desmascarante do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, aparece colina reativa em locais onde a reação era negativa em ausência deste tratamento; este resultado sugere que a colina se apresentava, inicialmente, bloqueada

quimicamente, bloqueio este que poderia resultar de sua ligação com a "queratina"; sugere, também, que os lípides contendo colina, do citoplasma das células queratinizadas, provenham das granulações colina positivas, situadas no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, onde não se apresentam mascarados.

Na epiderme humana, através de métodos biológicos, foi demonstrada a presença de colina, 60,0 a 80,0% da qual se apresentava livre; admitiu-se que a colina proviria da hidrólise de fosfolípidos e que essa hidrólise ocorreria na camada córnea, uma vez que, nesta camada, o conteúdo de colina era vinte vezes menor do que no restante da epiderme (SNIDER *et alii.*, 1949). A existência de hidrólise de fosfolípidos contendo colina, com liberação e remoção da colina, é sugerida pelos nossos resultados, que revelam menor reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, para a reação que demonstra lípidos contendo colina, nos extratos mais periféricos da camada córnea.

Dentre os lípidos contendo colina, presentes na epiderme, devem ser consideradas as fosfatidilcolinas e as esfingomielinas. Ambas contêm, além de colina, o íon fosfato. Assim sendo, antes de se discutir mais pormenorizadamente os resultados referentes aos lípidos contendo colina, eles devem ser correlacionados com os resultados obtidos com a reação para demonstrar, histoquimicamente, o íon fosfato.

3 - Lípidos contendo íon fosfato presentes na epiderme

Os resultados fornecidos pela técnica que demonstra o íon fosfato, em cortes histológicos previamente tratados pela ribonuclease, foram interpretados como decorrentes da presença de lípidos dotados deste íon.

Nos mesmos locais da epiderme em que foram assinalados lípidos contendo colina foi, também, revelada a presença do íon fosfato, após o pré-tratamento pela ribonuclease, sugerindo que o fosfato e a colina integrem as mesmas substâncias (fosfolípidos contendo colina). Os resultados do presente trabalho sugerem que fosfolípidos contendo colina estão presentes na membrana plasmática dos queratinócitos e no espaço intercelular da porção profunda da epiderme, assim como na membrana espessada das células queratinizadas. Neste último local, no entanto, a

reação para o íon fosfato é muito mais fraca, em comparação com a reação para colina, sugerindo a possibilidade de que nem todo lípide contendo colina, aí situado, contenha fosfato. Todavia, não deve ser esquecido que a reação histoquímica para colina, embora quase específica, fornece resultados fracamente positivos com a vitamina D (HADLER & SILVEIRA, 1978). Esta vitamina é encontrada na membrana espessada das células queratinizadas, podendo ser parcialmente responsável pela maior intensidade da reação para lípides contendo colina, verificada neste local. Contudo, quando se efetua o tratamento desmascarante pelo peridrol-amônia, a reação para o íon fosfato torna-se mais intensa na membrana espessada das células queratinizadas, indicando que a fraca reatividade depende, também, do mascaramento desse íon.

Por outro lado, no citoplasma das células queratinizadas, embora tenha sido assinalada a presença de lípides contendo colina, após desmascaramento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, não foi possível demonstrar, histoquimicamente, o íon fosfato nesse local, em cortes histológicos submetidos ao desmascaramento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. Entretanto, quando o desmascaramento é feito através do tratamento com peridrol-amônia, o íon fosfato passa a ser, histoquimicamente, detectável no citoplasma das células queratinizadas. Este resultado, além de indicar a presença de colina e íon fosfato no interior das células queratinizadas, sugere que o íon fosfato apresente ligação mais estável, pois há necessidade de tratamento mais severo para ser desmascarado. Assim sendo, há evidências da presença de fosfolípides contendo colina, também, no citoplasma das células queratinizadas, os quais, todavia, se apresentam mascarados.

No citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, a hidrólise com hidróxido de potássio desmascara colina, associada com os tonofilamentos, tornando-a histoquimicamente detectável. Não obstante, após o tratamento com hidróxido de potássio, não há desmascaramento do íon fosfato nos lípides associados com os tonofilamentos. Porém, quando se efetua o desmascaramento com peridrol-amônia aparece material fosfato positivo no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa. Este material, embora não apresente a disposição filamentosa dos tonofilamentos, poderia estar a eles associado; a ausência da estrutura filamentosa decorreria de artefato cau-

sado pela difusão do material reativo, por efeito do desmascarante. Há, portanto, evidências de que os tonofilamentos estão associados com substância, provavelmente lipídica, dotada de colina e fosfato. Esta substância parece intimamente associada ao material protéico dos tonofilamentos, a julgar pelo mascaramento tanto da colina quanto do íon fosfato, o qual pode decorrer desta associação.

Estes resultados sugerem a presença de fosfolípides contendo colina, no citoplasma das células queratinizadas, assim como no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa; neste último local, se apresentam relacionados com os tonofilamentos. A semelhança quanto às propriedades e quanto aos tratamentos necessários para o desmascaramento dos fosfolípides contendo colina, situados em ambos os locais, sugere similaridade entre os lípides precocemente associados com a pré-queratina dos tonofilamentos e os localizados no citoplasma das células queratizadas e relacionados com a "queratina"; permite, ainda, supor que os fosfolípides, associados com os tonofilamentos, persistam em associação com proteínas fibrilares contidas no interior das células queratinizadas, participando do processo de queratinização epidérmica.

Aliás, algumas transformações sofridas pelas proteínas fibrosas, durante a diferenciação das células epidérmicas, foram assinaladas desde LITVAC (1940), o qual mostrou, em culturas de células epidérmicas, que nos primeiros dias as proteínas fibrosas eram lisadas tanto pela pepsina quanto pela tripsina; em culturas de dez dias, a "queratina jovem" era hidrolisada apenas pela pepsina enquanto que, em culturas de três semanas, a "queratina madura" resistia a ambas as enzimas. Esses resultados sugerem que, durante a evolução das culturas, proteínas fibrosas são complexadas com produtos de outras naturezas e, como consequência, tornam-se resistentes à ação das proteases. Em concordância com esses resultados, foi admitido que a transformação da pré-queratina (dos tonofilamentos) em "queratina" (situada na célula córnea) é simultânea com o aparecimento de um lípide, orientado em relação ao eixo da fibroproteína (GOLDSMITH & BADEN, 1970). Os resultados do presente trabalho são favoráveis à essa interpretação, pois sugerem íntima relação entre a proteína fibrosa dos tonofilamentos e os fosfolípides contendo colina, associação esta que parece persistir nas fibrilas de "queratina".

4 - Relação entre o material sudanófilo e os lípides dotados de colina e fosfato, presentes na epiderme

Confrontando os resultados obtidos com a coloração pelo negro de Sudan, com os fornecidos pelas técnicas para lípides contendo colina e para o íon fosfato verifica-se, na epiderme, o seguinte:

- 1 - Grande proporção do material sudanófilo é constituída por lípidos que contêm colina e fosfato, o que sugere tratar-se de fosfatidilcolinas ou de esfingomielinas. Estas substâncias parecem formar complexos com proteínas e, por isso, não são extraíveis pelo metanol-clorofórmio, a não ser após hidrólise ácida ou alcalina.
- 2 - A situação do material sudanófilo, na porção superficial da epiderme, coincide com a localização dos lípidos contendo colina, inclusive no que diz respeito aos lípidos mascarados, situados no citoplasma das células queratinizadas.
- 3 - Os lípidos contendo colina, mascarados, situados no citoplasma das células queratinizadas, não reagem positivamente à reação que revela o íon fosfato, a não ser após tratamento por peridrol-amônia.
- 4 - A aparente discordância, quanto a intensidade da reação para lípidos contendo colina e a reação para o íon fosfato, sendo esta última negativa no citoplasma das células queratinizadas e muito pouco intensa na membrana espessada, pode ser explicada pelo bloqueio do íon fosfato, que exige tratamento adequado para ser desmascarado.
- 5 - Após a hidrólise alcalina, na porção profunda da epiderme sobrevém desmascaramento de colina reativa, relacionada com os tonofilamentos; este mesmo tratamento não desmascara o íon fosfato; todavia, o tratamento com peridrol-amônia sugere a presença de íon fosfato nesse local.
- 6 - Convém ainda salientar que na porção profunda da epiderme o material sudanófilo, situado na membrana plasmática dos queratinócitos e no espaço intercelular, contém, de acordo com nossos resultados, fosfolípidos dotados de colina.
- 7 - Ao contrário, a maior parte do material sudanófilo, contido no citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, não reage como fosfolípidos contendo colina; a reação para o íon fosfato é muito fraca, nesse local,

mesmo após desmascaramento pelo peridrol-amônia, pois apenas nos extratos mais periféricos da camada espinhosa e na camada granulosa a reação é positiva. Por outro lado, a reatividade à reação para lípidos contendo colina é bem menos intensa, comparada com os resultados fornecidos pelo negro de Sudan e, além disso, atinge principalmente os queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e os da camada granulosa. O material sudanófilo, ao contrário, além de mais abundante, atinge também queratinócitos mais profundamente situados na camada espinhosa. Estes resultados sugerem que o material sudanófilo, da porção profunda da epiderme, seja constituído, em pequena parte, por fosfolípidos contendo colina, porém, em sua maior parte, por lípidos destituídos de colina e de fosfato. Aliás, foi demonstrada a presença de material lipídico de outra natureza (colesterol e vitamina D) no citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, o que será discutido posteriormente; esse material deve ser responsável pela maior parte da sudanofilia aí presente e também por parte da reatividade, quando se emprega a técnica para lípidos contendo colina, pois a vitamina D reage fracamente com esta técnica.

- 8 - No citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa ocorrem pequenas granulações sudanófilas e colina positivas, cujas características morfológicas são diferentes das granulações que contêm vitamina D; por estes motivos, elas foram consideradas como grânulos de lípidos contendo colina.

Tem sido admitido que os fosfolípidos, inclusive os fosfoesfingolípidos, são sintetizados na epiderme a partir do acetato (OHKIDO *et alii.*, 1970, 1972a; LONG & BOYCE, 1971), com sucessiva incorporação do íon fosfato e da colina ou de outra base nitrogenada (CARNEY *et alii.*, 1966). As etapas da biossíntese dos fosfolípidos, na epiderme, não estão completamente estabelecidas, embora tenham sido assinalados vários produtos intermediários (LONG & BOYCE, 1971).

Existem vários trabalhos bioquímicos sobre a composição dos fosfolípidos e dos lípidos neutros da epiderme dos mamíferos (REINERTSON & WHEATLEY, 1959; CARRUTHERS, 1964; WHEATLEY & FLESCH, 1967; ANSARI *et alii.*, 1970; LONG, 1970). LONG & BOYCE (1971) assinalaram que, dentre os fosfolípidos da pele, 40,0% correspondem à fosfatidilcolina, 20,0% à fosfatidiletano

lamina, 5,0% à fosfatidilserina e 14,0% à esfingomielina; conforme se verifica, 54,0% dos fosfolípidos contêm colina. A presença de esfingomielinas (constituídas por ceramidas e fosforilcolina), foi também assinalada na epiderme de mamíferos (GRAY & YARDLEY, 1975a).

GRAY & YARDLEY (1975a) e GRAY & WHITE (1978) identificaram, além disso, os lípidos polares e os glicoesfingolípidos da porção superficial da epiderme; dentre os primeiros caracterizaram dois fosfolípidos especiais na camada granulosa da epiderme do porco (GRAY & YARDLEY, 1975a; GRAY, 1976).

Através da técnica de cromatografia em camada fina, ELIAS *et alii.* (1977b, 1979a) identificaram, dentre os fosfolípidos das camadas granulosa e córnea da epiderme, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e esfingomielina; assinalaram, também, que os esfingolípidos constituem 25,0 a 40,0% do total dos lípidos. Esses resultados confirmam a presença de fosfolípidos contendo colina nos queratinócitos da camada granulosa, o que está de acordo com nossos resultados histoquímicos.

A detecção histoquímica de fosfolípidos, na epiderme, foi efetuada, primeiramente, por BAKER (1946), na pele do macaco, através da técnica da hemateína ácida; este autor assinalou a presença de grânulos perinucleares nas células epidérmicas e admitiu sua natureza fosfolipídica. A técnica da hemateína ácida foi, também, empregada por MONTAGNA & HAMILTON (1949) e MONTAGNA (1962), os quais evidenciaram material reativo nos desmossomas dos queratinócitos das camadas mais profundas da epiderme. WISLOCKI (1951) mostrou a presença de material hemateína ácida reativo no espaço intercelular correspondente aos extratos intermediários e periféricos da camada espinhosa e da camada granulosa, no epitélio da vagina e da gengiva. BRAUN-FALCO (1958b) e JARRETT *et alii.* (1959) verificaram forte reatividade das células da camada granulosa, quando empregavam a técnica da hemateína ácida, em cortes histológicos de pele.

Convém salientar que a técnica da hemateína ácida (BAKER, 1944) não é específica para fosfolípidos, conforme foi verificado em modelos de papel de filtro (HADLER & SILVEIRA, resultados não publicados). Um dos motivos desta inespecificidade advém da propriedade apresentada pela hemateína que consiste em formar lacas coradas, quando se liga à metais.

No caso particular da epiderme, a presença de metais nas células da camada granulosa foi assinalada por MONTAGNA

(1962) e JARRETT & SPEARMAN (1964). Assim sendo, os resultados da técnica da hemateína ácida na epiderme, especialmente na camada granulosa, devem ser interpretados com cautela. JARRETT (1960) mostrou a presença de material hemateína ácida positivo na camada granulosa e ausência deste material na camada córnea; considerou esse material como sendo fosfolípide, que era cindido pela fosfatase ácida e, por isso, desaparecia na camada córnea.

Convém salientar que os resultados do presente trabalho foram obtidos com a técnica de HADLER & SILVEIRA (1978); esta técnica apresenta especificidade para lípidos contendo colina pois, além deles, somente as vitaminas A e D produzem resultados positivos, embora de fraca intensidade. Os resultados obtidos com esta técnica revelam apenas alguns grânulos reativos nos queratinócitos da camada granulosa, confirmando parcialmente os resultados de JARRETT (1960). Por outro lado, a reação para o íon fosfato, segundo a técnica de HADLER *et alii*. (1978), é negativa no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, a não ser após o desmascaramento.

A técnica da hemateína ácida foi empregada, também, por ELIAS *et alii*. (1979a), os quais verificaram coloração do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, principalmente das células mais superficiais da camada granulosa; os extratos mais profundos da camada córnea também se coravam; o tratamento por solventes de lípidos não modificava a reatividade. Esses resultados, contudo, devem ser interpretados considerando-se a falta de especificidade da técnica da hemateína ácida pois, conforme já foi assinalado, a hemateína forma lacas com metais, os quais estão presentes nas células da camada granulosa.

ELIAS *et alii*. (1979a) estudaram, histoquimicamente, os fosfolípidos da epiderme, ao microscópio eletrônico, através da técnica do tricomplex (segundo ADAMSON & BOWDEN, 1970), em cortes tratados, ou não, pelo metanol-clorofórmio. Verificaram reação positiva no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, principalmente ao redor da membrana das mitocôndrias, do complexo de Golgi e dos corpos lamelares. Todavia, tanto as lamelas quanto a matriz interna dos corpos lamelares, assim como o restante do citoplasma, não apresentavam reação positiva. Na camada córnea, verificaram finos grânulos no espaço intercelu-lar, que interpretaram como resíduos de membranas dos corpos la

melares. O restante do espaço não apresentava reatividade. Por outro lado, o tratamento com metanol-clorofórmio não afetava a reatividade da epiderme. Conforme se verifica, também a técnica do tricomples não fornece resultados positivos em todos os locais onde a hemateína ácida indica a presença de material reativo, o que provavelmente decorre da inespecificidade desta última técnica.

Os resultados fornecidos pela técnica utilizada no presente trabalho revelam, entretanto, a presença de lípidos contendo colina tanto na porção profunda quanto na porção superficial da epiderme, em locais em que a reação para o íon fosfato é também positiva. Nas células queratinizadas, fosfolípidos contendo colina foram demonstrados tanto na membrana espessada quanto no citoplasma. Neste último local, eles se apresentam mascarados. A principal discordância entre os resultados do presente trabalho e os de ELIAS *et alii.* (1979a), consiste na detecção de fosfolípidos contendo colina, relacionados com os tonofilamentos e, provavelmente, com as fibrilas de "queratina", os quais são demonstrados somente após o uso de desmascarantes apropriados. Estes resultados são favoráveis à correlação entre fosfolípidos e queratinização. Contudo, no que concerne a esta correlação, dados anteriores, obtidos através de diferentes técnicas, nem sempre são concordantes; assim, embora a presença de lípidos, na "queratina" epidérmica, tenha sido sugerida pela espectroscopia dos raios X (SWANBECK, 1959; SWANBECK & THYRESSON, 1962; FRASER *et alii.*, 1963) e confirmada pelos resultados de extrações com solventes (WHEATLEY *et alii.*, 1964; ELIAS *et alii.*, 1979a), a microscopia eletrônica não comprovou a presença de lípidos nas células queratinizadas, afastando sua relação com a queratinização. Deve ser destacado, no entanto, que a microscopia eletrônica não é adequada para este tipo de investigação.

Deve ser considerado que os fosfolípidos constituem componentes obrigatórios dos queratinócitos, pois fazem parte do sistema de membranas celulares (SINCLAIR, 1934), sendo muito importantes na sua estabilização (SINCLAIR, 1934, 1937). São considerados os componentes mais importantes das estruturas membranosas bilaminares (PASCHER, 1976), embora outras substâncias, tais como as ceramidas, possam também formar estruturas desse tipo. Na camada córnea, foi demonstrada a presença de lípidos capazes de formar estruturas bilaminares estáveis (GRAY & WHITE, 1979a).

Em geral, a concentração de fosfolípidos se mantém constante nas células, existindo equilíbrio entre eles e o colesterol; admite-se que a atividade bioquímica dos fosfolípidos seja regulada pelo colesterol (BLOOR & SNIDER, 1934).

Na epiderme, tem sido geralmente admitido que os lípidos polares, especialmente os fosfolípidos, se apresentem quantitativamente diminuídos na camada córnea (ELIAS, 1981). Aliás, a redução dos fosfolípidos nas regiões mais periféricas da epiderme foi verificada desde UNNA & GOLODETZ (1910), os quais admitiram que os fosfolípidos não estariam presentes na camada córnea.

Na pele de mamíferos, os fosfolípidos atingem a proporção de 0,7 a 0,8% do peso seco dos lípidos (REWALD & SCHWIEGER, 1933; MATTHEWS *et alii.*, 1935); eles são mais abundantes na epiderme, onde atingem proporções mais elevadas nas camadas mais profundas (KOOYMAN, 1932; TAYLOR *et alii.*, 1948), perfazendo 2,6% do peso seco; ao contrário, na camada córnea a proporção diminui para 0,14%. Foi demonstrado que, do total dos lípidos da camada córnea da epiderme do porco e do homem, os fosfolípidos constituem apenas 1,0% (GRAY & YARDLEY, 1975a) ou mesmo 0,1% (ELIAS, 1981); no entanto, esta proporção varia com a espécie animal, pois na camada córnea da epiderme do camundongo atinge 10,0% (ELIAS, 1981).

A grande diminuição dos fosfolípidos, nas últimas fases da queratinização, foi confirmada por diversos autores (LONG, 1970; GRAY & YARDLEY, 1975a; ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a; GRAY & WHITE, 1978; ELIAS, 1981), sugerindo que os fosfolípidos estejam envolvidos no processo de queratinização. Além da diminuição dos fosfolípidos, também a relação colesterol-fosfolípidos se modifica durante a queratinização, pois enquanto o teor de colesterol diminui de 50,0%, na camada córnea, o de fosfolípidos sofre redução de 95,0% (ROTHMAN, 1954). No entanto, pequena quantidade de fosfolípidos permanece no interior da camada córnea, especialmente no espaço intercelular, conforme mostram os resultados bioquímicos e histoquímicos (ELIAS *et alii.*, 1979a). Nossos resultados revelam a presença de fosfolípidos contendo colina, tanto no citoplasma das células queratinizadas quanto na membrana espessada. Convém salientar que as técnicas por nós utilizadas não permitem a distinção entre a membrana espessada e o espaço intercelular.

A grande redução dos fosfolípidos nas camadas periféri

cas da epiderme, foi confirmada por ELIAS *et alii.* (1979a) e ELIAS (1981), os quais demonstraram que na camada granulosa da epiderme do camundongo há 40,0% de fosfolípidos e na mesma camada da epiderme do porco a proporção atinge 34,0% do total dos lípidos; na camada córnea esses percentuais baixam para 10,0% e 0,1%, respectivamente.

A redução do teor de fosfolípidos foi correlacionada com a lise dos orgânulos dos queratinócitos, principalmente das mitocôndrias e de outras estruturas membranosas (lipofanerose), lise esta que ocorreria nas fases finais do processo de queratinização (LUDFORD, 1924). Como consequência, haveria decomposição dos fosfolípidos com liberação da colina (SNIDER *et alii.*, 1949). Por outro lado, os ácidos graxos provenientes do catabolismo dos fosfolípidos, estariam presentes na camada córnea (KOPPENHOEFFER, 1942), onde poderiam ser responsáveis pela esterificação do colesterol, que ocorreria nos extratos superficiais da epiderme. De acordo com esses dados, foi admitido que os fosfolípidos não forneceriam substrato para a queratinização (LONG & BOYCE, 1971). No entanto, nossos resultados, que revelam associação de fosfolípidos contendo colina com a pré-queratina dos tonofilamentos e presença de fosfolípidos em associação com as fibrilas de "queratina", são favoráveis à participação destes lípidos no processo de queratinização. Por outro lado, os resultados histoquímicos, obtidos após desmascaramento da colina e do íon fosfato, mostram que os fosfolípidos estão presentes, na camada córnea, em quantidade apreciável, ocorrendo tanto no citoplasma das células queratinizadas quanto em sua membrana espessada.

Desvinculando os fosfolípidos da queratinização epidérmica, LONG (1972) julgou que esses lípidos eram decompostos durante o processo de queratinização e alguns dos seus constituintes reutilizados para a biossíntese de triglicérides. OHKIDO *et alii.* (1972b) admitiram que os fosfolípidos e o colesterol das membranas tornavam-se livres no final da queratinização; devido a isso, o complexo lipoprotéico tornava-se instável, podendo estes lípidos ser extraídos facilmente (OHKIDO *et alii.*, 1977).

Por outro lado, foi sugerido que o desaparecimento dos fosfolípidos, na camada córnea, constituiria parte de um mecanismo epidérmico responsável pela conservação do fósforo no organismo (DOWNING & STRAUSS, 1974). Os fosfolípidos, libera-

dos através da lise do sistema de membranas celulares, seriam catabolisados e o íon fosfato reabsorvido pelo organismo. Esta hipótese prevê a existência de hidrolases ativas nas regiões superficiais da epiderme, o que foi confirmado por GRAY & YARDLEY (1975a), os quais verificaram maior atividade hidrolásica na camada granulosa.

Entre as hidrolases, que atuam no metabolismo dos glicerofosfolípides, LONG (1975) identificou a fosfolipase A, o que foi confirmado por BOWSER (1978) e BOWSER & GRAY (1978), na epiderme humana e do porco; foi sugerida, também, a presença de uma lisofosfolipase (fosfolipase B). Admite-se que a fosfolipase A inicie o catabolismo dos fosfolípides, liberando um ácido graxo e formando um lisofosfolípide, capaz de lisar a membrana plasmática (LUCY, 1970). A presença de fosfolipase C, que hidrolisa a fosfatidilcolina em diglicéride e fosforilcolina, não foi assinalada na epiderme humana e na do porco (BOWSER & GRAY, 1978). Convém lembrar que sob o termo genérico de fosfolipase C foram englobadas diversas fosfodiesterases, que atuam sobre os fosfolípides (HELLER & SHAPIRO, 1966); no entanto, as fosfodiesterases devem ser distinguidas da verdadeira fosfolipase C.

No que diz respeito aos esfingolípides, GRAY & YARDLEY (1975a) mostraram que, devido ao catabolismo da esfingomielina, nas células da camada granulosa da epiderme do porco e do homem, ocorre aumento correspondente de ceramidas nas células corneas. Isto sugere que a enzima responsável pelo catabolismo da esfingomielina poderia ser, também, uma fosfolipase C, responsável pela sua hidrólise com liberação da fosforilcolina. Por outro lado, BOWSER & GRAY (1978), utilizando a metil-¹⁴C-esfingomielina e a metil-¹⁴C-fosfatidilcolina, como substratos, encontraram evidências da presença de esfingomielinase em frações da epiderme humana e do porco, pois a metil-¹⁴C-esfingomielina foi hidrolisada, em pH 4,5, enquanto que apenas pequena hidrólise da metil-¹⁴C-fosfatidilcolina ocorreu entre pH 6,0 e 7,0. A esfingomielinase, que hidrolisa a esfingomielina, originando uma ceramida e fosforilcolina, parece estar contida nos lisossomas (BOWSER & GRAY, 1978). Foi admitido que esta enzima cataboliza os esfingofosfolípides antes da célula atingir o extrato córneo, o que permitiria a reutilização do fósforo, que seria reabsorvido através da epiderme (GRAY & YARDLEY, 1975b).

Convém salientar que os fosfolípidos epidérmicos foram, também, relacionados com os corpos lamelares. A semelhança entre a estrutura desses corpos e a de fosfolípidos sintéticos, em sistema de fase aquosa (FERNÁNDEZ-MORÁN, 1962; LUZZATI & HUSSON, 1962; STOECKENIUS, 1962), sugeriu a presença de fosfolípidos nos corpos lamelares (FRITHIOF & WERSALL, 1965; SQUIER, 1968). O emprego de solventes de lípidos é também favorável à presença de fosfolípidos nos corpos lamelares (BREATHNACH & WYLLIE, 1966; OLÁH & RÖHLICH, 1966; NIEBAUER & EBNER, 1970; SUZUKI & ISHIKAWA, 1973; WILGRAM *et alii.*, 1973). SUZUKI & ISHIKAWA (1973) assinalaram que os corpos lamelares não mais são verificados após o tratamento da epiderme por metanol-clorofórmio. KUROSUMI (1977) admitiu que as lamelas mais eletrodensas dos corpos lamelares eram constituídas por proteínas (hidrolases), enquanto que as menos eletrodensas eram constituídas por fosfolípidos.

Dados histoquímicos são também favoráveis à presença de fosfolípidos nos corpos lamelares. Assim, OLÁH & RÖHLICH (1966) verificaram que os corpos lamelares coravam-se pela hemateína ácida, coloração essa que não mais se verificava após extração com piridina. BREATHNACH & WYLLIE (1966) verificaram que os corpos lamelares impregnavam-se intensamente pelo tetróxido de ósmio-iodeto de zinco, o que corroboraria com a presença de fosfolípidos.

HASHIMOTO (1971b) e WOLFF & SCHREINER (1971) mostraram que os corpos lamelares são lisados pela fosfolipase C, sugerindo que os fosfolípidos devem estar presentes em suas membranas. Aliás, através de resultados histoquímicos, ao nível da microscopia eletrônica e da fratura após congelamento (*freeze-fracture*), ELIAS *et alii.* (1977b, 1979a) assinalaram predominância de lípidos polares nos corpos lamelares; todavia, os fosfolípidos foram detectados apenas na membrana que envolve os corpos lamelares.

Foi admitido que o conteúdo dos corpos lamelares preencheria e obstruiria o espaço intercelular das camadas mais superficiais da epiderme (ELIAS & FRIEND, 1975; ELIAS *et alii.*, 1977b, d, 1979a). Segundo esta hipótese, o material intercelular dessas camadas derivaria dos corpos lamelares, o que está de acordo com observações anteriores (SCHREINER & WOLFF, 1969; SQUIER, 1973). Foi mesmo admitido que os corpos lamelares seriam importantes na adesão celular das camadas superficiais da

epiderme (HASHIMOTO, 1971b; HAYWARD & HACKEMANN, 1973).

Não deve ser esquecido que no compartimento extracelular há enzimas que não estão presentes nos corpos lamelares, tais como a adenosina trifosfatase e a adenilciclase (WOLFF, 1964; FARQUHAR & PALADE, 1966; TIEDEMANN, 1971; MAHRLE & ORFANOS, 1975; SONDERGAARD *et alii.*, 1975). Esses resultados sugerem que o compartimento extracelular contenha produtos provenientes de outras origens; por esse motivo, admite-se que não sejam os corpos lamelares os únicos responsáveis pelo conteúdo do compartimento extracelular. De acordo com este conceito estão os resultados de LAVKER (1976) e HAYWARD (1978), que assinalaram, no espaço intercelular, membranas bilaminares diferentes das oriundas dos corpos lamelares, de natureza lipídica, mas cuja origem é desconhecida.

Os resultados morfológicos ao nível da microscopia eletrônica, a reatividade histoquímica, a ação de solventes e de enzimas específicas (fosfolipase C), sugerem, portanto, que os corpos lamelares possuam proteínas, glúcides e lípidos; dentre os lípidos, foram assinalados fosfolípidos e colesterol.

Embora tenha sido demonstrado que os corpos lamelares contêm fosfolípidos em sua membrana envolvente, eles não devem ser os únicos responsáveis pela presença de fosfolípidos nas células superficiais da epiderme, pois outras citomembranas são também dotadas desses lípidos. No que concerne à camada córnea, os corpos lamelares parecem responsáveis pelos fosfolípidos presentes no espaço intercelular; estes fosfolípidos foram considerados por nós como integrantes da membrana espessada das células queratinizadas. No entanto, os fosfolípidos situados no citoplasma das células queratinizadas, bem evidenciados no presente trabalho, parecem independentes dos corpos lamelares; assim, nossos resultados sugerem que os lípidos mascarados, situados no interior das células queratinizadas, estejam relacionados com os fosfolípidos contendo colina associados com os tonofilamentos, os quais são evidenciados desde a camada espinhosa, isto é, na porção profunda da epiderme.

5 - Substâncias PAS positivas presentes na epiderme

Os resultados do presente trabalho revelam glicogênio e material PAS positivo, resistente ao teste da amilase, nos queratinócitos da porção profunda da epiderme; no entanto, a

maior parte desse último material está situado na porção superficial da epiderme.

Na porção profunda da epiderme, a substância PAS positiva, não hidrolisada pela amilase, é encontrada no espaço intercelular, tanto dos extratos periféricos da camada espinhosa quanto da camada granulosa; no citoplasma dos queratinócitos desta última camada ocorrem, também, granulações PAS positivas. Na porção superficial da epiderme, apenas a membrana espessada das células queratinizadas reage positivamente. De acordo com nossos resultados, o tratamento com metanol-clorofórmio não extrai material PAS positivo da epiderme, ao contrário do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico que determina sua extração. Estes resultados indicam que o material PAS positivo não é solúvel em solventes orgânicos, a não ser quando adicionado de agente hidrolítico (ácido clorídrico), sugerindo estar associado com proteínas. O tratamento pelo hidróxido de potássio determina resultados diferentes, na porção profunda e na porção superficial da epiderme; na primeira tem ação desmascarante sobre o material PAS positivo, enquanto que nas células queratinizadas da porção superficial determina extração parcial do material PAS positivo, situado na membrana espessada. Estes resultados sugerem que o material PAS positivo, situado nestes dois locais, constitua complexos diferentes. Todavia, a interpretação destes resultados é difícil, uma vez que parece haver mascaramento parcial do material PAS positivo, também na membrana espessada das células queratinizadas, a julgar pela maior intensidade dessa reação no espaço intercelular da camada granulosa.

Foi assinalada, histoquimicamente, a presença de glicogênio nas camadas espinhosa e granulosa da epiderme humana (MONTAGNA *et alii.*, 1948), assim como na bainha dos pêlos, tanto no homem (LOMBARDO, 1907; SASAKAWA, 1921) quanto no rato (JOHNSON & BEVELANDER, 1946) e no coelho (BOLLIGER & McDONALD, 1949). No entanto, a maior parte do material PAS positivo da epiderme não é hidrolisável pela amilase (MONTAGNA *et alii.*, 1948), o que foi confirmado pelos nossos resultados. WISLOCKI *et alii.* (1951) demonstraram fraca positividade da reação do PAS na "substância intercelular" da camada córnea da epiderme plantar. Segundo o critério adotado no presente trabalho, o que os autores consideraram "substância intercelular" corresponde à membrana espessada das células queratinizadas; assim sendo, a presença de material PAS positivo, nesse local, foi confirma

da pelos nossos resultados, os quais revelam, além disso, que a reatividade da membrana espessada é fortemente inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio. WISLOCKI *et alii*. (1951) assinalaram, também, material PAS positivo no espaço intercelular das camadas espinhosa e granulosa, o que foi confirmado no presente trabalho.

O material PAS positivo, demonstrado no espaço intercelular da epiderme, foi admitido como de natureza glucídica, pois constituiria o glicocálice dos queratinócitos (ODLAND, 1958; BENNETT, 1963; BENEDETTI & EMMELOT, 1967; BORYSENKO & RAVEL, 1973; OVERTON, 1974). Foi sugerido que o glicocálice conteria glicoproteínas e glicolípides, estando intimamente relacionado com o folheto externo da membrana plasmática (MATOLTSY, 1976).

No que concerne ao material PAS positivo, situado na membrana espessada das células queratinizadas, nossos resultados discordam dos obtidos por ELIAS *et alii*. (1979a), os quais assinalaram que a reação do PAS e a da concanavalina A, eram negativas na camada córnea, pois tanto a membrana espessada quanto o citoplasma das células queratinizadas não reagiam. ELIAS *et alii*. (1979a) usaram, para demonstrar polissacárides neutros, a técnica da concanavalina A combinada com a peroxidase (segundo HUET & HERZBERG, 1973); demonstraram que a matriz dos corpos lamelares, tanto dos intra quanto dos extracelulares, apresentava-se reativa; no entanto, nem os interstícios do extrato córneo, nem o citoplasma das células córneas, apresentavam reatividade. A reatividade dos corpos lamelares diminuiu após o tratamento com solventes de lípides, sugerindo tratar-se de glicolípides; a esse respeito, convém acrescentar que tem sido admitido que, na camada córnea, o espaço intercelular seria preenchido por lípides neutros (ELIAS & FRIEND, 1975; ELIAS *et alii*., 1977c), que apresentam caráter hidrófobo (GRAY & YARDLEY, 1975a; ELIAS *et alii*., 1977c, 1979a).

A discordância entre nossos resultados e os de ELIAS *et alii*. (1979a), provavelmente, advém da metodologia empregada; enquanto nosso material é fixado em solução de formalina contendo 3,0% de cloreto de cálcio, os autores citados empregaram material não fixado, cortado em criostato.

Empregando técnica da reação do PAS modificada, WOLMAN (1956) verificou que o citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa reagia positivamente, ao contrário da membrana plas

mática que não reagia; o tratamento por solventes de lípidos promovia extração parcial do material PAS positivo. Esses achados foram parcialmente confirmados por nós, pois nossos resultados revelam a presença de material PAS positivo, tanto no espaço intercelular da porção profunda da epiderme quanto no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e na membrana espessada das células queratinizadas. Nesses três locais o material PAS positivo não se apresenta livre, tendo em vista seu comportamento diante dos solventes usados.

A natureza química do material PAS positivo da epiderme é discutida. Sua natureza polissacarídica tem sido admitida com base no emprego de técnicas histoquímicas, que sugerem a presença de polissacárides ou de glicoproteínas, nos corpos lamelares (FARBMAN, 1964; MATOLTSY & PARAKKAL, 1965; HASHIMOTO *et alii.*, 1966; OLSON *et alii.*, 1969; HASHIMOTO, 1971b; HAYWARD, 1973; HAYWARD & HACKEMANN, 1973; INNES, 1973; ASHRAFI *et alii.*, 1977). A presença de material PAS positivo no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e no espaço intercelular da camada córnea, onde se confunde com a membrana espessada, constitui evidência de que esse material poderia provir dos corpos lamelares. Além disso, foi sugerida a presença de mucopolissacárides (proteoglicanas) recobrimdo as células queratinizadas (RAMBOURG & LEBLOND, 1967), através do emprego de técnicas histoquímicas, ao nível da microscopia eletrônica (RAMBOURG, 1971). Por outro lado, SKERROW & MATOLTSY (1974) analisaram, quimicamente, o material desmossômico da epiderme, tendo encontrado 17,0% de carboidratos e 10,0% de lípidos; além disso, isolaram uma glicoproteína com P.M. de 130.000 daltons, PAS positiva, que poderia ser responsável pela reatividade da epiderme. GRAY *et alii.* (1980) isolaram frações da membrana plasmática dos queratinócitos da camada espinhosa, isentas de desmossomas, através da centrifugação fracionada; dentre essas frações, assinalaram glicoproteínas com P.M. de 90.000 a 120.000 daltons; todavia, não verificaram se essa glicoproteína era PAS positiva.

No entanto, deve ser assinalado que os glúcides PAS positivos, da epiderme, podem estar associados à lípidos, pois foi admitido que alguns "fosfolípidos" reagiriam positivamente ao reativo de Schiff, após oxidação pelo ácido periódico (PEARSE, 1960). Aliás, a presença de glicolípidos, na epiderme, foi demonstrada através de técnicas bioquímicas (GRAY & YARDLEY,

1975a, b; ELIAS *et alii.*, 1977b; GRAY & WHITE, 1978). Com base nos resultados bioquímicos, ELIAS *et alii.* (1977b) sugeriram a possibilidade do material PAS positivo da epiderme ser de natureza glicolipídica; assinalaram que os glicolípides ocorrem, principalmente, na camada granulosa, onde são abundantes, mas também são encontrados na camada córnea, embora em menor proporção; isolaram cinco frações de esfingolípides, uma das quais é constituída por um glicoesfingolípide e ocorre, principalmente, na camada granulosa; as outras quatro frações são constituídas por ceramidas. ELIAS *et alii.* (1979a) assinalaram a presença de glúcides neutros nos corpos lamelares, os quais poderiam indicar a ocorrência de glicoesfingolípides em seu interior.

Devido a esses fatos, ELIAS *et alii.* (1979a) e ELIAS (1981) correlacionaram a positividade da reação do PAS, na camada granulosa, onde é forte, e na camada córnea, onde é fraca, com a presença de glicolípides, hipótese esta mais admitida atualmente. Nossos resultados são favoráveis a esta hipótese, uma vez que o material PAS positivo, da epiderme, é extraído por solvente orgânico adicionado de ácido clorídrico. Dentre os glicolípides devem ser consideradas as glicosilceramidas (ceramidas ligadas à hexoses), presentes na epiderme em elevada proporção (GRAY & WHITE, 1978; ELIAS *et alii.*, 1979a).

Foi sugerido que, na camada granulosa, ocorreria hidrólise dos glicolípides com liberação do glúcido e dos ácidos graxos (YARDLEY, 1969; FREINKEL & FIEDLER-WEISS, 1974); estes últimos poderiam esterificar o colesterol, presente nas células queratinizadas.

Convém salientar que os resultados bioquímicos de GRAY & YARDLEY (1975a) e ELIAS *et alii.* (1977b) indicam que a maior parte dos glicolípides da epiderme desaparece nas fases finais do processo de queratinização. Esse desaparecimento decorre de processo catabólico, através do qual glicosilceramidas originariam ceramidas, devido à separação do componente glicídico (GRAY & YARDLEY, 1975a).

Em apoio a esta hipótese, na camada córnea da epiderme humana e do porco, foi assinalada a presença de ceramidas na proporção de 20,0% sobre o total dos lípides (GRAY & YARDLEY, 1975a). As ceramidas constituiriam produtos do catabolismo tanto das esfingomielinas quanto das glicosilceramidas, pois são N-acil derivados da esfingosina ou da deidroesfingosina (esfin

ganina), por combinação com ácidos graxos (GRAY & YARDLEY, 1975a).

A importância das ceramidas consiste, principalmente, em sua relação com as glicosilceramidas e com as esfingomielinas (ceramidas ligadas à fosforilcolina), ambas presentes na epiderme em elevada proporção (GRAY & YARDLEY, 1975a; GRAY & WHITE, 1978; ELIAS *et alii.*, 1979a).

Não está ainda estabelecido se as ceramidas da camada córnea provêm do catabolismo das esfingomielinas ou das glicosilceramidas, ou de ambas (GRAY & WHITE, 1978); todavia, há semelhanças quanto aos ácidos graxos e as bases das ceramidas e das glicosilceramidas isoladas da camada córnea, o que constitui evidência de relação entre ambas.

As ceramidas ocorrem, principalmente, na camada córnea, pois existem em quantidade muito pequena nas camadas basal e espinhosa, aumentando progressivamente em paralelo com o processo de queratinização; da camada córnea da epiderme humana e do porco foram isoladas quatro diferentes ceramidas (GRAY & WHITE, 1978). Esses resultados, todavia, não estão inteiramente de acordo com os encontrados por outros autores (LONG, 1970; ELIAS *et alii.*, 1979a; ELIAS, 1981), os quais revelam que os glicosíngolípides e as ceramidas não apresentam grandes variações quantitativas quando a camada granulosa é comparada com a camada córnea.

De acordo com os resultados do presente trabalho, material PAS positivo, provavelmente associado com proteínas, está presente no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e, principalmente, no espaço intercelular da porção profunda da epiderme e na membrana espessada das células queratinizadas. Estes resultados sugerem que a maior parte do material PAS positivo presente, na porção profunda da epiderme, situação extracelular e, posteriormente, se deposite na face externa da membrana espessada das células queratinizadas. Se esta hipótese for verdadeira, o material PAS positivo não deve ser proveniente dos corpos lamelares, pelo menos parcialmente.

Não obstante as semelhanças quanto às propriedades do material PAS positivo, situado na membrana espessada das células queratinizadas e no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme, ambos se comportam diferentemente diante da hidrólise pelo hidróxido de potássio. Enquanto o primeiro é extraído por este tratamento o outro, além de não ser ex-

traído, é desmascarado. Convém destacar que a hidrólise pelo hidróxido de potássio desmascara, também, tocoferol do compartimento extracelular da porção profunda da epiderme, sugerindo que o material PAS positivo e o tocoferol sejam componentes de um mesmo complexo, suscetível de ser hidrolisado pelo hidróxido de potássio.

6 - Colesterol e ésteres do colesterol presentes na epiderme

A reação do ácido peracético-azul de toluidina, confirmada pela reação do ácido peracético-Schiff e pela ausência de inibição, quando se efetua fixação por formalina-bicloreto de mercúrio, revela a presença de colesterol não esterificado na membrana espessada das células queratinizadas, o qual parece estar sob a forma de complexo lipoprotéico, uma vez que não é removido pela extração com metanol-clorofórmio, mas é extraído pela hidrólise ácida e, em menor proporção, pela hidrólise alcalina. Além disso, também nos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada granulosa ocorre colesterol não esterificado, o qual parece estar ligado à proteínas; nos extratos mais profundos da camada granulosa e nos periféricos da camada espinhosa, o colesterol não esterificado, aparentemente, não se apresenta ligado à proteínas, uma vez que é removido pelo tratamento com metanol-clorofórmio.

Ésteres do colesterol foram igualmente demonstrados, pe las técnicas histoquímicas empregadas, no citoplasma dos queratinócitos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa; o material reativo se apresenta sob forma finamente granular ou difusa, e é parcialmente removido quando se efetua o tratamento pelo metanol-ácido clorídrico (metilação). Tam bém na membrana espessada das células queratinizadas foi dedu zida a presença de ésteres do colesterol, principalmente, nos extratos mais periféricos da camada córnea; desta forma, o au mento da proporção de ésteres do colesterol, nos extratos peri féricos da camada córnea, verificado por FREINKEL & FIEDLER-WEISS (1974), foi confirmado pelos resultados histoquímicos do presen te trabalho; este aumento ocorre, simultaneamente, com a dimi nução da reatividade da membrana espessada das células quera tinizadas mais periféricas, à reação do ácido peracético-azul de toluidina, o que indica diminuição do colesterol não esterifi

cado. Não obstante, os dados do presente trabalho revelam que tanto o colesterol quanto seus ésteres situam-se apenas na membrana espessada das células queratinizadas, pois estão ausentes em seu citoplasma. O colesterol, situado no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme, é extraído quando se efetua a metilação; o mesmo não ocorre com o colesterol situado na membrana espessada das células queratinizadas. Estes resultados sugerem que a ligação entre esse esterol e prováveis proteínas seja mais estável na membrana espessada.

JARRETT *et alii*. (1959) usaram o ácido peracético (segundo PEARSE, 1960) para demonstrar o grupo disulfeto contido na "queratina" epidérmica; sem comentarmos a especificidade desta técnica, convém assinalar que embora ela empregue o ácido peracético seguido de um fluorocromo básico, ela se apresenta bem diferente da técnica por nós empregada para demonstrar colesterol, uma vez que recomenda fixação em etanol a 70% e utiliza ácido peracético a apenas 3%. Assim sendo, não obstante a aparente semelhança com a técnica do ácido peracético-azul de toluidina, para demonstrar colesterol, existem diferenças fundamentais e, por este motivo, os resultados de JARRETT *et alii*. (1959) não podem ser comparados com os expostos no presente trabalho.

Os resultados por nós obtidos com o teste de Schultz indicam que o material reativo, contido na porção profunda da epiderme, aumenta, progressivamente, até a camada granulosa e se apresenta relacionado com a membrana plasmática e com o espaço intercelular. Embora estes resultados sejam semelhantes aos obtidos com a técnica do ácido peracético-azul de toluidina, deve ser salientado que o teste de Schultz, em fragmentos de papel de filtro, fornece resultados positivos tanto para o colesterol e seus ésteres quanto para o 7-deidrocolesterol e o calciferol (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados); portanto, esta reação não é específica para o colesterol e seus ésteres. Apesar da diferença quanto à cor dos produtos de reação fornecidos pelo colesterol, pelo 7-deidrocolesterol e pelo calciferol, a inespecificidade do teste de Schultz persiste, porque essas diferenças não são significativas; além disso, o ácido sulfúrico-ácido acético fornece reação corada com proteínas dos tecidos fixados em formalina (LE ROSEN *et alii*., 1952), o que interfere nos resultados. De acordo com o que foi exposto, os resultados da reação do ácido peracético-azul de

toluidina e os fornecidos pelo teste de Schultz não são superponíveis, pois estes últimos são menos específicos.

Na porção superficial da epiderme, a membrana espessada das células queratinizadas cora-se mais fortemente do que o citoplasma, quando se efetua o teste de Schultz. Com a técnica do ácido peracético-azul de toluidina o citoplasma das células queratinizadas não se cora ou se cora muito fracamente. Esta discordância pode decorrer tanto da difusão dos produtos da reação quanto da inespecificidade do teste de Schultz. Por estes motivos, embora os resultados fornecidos por essas duas técnicas sejam comparáveis, apenas os resultados da reação do ácido peracético-azul de toluidina serão considerados, por serem mais específicos.

A presença de colesterol nas células epidérmicas, assinalada por LINSER (1904) e UNNA & GOLODETZ (1909, 1910), foi confirmada por numerosos autores (UNNA & SCHUMACHER, 1925; UNNA, 1928; ROTHMAN & SCHAAF, 1929; LINCKE, 1949; LINCKE & KLAWI, 1951; BOUGHTON *et alii.*, 1957; NIEMINEN *et alii.*, 1967).

UNNA & GOLODETZ (1909) assinalaram colesterol nas diversas camadas da epiderme humana, sugerindo predominância de colesterol não esterificado na camada espinhosa e maior proporção de ésteres na camada córnea, o que indicaria a ocorrência de esterificação durante a queratinização. Esses resultados foram confirmados por KOOYMAN (1932). No entanto, os resultados histoquímicos, do presente trabalho, indicam que a esterificação do colesterol se inicia precocemente, ou seja, nos extratos periféricos da camada espinhosa; além disso, revelam que a proporção de ésteres do colesterol na camada córnea é, geralmente, bem menor do que a de colesterol não esterificado.

A presença de colesterol em alta proporção, nas células epidérmicas, foi demonstrada por SRERE *et alii.* (1950), em todas as camadas da epiderme, sendo essa proporção aproximadamente constante em relação ao peso de tecido seco.

A esterificação do colesterol epidérmico, durante o processo de queratinização, foi também admitida por ROTHMAN (1954) para explicar a maior proporção de ésteres na camada córnea. Confirmando essa hipótese, MONTAGNA (1962) verificou que a camada espinhosa da pele humana é rica em colesterol não esterificado, mas pobre em seus ésteres, ao contrário da camada córnea onde a proporção de ambos é aproximadamente igual, conforme fora sugerido por UNNA & GOLODETZ (1909). Os resultados do

presente trabalho não confirmam inteiramente os autores citados, pois a proporção de colesterol não esterificado supera a de seus ésteres, mesmo na camada córnea.

Mais recentemente, foi repetidamente confirmada a presença de colesterol e seus ésteres nas células epidérmicas, assim como sua eliminação através da descamação das células queratinizadas (WILKINSON, 1969; GREENE *et alii.*, 1970; RAMASASTRY *et alii.*, 1970; NICOLAIDES *et alii.*, 1972).

Com base em dados quantitativos e nos resultados da cromatografia em camada delgada, GREENE *et alii.* (1970) estimaram a composição dos lípides da camada córnea; os resultados revelaram 65,0% de glicérides e ácidos graxos, além de 35,0% de colesterol e seus ésteres. Dentre os ésteres do colesterol foi identificado o sulfato de colesterol (GRAY & WHITE, 1978; GRAY *et alii.*, 1978a, b; ELIAS *et alii.*, 1979a), além do palmí-tato de colesterol, anteriormente assinalado (SALKOWSKY, 1910; ECKSTEIN & WILE, 1926).

A presença de colesterol, nas células epidérmicas, foi também demonstrada através de técnicas histoquímicas. MONTAGNA *et alii.* (1948) e MONTAGNA & HAMILTON (1949) mostraram que o teste de Schultz era positivo nas camadas espinhosa e córnea da epiderme, revelando a presença de colesterol. Através de técnica histoquímica específica para demonstrar Δ^5 -3-hidroxi-esteróis, preconizada por HADLER *et alii.* (1968), foi demonstrada a presença de colesterol e compostos afins nas camadas mais superficiais da epiderme e de outros epitélios queratinizados (HADLER & SILVEIRA, 1976; SILVEIRA & HADLER, 1977).

Resultados histoquímicos, obtidos em microscopia eletrônica, também sugeriram a presença de colesterol nas células epidérmicas. FRIEND & BRASSIL (1970) verificaram que nas células que sintetizam esteróis o tetróxido de ósmio precipita-se, impregnando-as. Por esse motivo, a técnica do teróxido de ósmio-iodeto de zinco foi considerada "específica" para lípides não polares, inclusive o colesterol (NIEBAUER *et alii.*, 1969), ao contrário do que era anteriormente admitido (BREATHNACH & WYLLIE, 1966). WILGRAM *et alii.* (1973), usando a técnica do tetróxido de ósmio-iodeto de zinco, verificaram forte impregnação dos corpos lamelares e das estruturas membranosas das células epidérmicas; a extração com hexano removia o material responsável pela impregnação, sugerindo tratar-se de lípides não polares, pois admite-se que estes são extraídos pelo hexa-

no (DEUEL, 1951; ENTENMAN, 1957).

ELIAS *et alii.* (1979a) observaram ausência de lípidos corados pelo *oil red O* nas células da camada granulosa da epiderme, o que significaria ausência de lípidos neutros, inclusive colesterol; no entanto, através da reação da digitonina, ELIAS *et alii.* (1978, 1979a) demonstraram a presença de 3 β -hidroxiesteróis não esterificados (inclusive colesterol), na epiderme; combinando esta técnica com a de fratura após congelamento (*freeze-fracture*), que evita a ação dos solventes usados em microscopia eletrônica, demonstraram a presença de 3 β -hidroxiesteróis não esterificados nos corpos lamelares e no espaço intercelular das camadas granulosa e córnea. Esses resultados foram confirmados pela técnica de fluorescência com a filipina (antibiótico poliênico), que se liga especificamente ao colesterol não esterificado (ELIAS *et alii.*, 1979b). Por outro lado, os resultados citados foram confirmados por dados bioquímicos (ELIAS *et alii.*, 1979a), que revelaram esteróis livres nas camadas granulosa e córnea; foram também confirmados pelos dados histoquímicos do presente trabalho.

Foi sugerido que o colesterol se apresentaria localizado ao redor das fibrilas de "queratina", no interior das células queratinizadas (SWANBECK, 1959); a correlação entre a proteína e o colesterol se efetuará através do seu grupo hidrófilo. Contudo, os resultados histoquímicos do presente trabalho não confirmam a presença de colesterol e seus ésteres no citoplasma das células queratinizadas, uma vez que eles foram detectados apenas na membrana espessada destas células.

ELIAS *et alii.* (1979a), com base em resultados histoquímicos, admitiram que o colesterol e seus ésteres preencheriam o espaço intercelular da camada córnea, ou seja, estas substâncias estariam situadas na face externa da membrana espessada das células queratinizadas. Os resultados do presente trabalho sugerem a presença do colesterol na superfície externa da membrana espessada, mas sugerem, também, sua presença na face interna, conforme será discutido oportunamente.

Intensa biossíntese de colesterol, na epiderme do rato, foi demonstrada por SRERE *et alii.* (1950), através do emprego do acetato-¹⁴C. Esses resultados foram confirmados por diversos autores (NICOLAIDES & ROTHMAN, 1955; WILSON, 1963; NICOLAIDES, 1963, 1964; KANDUTSCH, 1964).

NICOLAIDES & ROTHMAN (1955) estudaram a incorporação de

acetato- ^{14}C , na epiderme humana, tendo demonstrado a biossíntese de esqualeno e de esteróis pelos queratinócitos. O colesterol, sintetizado na epiderme, a partir destes precursores, seria incorporado às citomembranas.

Resultados provenientes de análises químicas, também, são favoráveis à biossíntese de colesterol na epiderme. Assim, foi demonstrada, na epiderme, a presença de geraniol (álcool monoterpênico com dez carbonos), intermediário da síntese do colesterol (KANDUTSCH, 1964). Outros intermediários, tais como o esqualeno e o farnesol (álcool sesquiterpênico com quinze carbonos), foram encontrados na pele, o que não ocorre normalmente com a maioria dos outros órgãos (NICOLAIDES, 1965).

A ocorrência de intensa biossíntese de colesterol na epiderme, deduzida através dos dados bioquímicos assinalados, foi também inferida pelas observações morfológicas, efetuadas ao nível da microscopia eletrônica; essas observações revelaram grande desenvolvimento do retículo endoplasmático liso, nos queratinócitos da porção profunda da epiderme. Está bem estabelecido que o retículo endoplasmático liso é abundante nas células que sintetizam colesterol ou esteróides hormonais (CHRISTENSEN & FAWCETT, 1961; BALIS & CONEN, 1964; CHRISTENSEN, 1965; FRIEND & BRASSIL, 1970; HENRIKSON & STACY, 1971; SCHREINER & WOLFF, 1971; BREATHNACH *et alii.*, 1973; GIL & REISS, 1973; SQUIER, 1973; WHALEY *et alii.*, 1974; ELIAS & FRIEND, 1975; RAKNERUD, 1975). Na epiderme, ele se apresenta desenvolvido nos queratinócitos, principalmente da camada espinhosa, embora não tão desenvolvido quanto nas células da cortical da adrenal ou no hepatócito. Por outro lado, a impregnação pelo tetróxido de ósmio, considerada como indicadora da presença de esteróis, em microscopia eletrônica (FRIEND & BRASSIL, 1970), é comparável e intensa nos queratinócitos e nas células que sintetizam esteróides hormonais (HÖNIGSMANN & WOLFF, 1973).

Admite-se que o colesterol seja sintetizado pelas células epidérmicas com a finalidade de integrar as citomembranas, juntamente com os fosfolípidos e as proteínas; por outro lado, ele seria liberado das membranas pela lipofanerosse, que ocorre no final do processo de queratinização (OHKIDO *et alii.*, 1977). No entanto, a proporção de colesterol, na epiderme, é muito grande, sugerindo que, além de participar da constituição das citomembranas, ele exerça outras funções; dentre estas, destaca-se a biossíntese da vitamina D e a colaboração na consti-

tuição da membrana espessada das células queratinizadas, conforme indicam os resultados do presente trabalho.

O colesterol, sintetizado na epiderme, parece participar do processo de queratinização, através de um mecanismo ainda desconhecido (BLACK & RAUSCHKOLB, 1971). Corroborando com esta interpretação, tem sido verificado que alterações do metabolismo lipídico, principalmente dos esteróis, interferem na diferenciação dos queratinócitos, repercutindo sobre a queratinização (FREINKEL, 1972b; FREINKEL & FIEDLER-WEISS, 1974).

A presença de ésteres do colesterol, na epiderme, foi sugerida por ROTHMAN (1950, 1954) e por REINERTSON & WHEATLEY (1959). De acordo com ROTHMAN (1954), a biossíntese destes ésteres se efetuaria nas células mais profundas da epiderme e não apresentaria relação com o processo de queratinização. No entanto, a correlação entre os ésteres de esteróis e a diferenciação da célula epidérmica foi admitida por WILKINSON & FARBER (1967) e FREINKEL (1972b). Na epiderme de aves, através da incorporação de precursores radioativos, além da biossíntese de ésteres do colesterol, foi verificada redução dos fosfolípidos durante a queratinização (FREINKEL, 1972a, b).

Por outro lado, FREINKEL & FIEDLER-WEISS (1974) verificaram, na epiderme do rato, que a biossíntese de esteróis e seus ésteres ocorre antes da queratinização, havendo, posteriormente, diminuição destes produtos. Os ésteres parecem não estar diretamente relacionados com a queratinização (FREINKEL & FIEDLER-WEISS, 1974), pois sua formação depende da presença de esteróis e de ácidos graxos livres, ambos liberados pela desintegração das citomembranas (lipofanerose), durante o processo de queratinização.

Deve ser salientado que na epiderme existe equipamento bioquímico adequado para a esterificação de esteróis, da mesma maneira que ocorre em outros órgãos que sintetizam esteróis (FREINKEL & ASO, 1969, 1971); assim, foi demonstrada, na epiderme, a presença de colesterol-esterase, importante na esterificação do colesterol. Foi, também, assinalado que a atividade da colesterol-esterase é máxima no citoplasma das células da camada granulosa e nas células transicionais da epiderme (FREINKEL & FIEDLER-WEISS, 1974), sugerindo que a esterificação do colesterol ocorra, principalmente, nessas áreas da epiderme. Os resultados histoquímicos, concernentes ao local de esterificação do colesterol, obtidos no presente trabalho, são

favoráveis a esta interpretação, pois embora tenha sido demonstrado que ésteres do colesterol são encontrados nos extratos periféricos da camada espinhosa, sua proporção parece aumentar na camada granulosa.

Tem sido geralmente admitido que a proporção de ésteres do colesterol aumente nas camadas periféricas da epiderme, sugerindo que eles se formem, tardiamente, durante o processo de queratinização. Por outro lado, dos ácidos graxos que esterificam o colesterol, alguns se identificam aos ácidos graxos epidérmicos; outros, ao contrário, são idênticos aos ácidos graxos da secreção sebácea (NICOLAIDES *et alii.*, 1970). Esses resultados, além de sugerirem esterificação do colesterol na superfície da epiderme, indicam que essa esterificação pode ser efetuada por ácidos graxos provenientes de duas origens.

HADLER & SILVEIRA (1981a), através do emprego de técnica histoquímica que permite distinguir o colesterol livre de seus ésteres, assinalaram a presença destes últimos no citoplasma dos queratinócitos mais periféricos da camada espinhosa, nos da camada granulosa e na membrana espessada das células queratinizadas; estes resultados indicam que a esterificação do colesterol inicia-se precocemente. Os resultados do presente trabalho, obtidos através dessa mesma técnica, revelam que o colesterol é sintetizado no interior do citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa, pequena parte do qual sofre esterificação nos extratos periféricos dessa camada, a julgar pelos resultados anteriormente expostos. Por outro lado, os resultados obtidos no presente trabalho, com as técnicas para demonstrar colesterol não esterificado e colesterol total sugerem que ambos ocorram em elevada proporção nos queratinócitos da camada granulosa.

Estes resultados confirmam dados bioquímicos de GRAY *et alii.* (1978a, b), de acordo com os quais na camada granulosa o colesterol e seus ésteres constituem os principais componentes dos lípides neutros, perfazendo 25,0% do total dos lípides.

Os resultados do presente trabalho revelam, ainda, que: 1 - o colesterol contido nos queratinócitos da camada espinhosa situa-se no citoplasma, sob forma difusa ou de finas granulações, sendo extraível pelo tratamento com metanol-clorofórmio; o situado nas células da camada granulosa resiste a esta extração, sugerindo ligação com proteínas; 2 - o compartimento

extracelular, na área correspondente à camada granulosa e aos extratos superiores da camada espinhosa, contém colesterol, que parece ligado à proteínas, a julgar pelas propriedades de solubilidade e pelo possível mascaramento de sua reatividade.

Estes resultados sugerem que o colesterol, sintetizado sob forma não esterificada, sofra esterificação e ligue-se com proteínas; sob esta última forma é encontrado nos queratinócitos da camada granulosa, nos quais incorpora-se ao folheto interno da membrana plasmática ou migra para o espaço intercelular. A incorporação das granulações, contendo colesterol, à membrana plasmática é sugerida pela presença de células da camada granulosa cheias de granulações ácido peracético-azul de toluidina positivas, mas cuja membrana plasmática não é reativa, nem se apresenta espessada; células contíguas, mas pertencentes à camada córnea (células de transição), não apresentam grânulos reativos no citoplasma, porém, a membrana se encontra espessada e fortemente reativa, sugerindo a deposição dos grânulos na face interna da membrana.

Por outro lado, nos queratinócitos da camada granulosa o colesterol parece se apresentar esterificado, em sua maior parte, pois as granulações citoplásmicas reativas são bem demonstradas após pré-tratamentos hidrolisantes especiais; ao contrário, o colesterol contido na membrana espessada das células queratinizadas se apresenta, principalmente, sob forma não esterificada, pois reage em ausência de pré-tratamentos. Estes resultados indicam que, durante a brusca transformação da célula granulosa na célula córnea, o colesterol esterificado, presente nos grânulos intracitoplásmicos, torne-se livre, em sua maior parte e, então, se deposite na face interna da membrana plasmática.

Entretanto, não pode ser relegada a hipótese segundo a qual o colesterol, no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, se apresente mascarado, por estar intimamente unido às prováveis proteínas. Nesta eventualidade, os tratamentos pelos agentes hidrolisantes estariam desmascarando o colesterol não esterificado, além de provocar hidrólise de seus ésteres.

Na porção superficial da epiderme, os resultados do presente trabalho indicam: 1 - o citoplasma das células queratinizadas não apresenta colesterol, nem seus ésteres, pois não reage às técnicas histoquímicas empregadas; 2 - a membrana es-

pessada das células queratinizadas, ao contrário, reage fortemente em ausência de pré-tratamento, sugerindo conter alto teor de colesterol não esterificado; 3 - a reatividade histoquímica da membrana espessada das células queratinizadas, nos extratos mais periféricos da camada córnea, é maior para colesterol total do que para colesterol não esterificado, indicando a presença de ésteres do colesterol, o que confirma a continuidade da esterificação do colesterol nos extratos mais periféricos da epiderme, geralmente aceita, conforme já foi assinalado; 4 - tanto o colesterol quanto seus ésteres, situados na membrana espessada das células queratinizadas, parecem estar ligados à proteínas, a julgar pelos resultados obtidos após a ação de solventes e de hidrolisantes.

Estes resultados confirmam parcialmente os de GRAY & YARDLEY (1975a, b), os quais demonstraram, através de técnicas bioquímicas, que a membrana espessada das células queratinizadas contém éster do colesterol, ou seja, sulfato de colesterol.

Os resultados do presente trabalho, concernentes à detecção histoquímica do íon sulfato, revelam a existência de substâncias dotadas deste íon, tanto na porção profunda quanto na porção superficial da epiderme; o efeito da extração pelo metanol-clorofórmio sugere que este material seja de natureza lipídica e não esteja ligado à proteínas, sob a forma de complexos. De acordo com esses resultados, embora tenha sido assinalada a presença de substâncias dotadas do íon sulfato, na porção superficial da epiderme, sua presença não pôde ser correlacionada com a membrana espessada das células queratinizadas e, portanto, não pôde ser correlacionada com o colesterol.

Por outro lado, o material dotado de íon sulfato se apresenta livre, pois é extraído pelo metanol-clorofórmio, ao contrário do colesterol, situado na membrana espessada das células queratinizadas, que se apresenta ligado à proteínas. Esta diferença sugere ausência de correlação entre o íon sulfato, detectado histoquimicamente, e o colesterol.

O colesterol e seus ésteres, sintetizados na epiderme, apresentam dois destinos (SILVEIRA & HADLER, 1981b): 1 - em parte, permanecem na periferia da célula granulosa, onde formam complexos com proteínas; quando a célula granulosa se transforma na célula córnea, localizam-se na face interna da membrana plasmática, participando de seu espessamento; 2 - outra parte atinge o compartimento extracelular, na altura da camada granu

losa, onde sofrem transformações metabólicas ou se apõem à superfície externa da membrana plasmática.

Nossos resultados indicam, além disso, que tanto o colesterol não esterificado, que predomina, quanto seus ésteres, estão presentes na membrana espessada das células queratinizadas e são eliminados com a descamação celular, confirmando a sugestão de diversos autores no que concerne à excreção do colesterol através da pele (ROTHMAN & SCHAAF, 1929; KILE *et alii.*, 1950; WILKINSON, 1969; GREENE *et alii.*, 1970; RAMASASTRY *et alii.*, 1970; NICOLAIDES *et alii.*, 1972).

Os resultados referentes à demonstração histoquímica do colesterol, anteriormente discutidos, referem-se à reação do ácido peracético-azul de toluidina, precedida ou não de pré-tratamentos convenientes. Cumpre destacar, contudo, que os resultados da reação do ácido peracético-reativo de Schiff foram concordantes com os da reação do ácido peracético-azul de toluidina. Por outro lado, verificou-se ausência de efeito inibidor da formalina-bicloreto de mercúrio nos locais da epiderme onde a reação do ácido peracético-azul de toluidina era positiva.

7 - Vitamina D presente na epiderme

São muito escassos os dados topoquímicos sobre a presença de vitamina D na epiderme. Através da técnica para a detecção histoquímica de vitamina D, proposta por HADLER & SILVEIRA (1977), foi evidenciada a presença desta vitamina nas camadas superficiais dos epitélios queratinizados, inclusive da epiderme (SILVEIRA & HADLER, 1977). Os primeiros estudos efetuados, no entanto, não foram convenientemente aprofundados, devido às dificuldades técnicas em se discriminar a vitamina D do colesterol; como consequência, não foi possível evidenciar onde ocorriam as transformações metabólicas do colesterol, que culminavam com a síntese da vitamina D. O emprego de técnicas histoquímicas específicas, que permitem discriminar o colesterol de seus ésteres e ambos da vitamina D, permitiu situar não somente o local onde se efetua a síntese do colesterol, no interior da epiderme, como também verificar onde ocorre sua transformação em vitamina D (HADLER & SILVEIRA, 1981a, b; SILVEIRA & HADLER, 1981a, b). Estas técnicas, todavia, não permitem discriminar a vitamina D do 7-deidrocolesterol; por este

motivo, toda vez que se fizer referência à vitamina D subentende-se que o 7-deidrocolesterol esteja, também, incluído.

Os resultados do presente trabalho, baseados nas reações do permanganato alcalino-azul de toluidina e do permanganato alcalino-Schiff, assim como na ação inibidora do bicloreto de mercúrio contido no fixador, indicam a presença de vitamina D e de 7-deidrocolesterol nos mesmos locais em que ocorre o colesterol, ou seja, na membrana espessada das células queratinizadas e no citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa. Estes resultados, além de confirmarem parcialmente os de RAUSCHKOLB *et alii*, (1969), que conseguiram isolar e identificar o 7-deidrocolesterol e a vitamina D em hidrolisados de pele, revelam, ainda, os locais em que a vitamina D e o 7-deidrocolesterol se situam na epiderme.

Na membrana espessada das células queratinizadas, a vitamina D está ligada à proteínas, pois não é extraída pelos tratamentos com metanol-clorofórmio ou com metanol-ácido clorídrico (metilação), mas é extraída pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, nas condições empregadas.

Na porção profunda da epiderme, os grânulos do citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, que contêm vitamina D, são mais definidos do que os grânulos que reagem positivamente ao ácido peracético-azul de toluidina (colesterol), sendo grosseiros em uma das espécies animais estudadas; a vitamina D, contida nesses grânulos, grosseiros, está labilmente ligada à proteínas, uma vez que, o tratamento por metanol-ácido clorídrico (usado para a metilação), extrai o material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo desses grânulos; o mesmo não ocorre com as granulações mais delicadas, encontradas na maioria das espécies animais estudadas, sugerindo que, nestas granulações, a ligação da vitamina D com prováveis proteínas seja mais estável. Os resultados obtidos após os pré-tratamentos, efetuados com metanol-clorofórmio, com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e com hidróxido de potássio, constituem evidências de que a vitamina D esteja provavelmente ligada com proteínas, nos grânulos citoplasmáticos dos queratinócitos da porção profunda da epiderme. A presença de proteínas, nessas granulações, será discutida oportunamente.

Nossos resultados revelam, também, que a membrana espessada das células queratinizadas não parece conter ésteres da vitamina D, pois os resultados da reação do permanganato

alcalino-azul de toluidina, nesta membrana, não são intensificados pelo tratamento com hidrolisantes, ao contrário do que ocorre com o colesterol, cuja proporção de ésteres, conforme já foi discutido, aumenta na porção superficial da epiderme. Além disso, não tem sido assinalada a presença de ésteres da vitamina D em organismos animais. Estes fatos foram considerados fundamentais no que concerne à interpretação dos resultados da reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, na porção profunda da epiderme. Assim sendo, embora essa reação tenha apresentado maior intensidade após o pré-tratamento com agentes hidrolíticos, a intensificação da reatividade foi interpretada não como dependente da presença de ésteres da vitamina D, mas sim como decorrente do mascaramento, pois esta vitamina, na porção profunda da epiderme, se apresenta sob a forma de complexos, provavelmente com proteínas, tendo em vista seu comportamento diante dos solventes utilizados. Nesses complexos, a vitamina D poderia apresentar sua reatividade mascarada.

Convém destacar que os agentes hidrolíticos, usados com a finalidade de cindir ésteres do colesterol e, eventualmente, da vitamina D, apresentam outros efeitos hidrolíticos, inclusive ação extrativa, que devem ser levados em consideração. Provavelmente devido a um efeito hidrolítico, atuam sobre o conteúdo do espaço intercelular, liberando material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo. Esta reatividade foi interpretada como consequência da liberação de vitamina D, que se encontrava mascarada sob a forma de complexo, provavelmente protéico. Nossos resultados sugerem que a vitamina D, tanto nos queratinócitos quanto no compartimento extracelular, se apresente ligada à proteínas; porém, no compartimento extracelular a estabilidade da ligação, aparentemente, é maior. A intensa reatividade do compartimento extracelular, para a reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, sugere que boa parte da vitamina D, da epiderme, esteja situada nesse local.

Nossos resultados histoquímicos indicam que a biossíntese da vitamina D se efetue nas camadas espinhosa e granulosa da epiderme. Estes resultados não concordam com os de GAYLOR & SAULT (1964), que admitiram que a síntese da vitamina D, na epiderme, ocorreria na superfície cutânea. Também DANIELS (1974), baseado em dados bioquímicos, supôs que a síntese da vitamina D se realizaria nas camadas mais superficiais da epiderme.

Os queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa

onde, de acordo com os nossos resultados histoquímicos, foi demonstrada a presença e sugerida a biossíntese de vitamina D, apresentam diversas atividades enzimáticas relacionadas com o metabolismo dos lípides (BRAUN-FALCO, 1956, 1958b; JARRETT & RILEY, 1963; EISEN *et alii.*, 1964; BRAUN-FALCO & RUPEC, 1967; ROWDEN, 1967, 1968; OLSON *et alii.*, 1968, 1969; RUPEC, 1970; SQUIER & WATERHOUSE, 1970; MIER *et alii.*, 1975; WOLFF-SCHREINER, 1977). Por outro lado, nestas mesmas células foram assinalados corpos lamelares que contêm, além de enzimas, lípides não polares, inclusive o colesterol (WOLFF-SCHREINER, 1977). A presença dessas enzimas e de colesterol, constitui mais um argumento a favor do intenso metabolismo lipídico, efetuado por estas células, o que corrobora com a hipótese de ser a biossíntese da vitamina D realizada por elas.

WOLFF-SCHREINER (1977) aventou a hipótese segundo a qual os corpos lamelares e seus derivados extracelulares, seriam os responsáveis pela conversão do colesterol em vitamina D₃. Esta hipótese, em parte, baseou-se nos resultados obtidos por WILGRAM *et alii.* (1970), os quais verificaram que a irradiação ultravioleta, da pele, provoca diminuição dos corpos lamelares no interior dos queratinócitos e concomitante aumento de sua passagem para o compartimento extracelular. Também são favoráveis a essa hipótese os resultados de BLACK & ANGLIN (1971), os quais verificaram que a irradiação ultravioleta determina aumento das proteínas e do colesterol nos homogeneizados da epiderme, ao mesmo tempo em que surgem partículas globulares, que apresentam alguma semelhança com os corpos lamelares.

De acordo com a hipótese de WOLFF-SCHREINER (1977), os corpos lamelares seriam o local de biossíntese e armazenamento do colesterol e de sua transformação em vitamina D₃; no entanto, não seria esta a única função dos corpos lamelares, pois eles existem na epiderme de animais que não sintetizam vitamina D (RAUSCHKOLB *et alii.*, 1969). ELIAS *et alii.* (1979a), também, admitem que os corpos lamelares poderiam sintetizar colesterol e seus ésteres, pois eles contêm esteróis, além de glúcides neutros; estes últimos constituem evidência da presença de glicosfingolípides. Estes resultados sugerem que os corpos lamelares sintetizam glicolípides e colesterol, que são transformados, respectivamente, em ceramidas e ésteres do colesterol (ELIAS *et alii.*, 1979a).

Com base em estudos citoquímicos, efetuados na epiderme, ELIAS *et alii*. (1979a) mostraram que durante a queratinização ocorrem grandes alterações morfológicas e histoquímicas dos corpos lamelares, situados no compartimento extracelular correspondente às camadas granulosa e córnea; nestas mesmas camadas ocorrem, simultaneamente, modificações da composição lipídica. Nelas passam a ser encontrados lípidos neutros e polares, tanto dentro quanto entre as células.

Nossos resultados indicam que a biossíntese do colesterol e da vitamina D se efetuam no interior dos queratinócitos, da porção profunda da epiderme, sendo estas substâncias, parcialmente, transferidas para o compartimento extracelular. Considerando que o material permanganato alcalino-azul de toluidina positivo apresenta aspecto granular e que os corpos lamelares são os únicos orgânulos dos queratinócitos que migram do interior da célula para o compartimento extracelular, nossos resultados são favoráveis à hipótese de WOLFF-SCHREINER (1977).

No que diz respeito à ligação entre vitamina D e proteínas, originando complexos, conforme sugerem nossos resultados, deve ser assinalado que NOVIKOFF & GOLDFISCHER (1961) e NOVIKOFF *et alii*. (1962) verificaram a presença de atividade nucleosídeo difosfatásica, no retículo endoplasmico das células que sintetizam esteróides e os conjugam com proteínas. Esta enzima está presente nos queratinócitos (WOLFF-SCHREINER, 1977), sugerindo que estas células sejam capazes de conjugar esteróis com proteínas e, portanto, estejam aptas a conjugar proteínas com o colesterol ou com a vitamina D. De acordo com os resultados histoquímicos do presente trabalho, a vitamina D se apresenta ligada à proteínas, mesmo no interior dos queratinócitos.

Nossos resultados indicam que a vitamina D, sintetizada na epiderme, situa-se, no decorrer do processo de queratinização, principalmente em três locais: 1 - no citoplasma das células da camada granulosa, nas proximidades da membrana plasmática, onde se apresenta ligada à proteínas, resistindo à ação de solventes e de agentes hidrolíticos; 2 - em toda a extensão do compartimento extracelular, da porção profunda da epiderme, onde se apresenta tão intimamente ligada à proteínas que sua reatividade está mascarada; 3 - na membrana espessada das células queratinizadas, onde se apresenta ligada à proteínas, mas é reativa.

A vitamina D, do interior das células da camada granulosa, é parcialmente responsável pelo espessamento da membrana das células queratinizadas, da mesma maneira que o colesterol, conforme já foi discutido.

Convém salientar que a vitamina D, após ter sido sintetizada na porção profunda da epiderme e formar complexos com proteínas, apresenta dois destinos: atinge o compartimento extracelular ou permanece no interior dos queratinócitos, passando, quando situada neste último local, a integrar a membrana espessada das células queratinizadas.

A fração da vitamina D que se dispõe na face interna da membrana espessada das células queratinizadas, provém das granulações intracitoplásmicas dos queratinócitos da camada granulosa. Estas granulações, que são permanganato alcalino-azul de toluidina positivas, desaparecem bruscamente do interior do queratinócito quando ele se transforma na célula córnea. Simultananeamente, a membrana espessada das células córneas, passa a reagir positivamente à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, sugerindo que as granulações se depositem na face interna dessa membrana. Esta fração da vitamina D é eliminada através da descamação celular da camada córnea, juntamente com o colesterol.

No entanto, deve ser considerado que embora uma porção da vitamina D, situada no compartimento extracelular, seja absorvida pelo organismo (HADLER & SILVEIRA, 1981b), outra porção permanece nesse compartimento, durante a evolução do processo de queratinização, confundindo-se com a superfície externa da membrana espessada das células queratinizadas. Portanto, ao se considerar a presença da vitamina D, na membrana espessada das células queratinizadas, deve ser admitido que embora predomine em sua face interna ocorra, também, em sua face externa.

A presença de vitamina D na membrana espessada das células queratinizadas sugere sua participação na queratinização epidérmica.

8 - Tocoferol presente na epiderme

Através da positividade das reações do ácido perfórmico-azul de toluidina e do ácido perfórmico-Schiff, assim como do efeito inibidor da formalina-bicloreto de mercúrio, demons

trou-se a presença de tocoferol na membrana espessada das células queratinizadas da epiderme. Neste local, o tocoferol parece estar ligado às proteínas, uma vez que a reatividade não é afetada pelo tratamento com metanol-clorofórmio; o material responsável pela positividade, ou seja, o tocoferol, é totalmente removido pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e parcialmente extraído pelo tratamento com hidróxido de potássio ou com peridrol-amônia. Convém assinalar que o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico exerce maior efeito extrativo sobre o tocoferol, situado na membrana espessada das células queratinizadas, quando é usado à 60°C, o que sugere ser bastante estável a ligação entre o tocoferol e prováveis proteínas.

Por outro lado, na porção profunda da epiderme, após desmascaramento com hidróxido de potássio ou com peridrol-amônia, aparece material que reage como o tocoferol, no compartimento extracelular.

Embora o tocoferol, tanto na membrana espessada das células queratinizadas quanto no espaço intercelular da porção profunda da epiderme, se comporte como se estivesse unido às proteínas, há evidências de que o grau de ligação, nesses dois locais, seja diferente. As evidências decorrem do efeito de alguns tratamentos; assim, quando se efetua a metilação, o tocoferol da porção profunda da epiderme é extraído, ao contrário do situado na membrana espessada das células queratinizadas; após o tratamento pelo peridrol-amônia, o tocoferol da membrana espessada é parcialmente extraído, enquanto que o situado no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme é desmascarado, sem ser removido.

A presença de tocoferol, nas camadas superficiais da epiderme e de outros epitélios queratinizados, foi assinalada por SILVEIRA & HADLER (1977) e HADLER & SILVEIRA (1981c). O isolamento do produto reativo e sua identificação com o α -tocóferol, através de cromatografia em camada fina, foi efetuado por HADLER & SILVEIRA (1979, 1981d), os quais demonstraram que o α -tocóferol apresenta-se ligado às proteínas, formando complexo lipoprotéico. Este complexo contém, também, colesterol e vitamina D (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados).

Após o desmascaramento pelo hidróxido de potássio, o tocoferol foi demonstrado no espaço intercelular da porção profunda da epiderme (SILVEIRA & HADLER, 1980a). Estes resultados foram confirmados no presente trabalho, tendo sido verificado,

além disso, resultados semelhantes após o tratamento com peridrol-amônia. Devido ao local em que se encontra o tocoferol, na porção profunda da epiderme, e por se apresentar intimamente associado às outras substâncias, a ponto de ter sua reatividade mascarada, pode-se supor que o tocoferol apresente origem extra-epidérmica. Proveniente do derma, atingiria o compartimento extracelular epidérmico, onde circularia até atingir o espaço entre os queratinócitos mais periféricos da camada granulosa; nesse local, onde normalmente ocorre oclusão funcional do espaço intercelular, se incorporaria à superfície externa da membrana plasmática das células queratinizadas, contribuindo para seu espessamento. Uma vez incorporado à membrana espessada seria eliminado através da descamação celular. Esta hipótese parece muito sugestiva, embora não tenha sido comprovada.

Por outro lado, deve ser também considerada a seguinte hipótese (SILVEIRA & HADLER, 1980a): o tocoferol existiria na membrana plasmática das células de todas as camadas da epiderme; estaria mascarado nos queratinócitos da porção profunda, onde tem início o processo de queratinização e a membrana plasmática possui espessura normal. Ao contrário, apresenta-se reativo e mais abundante na membrana espessada das células queratinizadas. Estes fatos indicam que, durante o processo de queratinização, a membrana plasmática, além de modificações morfológicas, apresentaria diferenças quanto à reatividade histoquímica. Uma destas diferenças estaria relacionada com a estabilidade da ligação do tocoferol com outros componentes da membrana plasmática, provavelmente protéicos.

9 - Material ferricianeto férrico positivo presente na epiderme

Conforme foi anteriormente assinalado (SILVEIRA & HADLER, 1980b), a epiderme contém diversas substâncias capazes de reagir positivamente com a reação do ferricianeto férrico; dentre estas, destacam-se as proteínas dotadas de cisteína e tirosina, relacionadas com a "queratina", o tocoferol e a vitamina D, estes últimos situados na membrana espessada das células queratinizadas. Devido às múltiplas substâncias reativas, situadas na epiderme, a interpretação do significado da reação do ferricianeto férrico exige o uso de bloqueador, associado com a remoção seletiva das substâncias reativas. Como bloquea

dor foi usado o bicloreto de mercúrio, que inibe a reatividade da cisteína e da tirosina, sem interferir na reatividade do tocoferol e da vitamina D, à reação do ferricianeto férrico. A remoção seletiva foi obtida através do emprego dos seguintes tratamentos: 1 - metanol-clorofórmio, que extrai lípides livres; 2 - metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que extrai o tocoferol e a vitamina D da membrana espessada, além de cindir complexos lipoprotéicos do citoplasma das células queratinizadas, sem extraí-los e de remover material lipídico situado na porção profunda da epiderme; 3 - ácido perfórmico, que extrai complexos lipoprotéicos do citoplasma e fosfolípidos da membrana espessada das células queratinizadas, sem afetar a reatividade do tocoferol situado nesta última estrutura; além disso, na porção profunda da epiderme, este tratamento desmascara a reatividade de grânulos, semelhantes aos de queratoialina, que se tornam positivos à reação do ferricianeto férrico.

Neste trabalho, através da reação do ferricianeto férrico, confirmou-se a presença de substâncias reativas não mascaradas na porção profunda da epiderme, principalmente, em seus extratos mais periféricos. A reatividade desse material, que se apresenta sob aspecto difuso, é parcialmente inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, mas não é afetada pelo tratamento com metanol-clorofórmio; esta reatividade aumenta quando se efetua o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, pelo hidróxido de potássio ou pelo ácido perfórmico; estes resultados sugerem que material reativo é desmascarado por estes três últimos tratamentos. Convém salientar que o material ferricianeto férrico positivo, da epiderme, é Schiff negativo, conforme mostram os resultados por nós obtidos.

De acordo com o que foi exposto, a epiderme contém dois tipos de substâncias ferricianeto férrico positivas; o primeiro compreende aquelas que reagem independentemente de qualquer pré-tratamento; o segundo tipo engloba substâncias que exigem pré-tratamento para se tornarem reativas, estando mascaradas. Dentre estas últimas devem ser consideradas, separadamente, as que se tornam reativas após tratamento com ácido perfórmico e as que reagem depois do tratamento pelo hidróxido de potássio.

O material ferricianeto férrico positivo, após desmascaramento pelo hidróxido de potássio, apresenta característi

cas morfológicas e topográficas semelhantes às das granulações de vitamina D, situadas nos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa. A referida semelhança pôde ser bem estabelecida em uma das espécies animais estudadas (gambá), na qual a vitamina D se apresenta no interior de grânulos grosseiros, situados nos queratinócitos da porção profunda da epiderme.

Por outro lado, o material que se torna ferricianeto férrico positivo, após desmascaramento pelo tratamento com ácido perfórmico, apresenta características morfológicas dos grânulos de queratoialina, o que sugere identidade entre ambos. A reatividade destes grânulos desaparece após o tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. Estes resultados indicam que os grânulos de queratoialina contêm material redutor, cuja reatividade se apresenta mascarada, o qual é extraído pelo pré-tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico.

Material ferricianeto férrico positivo é, também, encontrado no citoplasma das células queratinizadas, o qual, todavia, não é granular, não se apresenta mascarado e é extraído pelo tratamento com ácido perfórmico. Estes resultados sugerem que os grânulos de queratoialina não só perdem a característica granular, como, também, modificam sua reatividade, quando passam a tomar parte da constituição do citoplasma das células queratinizadas. Uma das alterações da reatividade consiste em reagir com a reação do ferricianeto férrico sem prévio desmascaramento, o que pode decorrer do menor grau de interligação dos componentes da queratoialina.

Na porção superficial da epiderme, a positividade do citoplasma das células queratinizadas, à reação do ferricianeto férrico, é parcialmente inibida pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio, não é afetada pelo tratamento com metanol-clorofórmio, mas é diminuída pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e, principalmente, pelo ácido perfórmico, o que indica remoção do material reativo. Convém salientar que o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara material sudanófilo (lípidos) do citoplasma das células queratinizadas, sem extraí-lo. Por outro lado, o tratamento pelo ácido perfórmico remove material lipoprotéico do citoplasma das células queratinizadas, pois após esse tratamento diminui tanto a sudanofilia quanto a reatividade à reação do DDD, do citoplasma das células queratinizadas. Assim sendo, e como esse tratamento remove, simultaneamente, o material ferricianeto férrico positi-

vo, deve haver relação entre o material sudanófilo, o DDD positivo e o ferricianeto férrico positivo, situados no citoplasma das células queratinizadas. Esta hipótese foi analisada através do efeito do pré-tratamento pelo ácido perfórmico; após este tratamento, há desmascaramento de material sudanófilo granular no citoplasma das células queratinizadas, material este que, todavia, não é ferricianeto férrico positivo. Este resultado sugere que o componente protéico da lipoproteína seja ferricianeto férrico reativo, uma vez que o componente lipídico não é reativo a esta reação. Corroborando com esta hipótese está o fato de que os grânulos, semelhantes aos de queratoialina, situados no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa e que têm sua reatividade desmascarada pela ação do ácido perfórmico, não adquirem sudanofilia após este tratamento, embora apresentem forte positividade à reação do ferricianeto férrico.

Ao contrário, na membrana espessada das células queratinizadas, o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou pelo ácido perfórmico determinam forte aumento de reatividade à reação do ferricianeto férrico, quando usados isoladamente, provavelmente devido ao efeito desmascarante.

Convém assinalar que o aumento da reatividade da membrana espessada das células queratinizadas, após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, indica que o material potencialmente reativo, além de não ser extraído, torna-se efetivamente reativo. Como o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico extrai lípides contendo colina, colesterol, tocoferol e vitamina D, essas substâncias não podem ser responsáveis pela reatividade desmascarada.

Convém lembrar que após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, seguido do tratamento pelo ácido perfórmico, o material ferricianeto férrico reativo, da membrana espessada, é extraído.

A reatividade da membrana espessada é, parcialmente, afetada pela fixação com formalina-bicloreto de mercúrio; ao contrário, a reatividade do tocoferol (HADLER & SILVEIRA, 1981c, d) e da vitamina D (SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados), à reação do ferricianeto férrico, não são inibidas por esta fixação, sugerindo que essas substâncias poderiam ser apenas parcialmente responsáveis por essa reatividade. Além disso, o tratamento pelo ácido perfórmico, que remove os lípidos contem

do colina da membrana espessada das células queratinizadas, sem remover o tocoferol, ao mesmo tempo que aumenta a reatividade à reação do ferricianeto férrico, também constitui argumento favorável à hipótese de ser o tocoferol, parcialmente, responsável pela reatividade desmascarada; também permite supor que o desmascaramento da reatividade do tocoferol, à reação do ferricianeto férrico, seja consequência de cisão da ligação entre o tocoferol e fosfolípidos contendo colina; os quais são extraídos pelo tratamento com ácido perfórmico.

Conforme se verifica através dos resultados discutidos, a reatividade do citoplasma das células queratinizadas advém da presença de substâncias diferentes das responsáveis pela reatividade da membrana espessada, tendo em vista a diversidade quanto às propriedades apresentadas por estas substâncias. O confronto dos resultados sugere que a substância ferricianeto férrico positiva, do citoplasma das células queratinizadas, é de natureza protéica. Ao contrário, o material ferricianeto férrico reativo da membrana espessada apresenta propriedades que sugerem ser de natureza lipídica; não obstante, esse material reativo parece destituído de fosfolípidos contendo colina, havendo evidências da presença de tocoferol e vitamina D.

Os resultados do presente trabalho confirmam investigações anteriores (HADLER & SILVEIRA, 1980), as quais mostraram que frações lipídicas, isentas de proteínas, extraídas da epiderme humana, reagem positivamente à reação do ferricianeto férrico, sendo a reatividade pouco influenciada pelo tratamento com o bicloreto de mercúrio; frações protéicas reagem mais fracamente à reação do ferricianeto férrico, sugerindo que a positividade desta reação, nas frações dos extratos de epiderme, decorresse, principalmente, de substâncias de natureza lipídica.

Através do emprego do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e da ação de solventes, SILVEIRA & HADLER (1980b) sugeriram que a reatividade da membrana espessada das células queratinizadas estaria relacionada com a presença de complexos lipoprotéicos contendo tocoferol e vitamina D. Estes resultados foram confirmados mediante o emprego de cromatografia em camada fina, efetuada em extratos de epiderme; esta técnica permitiu isolar um complexo lipoprotéico, cuja hidrólise, pelo hidróxido de potássio, libera uma porção protéica e uma lipídica, esta última dotada de α -tocopherol, de colesterol e de vitamina D.

(HADLER & SILVEIRA, 1981d; SILVEIRA & HADLER, resultados não publicados).

Com base no emprego do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e da extração seletiva com diversos solventes; SILVEIRA & HADLER (1980b) mostraram que a reatividade das células queratinizadas, à reação do ferricianeto fêrrico, decorre da presença de substâncias diversas. Na membrana espessada, a positividade relaciona-se com o tocoferol e a vitamina D; no citoplasma das células queratinizadas, complexos lipoprotêicos são responsá-veis pela reatividade, os quais, sob a ação do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, tornam-se mais reativos e pelo tratamento com ácido perfórmico são extraídos. Os resultados do presente trabalho confirmam os anteriormente citados.

GOLODETZ & UNNA (1909) assinalaram que a reação do ferricianeto fêrrico era positiva na "queratina" epidérmica; CHÈVREMONT & FREDERIC (1943) verificaram positividade, também, dos grânulos de queratoialina. Estes dois últimos autores assinalaram, além disso, que na epiderme humana e do cobaio a reação do ferricianeto fêrrico era fraca nos extratos mais profundos, passando a forte na camada granulosa, sendo negativa na camada córnea. Além disso, os autores correlacionaram essa reação com a presença de proteínas dotadas de grupo sulfidríla. Nos resultados não confirmam os dos autores citados, uma vez que, nas condições por nós utilizadas, a reação do ferricianeto fêrrico é mais forte na camada córnea do que em todas as outras camadas da epiderme e está mais relacionada com produtos de natureza lipídica do que com proteínas.

10 - Material de natureza protéica presente na epiderme

Os principais motivos de terem sido utilizadas, no presente trabalho, técnicas para demonstrar proteínas, foram: 1 - localizar, topograficamente, substâncias protéicas em cortes histológicos não submetidos e submetidos à diversos pré-tratamentos; 2 - através da comparação dos resultados, deduzir qual a ação dos pré-tratamentos sobre os componentes protéicos da epiderme.

As reações usadas, no presente trabalho, revelam, na porção profunda da epiderme, grânulos reativos no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa. Além disso, os grânulos de queratoialina apresentam reação positiva; a reatividade destes

grânulos torna-se mais evidente quando se efetua a reação da aloxana-Schiff, precedida do tratamento pelo hidróxido de potássio, que parece ter ação desmascarante. No compartimento extracelular, também, ocorre material reativo, porém melhor demonstrável após o efeito desmascarante do ácido perfórmico ou quando se efetua a reação do DDD após tratamento pelo tioglicolato de sódio.

Na porção superficial da epiderme, as células queratinizadas reagem fortemente; a reatividade atinge tanto o citoplasma quanto a membrana espessada.

Estes resultados revelam que as células queratinizadas apresentam grande concentração de proteínas, tanto no citoplasma quanto na membrana espessada. Sugerem, também, que nas primeiras fases do processo de queratinização o material protéico aumenta no interior dos queratinócitos, principalmente dos situados na camada granulosa.

Quando se efetua tratamento pelo ácido perfórmico, há remoção do material reativo, à reação do DDD, do citoplasma das células queratinizadas e, por outro lado, aumento da reatividade da membrana espessada. Este resultado indica que o tratamento pelo ácido perfórmico, aparentemente, não extrai proteínas da membrana espessada; fato semelhante ocorre após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. O tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico determina, no entanto, extração do material reativo do citoplasma das células queratinizadas. Estes resultados sugerem que a interrelação das proteínas com os outros componentes do complexo lipoprotéico é diferente na membrana espessada e no citoplasma das células queratinizadas. Sugerem, além disso, que o ácido perfórmico extrai proteínas situadas no citoplasma das células queratinizadas, apresentando efeito desmascarante sobre as proteínas da membrana espessada; aliás, conforme já foi discutido anteriormente, o ácido perfórmico extrai lipoproteínas do citoplasma das células queratinizadas. Por outro lado, o metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que também extrai proteínas do citoplasma, simultaneamente, apresenta efeito desmascarante sobre o material sudanófilo aí situado, indicando que determina cisão do complexo lipoprotéico, com extração apenas da porção protéica.

Convém assinalar que o tratamento pelo ácido perfórmico desmascara grânulos, aloxana-Schiff positivos, situados no

citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa; estes grânulos são tioglicolato-DDD positivos e morfologicamente semelhantes aos que reagem positivamente à reação do permanganato alcalino-azul de toluidina, o que indica a presença de vitamina D; por outro lado, a presença de proteína sugere que a vitamina D esteja constituindo complexo lipoprotéico; esse complexo é cindido pela ação do tratamento pelo ácido perfórmico, com des mascaramento da porção protéica. Estas propriedades, apresentadas pelo grânulos dos queratinócitos da camada granulosa, são muito semelhantes às propriedades do componente protéico da membrana espessada das células queratinizadas, sugerindo relação entre ambos. De acordo com esta interpretação, proteínas de granulações citoplásmicas, dos queratinócitos da camada granulosa, participariam da constituição protéica da membrana espessada das células queratinizadas; de modo análogo, a vitamina D, contida nesses grânulos, conforme nossa interpretação, participa da constituição lipídica dessa membrana.

11 - Síntese sobre a correlação entre os lípides intraepidérmicos e a queratinização

Os lípides constituem 10,0 a 15,0% do peso seco da epiderme; desse total 10,0% correspondem aos esteróis, 15,0% aos fosfolípidos e 60,0% aos ácidos graxos livres ou combinados; dentre os esteróis, foram identificados o colesterol, que predomina, o latosterol e o lanosterol (WHEATLEY, 1965; OHKIDO *et alii.*, 1974). WHEATLEY *et alii.* (1964) mostraram que na camada córnea, da epiderme humana, há 3,0 a 9,0% de lípidos; distinguiram dois tipos de lípidos: 1 - solúvel em etanol, após extração prolongada; 2 - lípidos ligados à "queratina" (insolúveis em etanol). De ambos isolaram: ácidos graxos, triglicérides, esteróis e ésteres de esteróis, ceras e um material polar lipoprotéico associado com fosfolípidos.

Por outro lado, a camada córnea é constituída por células queratinizadas, separadas entre si pelo espaço intercelular; estas células apresentam membrana espessada, que envolve o citoplasma; este, por sua vez, é constituído por fibrilas, pouco eletrodensas, envolvidas por matriz interfilamentosa opaca (BRODY, 1959a, b; 1960a, b; 1977). A proporção relativa entre as fibrilas e a matriz interfilamentosa é aproximadamente de 1:1, havendo, no entanto, variações de acordo com o tipo de

célula queratinizada (MERCER, 1961; DOWNES *et alii.*, 1963). Ambos os componentes apresentam proteínas específicas, conforme já foi analisado no capítulo da introdução.

Com base na difração dos raios X (SWANBECK, 1959; SWANBECK & THYRESSON, 1962), foi sugerido que a "queratina" consistia de fibrilas protéicas, com 25 nm de espessura, circundadas por uma camada de fosfolípidos, de 8 nm de espessura; os lípidos pareciam dispor-se sob forma de membrana bimolecular. Esta estrutura foi aceita, também, por BRODY (1972). Além disso, SWANBECK (1959) admitiu que os lípidos seriam derivados das estruturas membranosas celulares e participariam da constituição da queratoialina; esta, por sua vez, seria responsável pela formação da cobertura lipídica das fibrilas de "queratina". Os resultados do presente trabalho concordam parcialmente com esta interpretação, pois embora não evidenciem a existência de lípidos nos grânulos de queratoialina, por outro lado, revelam a presença de fosfolípidos no mesmo local em que estão situadas as fibrilas de "queratina", ou seja, no citoplasma das células queratinizadas; todavia, nossos resultados revelam, também, a presença de fosfolípidos relacionados com os tonofilamentos dos queratinócitos da camada espinhosa, o que constitui argumento em favor de que os fosfolípidos se relacionem com os filamentos de pré-queratina, numa fase da diferenciação celular em que ainda não ocorreu a lipofanerose. Estes resultados revelam que a associação entre os fosfolípidos e a "queratina" precede a lipofanerose, sugerindo que os fosfolípidos são especialmente sintetizados pelos queratinócitos, para cumprirem essa finalidade.

Os resultados, fornecidos pela espectroscopia dos raios X da "queratina", sugeriam que os lípidos se incorporavam às proteínas, durante o processo de queratinização da epiderme (GOLDSMITH & BADEN, 1970); a transformação da pré-queratina em "queratina" ocorreria simultaneamente com o aparecimento dos lípidos, os quais se apresentavam orientados em relação ao eixo dos filamentos da proteína fibrosa. Este conceito está de acordo com a nossa interpretação dos resultados do presente trabalho.

GOLDSMITH & BADEN (1970) e BADEN & GOLDSMITH (1972) admitiram que o componente lipídico da "queratina" epidérmica, responsável pela reflexão específica do espectro dos raios X, dispunha-se sob a forma de longas cadeias lipídicas, que se orien-

tavam perpendicularmente ao eixo do filamento protéico; o lípide era insolúvel em hexano e solúvel em metanol-clorofórmio (1:3) tendo, portanto, caráter polar. Embora sua estrutura química não tenha sido identificada, o espectro de difração dos raios X sugeria que fosse diferente dos lípides comumente assinalados na epiderme. Além disso, a espectroscopia de massa mostrou que seu P.M. era de 284 daltons (GOLDSMITH & BADEN, 1970; BADEN & GOLDSMITH, 1972). A ligação entre a proteína fibrosa e o lípide não parecia ser muito estável, uma vez que o componente lipídico era removido pelo tratamento com metanol-clorofórmio, sendo, por isso, extraído durante a purificação da proteína (GOLDSMITH & BADEN, 1970).

Os resultados do presente trabalho constituem evidências de que a proteína fibrosa, das fibrilas de "queratina", esteja associada com fosfolípidos dotados de colina. Esta associação é rompida pelo tratamento com ácido perfórmico, que extrai proteínas e lípidos do citoplasma das células queratinizadas. O metanol-clorofórmio, nas condições empregadas no presente trabalho, não tem ação extrativa sobre o lípide. A discordância entre este resultado e os de GOLDSMITH & BADEN (1970) talvez decorra da fixação pela formalina-cálcio, usada por nós.

De acordo com o conceito estabelecido com base nos resultados fornecidos pela espectroscopia dos raios X, o citoplasma das células queratinizadas apresentaria proteínas interrelacionadas com lípidos, o que foi confirmado pelos nossos resultados histoquímicos, os quais demonstram, no entanto, que os lípidos aí situados estão mascarados. Além disso, nossos resultados sugerem que os queratinócitos sintetizem fosfolípidos, que participam da constituição da "queratina" epidérmica.

Conforme nossos resultados, os lípidos contidos no citoplasma das células queratinizadas apresentam-se mascarados e, por isso, não são revelados, histoquimicamente, a não ser após pré-tratamento conveniente. Devido a este motivo, as técnicas histoquímicas, anteriormente usadas, não haviam demonstrado lípides no interior das células córneas, mesmo as utilizadas em trabalhos mais recentes (ELIAS *et alii.*, 1977c, 1979a). O tratamento por metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que remove o componente lipídico da membrana espessada, tem efeito desmacarante sobre os lípidos do citoplasma das células queratinizadas, indicando que a associação entre lípidos e proteínas é diferente nos dois locais. Após o desmascaramento, a coloração

do citoplasma das células queratinizadas pelo negro de Sudan é intensa, sugerindo alta proporção de lípidos. Além disso, o desmascaramento também determina aumento da reatividade do citoplasma para lípidos contendo colina. Estes fatos, associados com a ausência de colesterol, vitamina D, tocoferol e material PAS positivo, no citoplasma das células queratinizadas, sugerem que os lípidos, aí contidos, sejam bem diferentes dos situados na membrana espessada. A reação para o íon fosfato, após o tratamento pelo peridrol-amônia, que tem efeito desmascarante, é positiva no citoplasma das células queratinizadas, sugerindo que estes lípidos sejam, em parte, fosfolípidos contendo colina.

A sudanofilia do citoplasma das células queratinizadas, que é revelada após desmascaramento, é mais intensa do que a dos queratinócitos das outras camadas da epiderme. Este resultado sugere que a proporção de material sudanófilo intracelular aumente com o progredir do processo de queratinização. Parte dos lípidos do citoplasma das células queratinizadas é constituída pelos lípidos associados com as tonofibrilas, demonstrados desde a camada espinhosa; outra parte deve ser proveniente dos lípidos liberados pelas membranas dos queratinócitos, que são destruídas nas fases finais do processo de queratinização (lipofanerose). Dos lípidos que participam da constituição da membrana espessada das células queratinizadas, alguns são sintetizados pelos queratinócitos da porção profunda da epiderme; dentre eles destacam-se o colesterol e a vitamina D, situados nas faces externa e interna da membrana espessada.

Admite-se que lípidos do citoplasma das células queratinizadas integrem, também, a matriz interfilamentosa, uma vez que foi sugerido que a matriz das células córneas conteria grande proporção de lípidos, além de pequena proporção de glúcides e substâncias hidrossolúveis, associados à fração protéica (SPIER *et alii.*, 1954; MATOLTSY & BALSAMO, 1955; MATOLTSY, 1958, 1964c; MATOLTSY & MATOLTSY, 1963; CROUNSE, 1965; GOLDSMITH & BADEN, 1970; SCHEUPLEIN & BLANK, 1971; LEE & BADEN, 1975; BADEN *et alii.* 1976); esses lípidos estariam relacionados com a "queratina". Nos resultados histoquímicos não permitem estabelecer distinção entre as fibrilas de "queratina" e a matriz interfilamentosa; por este motivo, ambas foram consideradas em conjunto, sob a denominação de "citoplasma da célula queratinizada". Nele foi demonstrada a presença de fosfolípidos mascarados, confor

me já foi discutido.

Todavia, embora os resultados histoquímicos, fornecidos pelas técnicas utilizadas, não permitam discriminar os componentes citoplásmicos das células queratinizadas, a relação entre os lípidos e as proteínas, desses componentes, pode ser deduzida, indiretamente, através desses mesmos resultados. Assim, a relação entre as fibrilas de "queratina" e os lípidos do citoplasma das células queratinizadas foi admitida com base na associação entre os tonofilamentos e os lípidos mascarados, verificada, precocemente, no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa; esta associação foi considerada persistente durante o processo de queratinização, uma vez que a espectroscopia dos raios X indica a presença de lípidos associados com as fibrilas de "queratina". A relação entre a matriz interfilamentosa e os lípidos mascarados, do citoplasma das células queratinizadas, foi deduzida com mais dificuldade e baseada nos seguintes fatos :

- 1 - o conteúdo de lípidos mascarados do citoplasma das células queratinizadas, estimado através da sudanofilia após desmascaramento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, é desproporcionalmente maior em comparação com o material sudanófilo mascarado, situado nos queratinócitos da porção profunda da epiderme; este resultado sugere que há adição de material sudanófilo suplementar nas células queratinizadas, o qual se apresenta mascarado;
- 2 - enquanto os lípidos mascarados do citoplasma das células queratinizadas tornam-se sudanófilos após o pré-tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, os do citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme são desmascarados pelo tratamento com hidróxido de potássio; esta diferença de comportamento, diante de agentes hidrolíticos, sugere diversidade entre ambos;
- 3 - o pré-tratamento por metanol-clorofórmio-ácido clorídrico permite revelar granulações sudanófilas, no citoplasma dos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, ao mesmo tempo que extrai os lípidos associados com os tonofilamentos, indicando diferença de comportamento entre ambos;
- 4 - o pré-tratamento pelo ácido perfórmico desmascara lípidos do citoplasma das células queratinizadas, os quais apresentam características morfológicas peculiares e diferentes das dos lípidos desmascarados pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, o que sugere a existência de mais de um tipo de lípide mascarado, no citoplasma das células queratinizadas;
- 5 - o tratamento prévio pelo metanol-clorofórmio-ácido clo

clorídrico extrai o material sudanófilo do citoplasma das células queratinizadas, desmascarável pelo ácido perfórmico, sugerindo que as substâncias desmascaradas pelo ácido perfórmico e pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, seriam diferentes. Estes fatos constituem evidências de que o citoplasma das células queratinizadas conteria, pelo menos, dois tipos de lípides mascarados, um poderia estar associado com as fibrilas de "queratina" e seria desmascarado pelo ácido perfórmico; o outro estaria relacionado com a matriz interfilamentosa e seria desmascarado pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. O principal argumento em favor desta hipótese é o seguinte: o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, ao mesmo tempo que desmascara lípides situados no citoplasma das células queratinizadas e de queratinócitos da porção profunda da epiderme, sem extraí-los, remove os fosfolípides relacionados com os tonofilamentos; estes resultados sugerem que os lípides desmascarados pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico não sejam os relacionados com os tonofilamentos e com as fibrilas de "queratina"; estes lípides seriam os relacionados com a matriz interfilamentosa das células queratinizadas.

Por outro lado, de acordo com os nossos resultados, os grânulos de queratoialina não apresentam lípides demonstráveis histoquimicamente; como a matriz interfilamentosa possui lípidos, é provável que ela não se origine exclusivamente dos grânulos de queratoialina, ao contrário do que tem sido admitido por BRODY (1959a), MERCER (1961) e MATOLTSY (1975).

A membrana das células queratinizadas, que se apresenta espessada em toda sua extensão (BRODY, 1951a, 1966, 1968, 1969; FARQUHAR & PALADE, 1965; FARBMAN, 1966; HASHIMOTO, 1969, 1971a; RAKNERUD, 1974), consiste de uma ampla zona interna e da membrana plasmática propriamente dita, apresentando, o conjunto, cerca de $170 \pm 10 \text{ \AA}$ de espessura (BRODY, 1969). Durante o espessamento da membrana, substância eletrodensa deposita-se em sua face interna, confundindo-se com seu folheto interno (FARBMAN, 1966), substância esta de natureza desconhecida. Nos resultados histoquímicos sugerem que este material eletrodenso poderia ser constituído por complexos lipoprotéicos contendo, além de proteínas, colesterol, ésteres do colesterol e vitamina D, uma vez que estas substâncias foram demonstradas no interior dos queratinócitos da camada granulosa e, sucessivamente, na membrana espessada das células queratinizadas.

Os resultados do presente trabalho revelam diferenças quanto aos lípidos contidos na membrana espessada e no citoplasma das células queratinizadas; por este motivo, a interpretação dos resultados, concernentes à composição lipídica destes componentes das células queratinizadas, foi efetuada separadamente. Convém frisar que a membrana espessada foi considerada em conjunto com o espaço intercelular, pois na camada córnea o compartimento extracelular apresenta dimensões bastante reduzidas (SELBY, 1957; BRODY, 1966; SCHEUPLEIN, 1972); sua amplitude varia, geralmente, entre 10 e 50 nm, sendo mais amplo onde estão presentes resíduos dos corpos lamelares (BRODY, 1972). Admite-se que este compartimento esteja preenchido por material predominantemente lipídico, proveniente dos corpos lamelares (SCHREINER & WOLFF, 1969; SQUIER, 1973; ELIAS & FRIEND, 1975; ELIAS *et alii.*, 1977b, d, 1979a).

Os resultados histoquímicos, do presente trabalho, revelam que a membrana espessada das células queratinizadas contém proteínas, que se tornam reativas após o desmascaramento pela ação do ácido perfórmico, além de substâncias lipídicas de diversas naturezas. Convém frisar que o tratamento pelo ácido perfórmico, ao mesmo tempo que desmascara proteínas da membrana espessada das células queratinizadas, extrai fosfolípidos contendo colina; estes resultados sugerem a possibilidade de ligação química entre proteínas e fosfolípidos contendo colina, ligação esta que seria responsável pelo mascaramento da reatividade das proteínas. Estes resultados, portanto, sugerem íntima relação entre lípidos e proteínas na membrana espessada das células queratinizadas. A presença de lípidos contendo colina e íon fosfato, combinada com a positividade à reação do PAS, sugerem a existência, além de fosfolípidos contendo colina, de glicosilceramidas, na membrana espessada; histoquimicamente, foi também demonstrada a presença de colesterol, vitamina D e tocoferol na membrana espessada das células queratinizadas.

Estes resultados concordam com as dosagens efetuadas, em frações extraídas da membrana espessada das células queratinizadas, por MATOLTSY & PARAKKAL (1967), as quais revelaram, além de proteínas, 33,0% de lípidos e 1,0% de glúcides.

Os resultados do presente trabalho, obtidos em cortes histológicos submetidos à extrações, principalmente a efetuada com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que remove a fração lipídica da membrana espessada e, parcialmente, a fração

protéica, sugerem que a presença dos lípidos não é necessária para a manutenção da integridade morfológica da membrana espessada; por outro lado, o tratamento com ácido perfórmico, que desmascara o material protéico da membrana e remove os lípidos contendo colina, demonstra que esta estrutura permanece aparentemente íntegra após a remoção dos fosfolípidos. Estes resultados indicam que a manutenção da membrana, como estrutura, pode ocorrer mesmo quando os lípidos são removidos.

A situação dos produtos protéicos e lipídicos, em relação com a face da membrana espessada em que estão depositados, não pôde ser verificada, diretamente, pela técnica por nós empregada, mas pôde ser deduzida através de fatos verificados. Baseado nesses fatos, parece evidente que o tocoferol, o material PAS positivo, boa parte da vitamina D, parte do colesterol e de proteínas, se depositem sobre a superfície externa da membrana plasmática, pois todos eles ocorrem no compartimento extracelular da porção profunda da epiderme; por outro lado, a maior parte do colesterol, razoável proporção da vitamina D e das proteínas histoquimicamente detectáveis na membrana espessada, parecem depositar-se em sua face interna, pois estas substâncias provêm do interior dos queratinócitos da camada granulosa.

A presença de complexo glicolipoprotéico, contendo além de proteína, colina, fosfato e hexosamina, foi assinalada em espessamentos epidérmicos da pele humana (FLESCH & ESODA, 1962). Por outro lado, através da cromatografia em camada fina, foram isoladas, da epiderme, tanto da fração solúvel em etanol quanto da insolúvel, seis lipoproteínas, as quais contêm predominância de lípidos; dentre os lípidos, são mais abundantes os esteróis livres e os ácidos graxos, tendo sido identificados colesterol e provável 7-hidroxi-colesterol, além de fosfato e hexosamina (WHEATLEY *et alii.*, 1964). Dos queratinócitos da epiderme humana e do porco foram, também, isolados esteróis e ésteres de esteróis (LEWIS & HAYWARD, 1971), fosfolípidos e esfingolípidos (REINERTSON & WHEATLEY, 1959; CARRUTHERS, 1964; WHEATLEY & FLESCH, 1967; ANSARI *et alii.*, 1970; LONG, 1970; GRAY & YARDLEY, 1975a; GRAY & WHITE, 1978).

GRAY & YARDLEY (1975a, b) admitem que a ceramida, resultante da ação da esfingomielinase sobre a esfingomielina, não é catabolizada, constituindo o maior componente lipídico das células queratinizadas. A ceramida, juntamente com o coleste

rol, o sulfato de colesterol e glicoesfingolípides, constituiriam os componentes lipídicos da membrana espessada das células queratinizadas, sendo responsáveis pela sua estabilidade (GRAY & WHITE, 1978; GRAY *et alii.*, 1978b). Nossos resultados histoquímicos concordam com os resultados bioquímicos citados, pois demonstram a presença de colesterol, ésteres do colesterol e provável glicolípide (PAS positivo), na membrana espessada das células queratinizadas. No entanto, nossos resultados revelam, ainda, a presença de lípidos contendo colina e íon fosfato na membrana espessada, além de tocoferol e de vitamina D.

A estabilidade e a integridade estrutural da fase lipídica das membranas, em células de mamíferos, dependem da natureza anfipática de alguns dos seus componentes lipídicos; na maioria das células, os componentes anfipáticos mais importantes são os fosfolípidos. No entanto, como se admite estarem os fosfolípidos ausentes na camada córnea, a qual contém ceramidas e glicosilceramidas, foi sugerido que estes dois últimos produtos seriam as moléculas anfipáticas que manteriam estável a fase lipídica da membrana espessada das células queratinizadas (GRAY & YARDLEY, 1975a, b; PASCHER, 1976; GRAY & WHITE, 1978). Nossos resultados, embora não contradigam esta hipótese, revelam a presença de lípidos contendo colina e íon fosfato, na membrana espessada das células queratinizadas, os quais devem ser também considerados no que diz respeito à estabilidade da fase lipídica da membrana espessada.

A análise química e os resultados histoquímicos da camada córnea, da epiderme de camundongos, evidenciou a presença de lípidos neutros relacionados com a membrana espessada das células queratinizadas (ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a); dentre estes, foram detectados o colesterol e seus ésteres, triglicérides e esfingolípides. No que diz respeito à situação, os esfingolípides estariam na membrana espessada; o colesterol e seus ésteres, ácidos graxos e ceramidas seriam encontrados no espaço intercelular, sendo derivados dos corpos lamelares. Foi demonstrado na camada córnea, através da microscopia eletrônica, que o espaço intercelular contém membranas bilaminares, diferentes das lamelas oriundas dos corpos lamelares e que parecem constituídas por lípidos não polares (LAVKER, 1976; HAYWARD, 1978); a origem destas membranas é desconhecida. No entanto, nossos resultados histoquímicos revelam a presença de

colesterol, vitamina D e tocoferol, na membrana espessada, em sua face voltada para o compartimento extracelular da camada córnea; estas substâncias podem ser parcialmente responsáveis pela constituição das membranas bilaminares. Por outro lado, em bora se admita que os corpos lamelares sejam os únicos responsáveis pela origem dos lípidos intercelulares da camada córnea, isto não foi demonstrado (ELIAS, 1981).

Foi salientado que a maior parte dos lípidos da camada córnea está situada no compartimento extracelular (BLANK, 1953; ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a). Nossos resultados, embora não permitam discriminação entre o espaço intercelular e a membrana espessada das células queratinizadas, sugerem, no entanto, que além dos lípidos relacionados com a face externa da membrana espessada existam lípidos situados junto à face interna da membrana, os quais, portanto, são intracelulares; embora intracelulares, estes lípidos estão intimamente associados com a membrana espessada das células queratinizadas.

Diversos resultados bioquímicos têm confirmado a presença de lípidos neutros e polares, na epiderme humana, e permitido correlacionar variações quantitativas desses lípidos com o processo de queratinização. Assim, foi assinalada redução dos fosfolípidos e dos glicoesfingolípidos na camada córnea, ou seja, no final do processo de queratinização, a qual é acompanhada de manutenção da taxa de colesterol e seus ésteres, dos ácidos graxos e triglicérides, e das ceramidas (REINERTSON & WHEATLEY, 1959; WHEATLEY & FLESCHE, 1967; LONG, 1970; GRAY & YARDLEY, 1975a; ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a; GRAY & WHITE, 1978). Foi mesmo sugerido que o teor de lípidos neutros aumentaria progressivamente na epiderme, a medida que a célula da camada granulosa se transforma na célula córnea, onde atingiriam o teor máximo (ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a). A análise química permitiu demonstrar que os lípidos neutros, ou não polares (esteróis, ésteres de esteróis, ácidos graxos e triglicérides), cuja proporção na camada granulosa é, em média, de 38,0%, atingem, na camada córnea, a proporção de 53,0% (ELIAS, 1981); deste modo, durante a queratinização, a proporção de lípidos não polares aumentaria.

Estudos citoquímicos, efetuados ao nível da microscopia eletrônica, indicam que os fosfolípidos não sofrem alteração quantitativa aparente quando a célula da camada granulosa se transforma na célula córnea, ao contrário dos glúcides que

diminuem, desaparecendo na célula córnea (ELIAS *et alii.*, 1977b, 1979a). Os resultados histoquímicos do presente trabalho, no entanto, não confirmam o desaparecimento de glúcides na camada córnea.

Convém salientar que a metodologia bioquímica não permite estudar a dinâmica dos lípides durante a queratinização. Com a finalidade de evitar esse inconveniente, foram efetuados estudos bioquímicos em camadas isoladas da epiderme. A tripsinização sequencial foi usada para separar as células da camada granulosa, das células córneas e das outras camadas da epiderme humana; deste modo, pôde-se proceder a análise lipídica de camadas isoladas; não obstante, foi verificado que este tratamento pode determinar perda ou degradação da esfingomielina (GRAY & YARDLEY, 1975a, b; GRAY, 1976; GRAY & WHITE, 1978; GRAY *et alii.*, 1978b). Estudos bioquímicos da epiderme humana e do porco, efetuados com esta metodologia, mostraram que a camada granulosa contém fosfolípidos e principalmente glicosfingolípidos, além de lípidos neutros (GRAY & YARDLEY, 1975a, GRAY & WHITE, 1978); os fosfolípidos e os glicosfingolípidos desapareceriam na camada córnea, a qual passaria a conter ácidos graxos, esteróis, ésteres de esteróis e ceramidas. Esses resultados foram confirmados, no camundongo, por ELIAS *et alii.* (1977a, b, 1979a), os quais empregaram células da camada granulosa e da camada córnea, isoladas com o auxílio da toxina epidermolítica estafilocócica e da tripsina. Todavia, os resultados histoquímicos do presente trabalho indicam a presença de fosfolípidos na camada córnea, os quais estão situados tanto na membrana espessada quanto no citoplasma das células queratinizadas.

No que diz respeito aos lípidos polares, principalmente fosfolípidos, a análise química, efetuada por ELIAS *et alii.* (1977b), demonstrou, na camada granulosa, lípidos polares em grande proporção, tanto dentro quanto fora dos queratinócitos. Esses resultados foram confirmados, histoquimicamente, por ELIAS *et alii.* (1979a), embora através de técnica inespecífica (hemateína ácida). As técnicas histoquímicas, empregadas no presente trabalho, mais específicas que a da hemateína ácida, também indicam que na camada granulosa há aparente aumento da proporção de fosfolípidos contendo colina, confirmando os resultados obtidos anteriormente por esses autores. Por outro lado, foi demonstrado que a hipertrofia celular, que ocorre na camada granulosa, advém do acúmulo de numerosos corpos lamela

res (BERGSTRESSER *et alii.*, 1978), os quais ocupam 15,0% do citoplasma dessas células (ELIAS & FRIEND, 1975); esse acúmulo de corpos lamelares poderia ser responsável pelo aumento da proporção de fosfolípidos, verificado na camada granulosa.

De forma semelhante, também as glicosilceramidas são mais abundantes na camada granulosa, em comparação com a camada córnea da epiderme do camundongo (ELIAS *et alii.*, 1977b). Nossos resultados revelam granulações PAS positivas no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa, o que está de acordo com a maior proporção de glicosilceramidas nessa camada.

Convém salientar que as glicosilceramidas contêm ácidos graxos insaturados, dentre os quais o ácido linoléico (GRAY *et alii.*, 1978b), o qual é importante na manutenção da barreira epidérmica e na preservação da integridade morfológica da epiderme, conforme se verifica na carência de ácidos graxos essenciais (HARTOP & PROTTEY, 1976; PROTTEY, 1977). Foi mesmo admitido que uma glicosilceramida, dotada de ácido linoléico, poderia ser responsável pela manutenção da normalidade funcional da epiderme (GRAY & WHITE, 1978), normalidade essa que dependeria, fundamentalmente, da completa diferenciação celular, que culmina com a formação da célula queratinizada, ou seja, da célula dotada de alta concentração de "queratina".

De acordo com o que foi discutido a propósito da queratinização epidérmica, principalmente no que concerne à relação entre lípidos e proteínas, na formação da "queratina" epidérmica, depreende-se que a diferenciação do queratinócito é complexa e abrange processos de síntese de proteínas e de lípidos. As evidências a este respeito, predominantemente de natureza física e bioquímica, eram complementadas por poucos resultados morfológicos e histoquímicos. Os resultados do presente trabalho acrescentam novas evidências histoquímicas, a respeito da presença de lípidos na membrana espessada e no citoplasma das células queratinizadas, sugerindo sua participação no processo de queratinização, pois nos locais em que ocorrem proteínas, admitidas como responsáveis pela formação da "queratina" epidérmica, também foram demonstrados lípidos, havendo íntima associação entre ambos. Esta associação parece muito importante para o desenvolvimento normal do processo de queratinização, a julgar pelas alterações epidérmicas que ocorrem nas perturbações do metabolismo lipídico.

RESUMO E CONCLUSÕES

O emprego de técnicas histoquímicas adequadas, em cortes de congelação de fragmentos de pele fixados em formalina-cálcio (ou, excepcionalmente, em formalina-bicloreto de mercúrio), combinado com pré-tratamentos específicos ou extrações seletivas, permitiu assinalar a presença de várias substâncias de natureza lipídica, na epiderme, e correlacionar essas substâncias entre si e com as "queratinas", além de situá-las no decurso do processo de queratinização.

Entre as substâncias de natureza lipídica assinaladas, algumas nunca haviam sido demonstradas, histoquimicamente, na epiderme, dentre as quais destacam-se a vitamina D, lípides contendo colina e o tocoferol; além disso, as técnicas utilizadas permitiram retificar resultados histoquímicos obtidos através de técnicas inespecíficas.

A conveniência da combinação de técnicas topoquímicas apropriadas, com pré-tratamentos suscetíveis de permitir extração seletiva ou de determinar desmascaramento de substâncias com reatividade bloqueada, torna-se bem evidente devido à maior possibilidade em se estabelecer correlação entre os resultados e de interpretá-los com maior segurança.

Os resultados histoquímicos, obtidos com a aplicação desta metodologia, em pele de várias espécies de mamíferos, revelaram que as substâncias lipídicas intraepidérmicas, não removidas pelo tratamento com metanol-clorofórmio, podem ser agrupadas em duas categorias: a primeira é integrada por substâncias sudanófilas não mascaradas que, por isso, já haviam sido demonstradas, histoquimicamente; a outra, ao contrário, abrange substâncias que apresentam sudanofilia somente após pré-tratamentos convenientes, tendo sido assinaladas pela primeira vez neste trabalho.

Dentre as *substâncias lipídicas sudanófilas não mascaradas*, foi possível distinguir três grupos:

1 - Substâncias situadas no espaço intercelular da porção profunda da epiderme; contêm colina e fosfato (fosfolípidos dotados de colina) e sua sudanofilia não é removida pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, pelo hidróxido de potássio e pelo ácido perfórmico; contêm, também, colesterol e vitamina D, ambos mascarados, revelados apenas após hidrólise conveniente, e tocoferol mascarado, que se torna reativo após o tratamento pelo hidróxido de potássio ou pelo peridrol-amônia. Estas substâncias constituem complexo que reage positivamente à reação do ferricianeto férrico, devido, ao menos em parte, à presença de vitamina D e tocoferol; o complexo é PAS positivo, principalmente após a ação desmascarante do hidróxido de potássio, sendo o material PAS positivo extraído pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, mas não pelo metanol-clorofórmio. A presença de proteínas, no complexo, foi revelada pela positividade à reação do DDD, especialmente após a ação desmascarante do ácido perfórmico. O comportamento do complexo lipídico deste grupo, em relação aos solventes usados, constitui evidência a favor da presença de lipoproteínas.

2 - Substâncias lipídicas situadas no citoplasma dos queratinócitos da porção profunda da epiderme; compreendem dois sub-grupos:

2.1 - Substâncias que não contêm colina nem fosfato e são parcialmente extraídas pelo metanol-clorofórmio, pelo hidróxido de potássio ou pelo ácido perfórmico e totalmente extraídas pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; contêm colesterol, ésteres do colesterol e vitamina D; o comportamento, diante dos solventes e hidrolisantes usados, indica que estas substâncias estão associadas com proteínas. A reação da aloxana-Schiff evidencia grânulos, no citoplasma dos queratinócitos, sugerindo a presença de complexos lipoprotéicos, constituídos por colesterol, ésteres do colesterol e vitamina D, associados à proteínas.

2.2 - Substâncias situadas no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa, sob a forma de grânulos dotados de fosfolípidos contendo colina; são destituídas de colesterol, ésteres do colesterol e vitamina D. São bem menos abundantes em comparação com as substâncias do primeiro sub-grupo.

3 - Substâncias localizadas na membrana espessada da célula queratinizada; contêm colina e fosfato, este último de-

monstrável somente após desmascaramento pelo peridrol-amônia; o tratamento com ácido perfórmico permite a extração seletiva de lípidos contendo colina, sem provocar aparente extração do material sudanófilo, sugerindo a presença de mais de uma substância sudanófila, constituindo complexo; contém colesterol, ésteres de colesterol, vitamina D e tocoferol, extraíveis pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; o tratamento com hidróxido de potássio extrai apenas o tocoferol, parcialmente. O complexo contém proteínas, pois é aloxana-Schiff e DDD positivo, principalmente após a ação desmascarante do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou do ácido perfórmico; é reativo à reação do ferricianeto férrico (principalmente após a ação desmascarante do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico ou do ácido perfórmico) e à reação do PAS; esta última reatividade desaparece com o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, sugerindo ser proveniente da presença de substância de natureza lipídica.

As *substâncias lipídicas mascaradas*, cuja sudanofilia somente pode ser verificada após tratamentos convenientes, estão situadas no interior dos queratinócitos, em dois locais diferentes da epiderme, ou seja, nos queratinócitos da porção profunda e no citoplasma das células queratinizadas. Estão associadas tão intimamente com proteínas a ponto das características histoquímicas dos componentes do complexo lipoprotéico estarem bloqueadas. As substâncias deste grupo distinguem-se, entre si, não apenas pela situação topográfica, mas também pelos tratamentos necessários para seu desmascaramento. Foram distinguidos dois grupos:

1 - Substâncias lipídicas situadas no citoplasma dos queratinócitos da camada espinhosa, que adquirem sudanofilia após a ação desmascarante do hidróxido de potássio, quando então passam a reagir com a técnica para lípidos contendo colina; a reação positiva para fosfato, após desmascaramento pelo peridrol-amônia, sugere a presença de fosfolípidos dotados de colina. Devido à positividade das reações da aloxana-Schiff e do DDD, nos mesmos locais em que estão situados os fosfolípidos e tendo em vista o mascaramento do lípido, é possível tratar-se de uma lipoproteína, cuja fração protéica é constituída pela pré-queratina dos tonofilamentos.

2 - Substâncias lipídicas situadas no citoplasma da célula queratinizada, que se tornam sudanófilas após a ação do

tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, quando também adquirem a propriedade de reagir com a técnica para lípidos contendo colina; após a ação desmascarante do peridrol-amônia, pode ser demonstrado íon fosfato, indicando a presença de fosfolípidos contendo colina. Estas substâncias sudanófilas são extraídas pelo tratamento com ácido perfórmico, com exceção de uma fração que, ao contrário, é desmascarada; contém proteínas, pois reagem positivamente à reação da aloxana-Schiff e do DDD, principalmente após a ação do tioglicolato de sódio; o material DDD positivo é extraído pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico e pelo ácido perfórmico. A presença de lípidos e de proteínas sugere tratar-se de complexo lipoprotéico, que é redutor, pois reage positivamente à reação do ferri-cianeto férrico; esta reatividade diminui fortemente após o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico, que extrai a porção protéica, sugerindo que a porção lipídica seja responsável pela propriedade redutora.

Deve ser destacado que substâncias lipídicas, com características semelhantes às das situadas no citoplasma da célula queratinizada, são encontradas no citoplasma dos queratinócitos dos extratos mais periféricos da camada espinhosa e nos da camada granulosa, onde se apresentam sob a forma de pequenas granulações sudanófilas, justanucleares, após a ação desmascarante do metanol-clorofórmio-ácido clorídrico; estas granulações contêm colina e não contêm colesterol e vitamina D; há evidências de conterem proteínas (reação da aloxana-Schiff positiva) e que sejam precursoras de lípidos mascarados, situados no citoplasma da célula queratinizada.

Os diversos tipos de substâncias lipídicas assinalados apresentam destinos diferentes, durante o processo de queratinização. As substâncias lipídicas sudanófilas, situadas no espaço intercelular da porção profunda da epiderme, com o progredir do processo de queratinização, são depositadas sobre a face externa da membrana plasmática da célula queratinizada, tomando parte da constituição do que foi por nós considerado como membrana espessada da célula queratinizada; faz exceção parte da vitamina D que é reabsorvida pelo organismo. As substâncias lipídicas desse grupo colaboram na constituição da "queratina" da membrana espessada, sendo responsáveis por parte do material lipídico situado na face externa dessa membrana, parte esta constituída por fosfolípidos contendo colina, tocoferol,

vitamina D e colesterol; proteínas e substâncias PAS positivas também colaboram na constituição da face externa da membrana espessada da célula queratinizada.

Os lípides sudanófilos do segundo grupo, constituídos principalmente de colesterol, ésteres do colesterol e vitamina D, apresentam dois destinos: 1 - parte deles atinge o compartimento extracelular e tem o destino dos lípides aí situados; 2 - outra parte permanece no interior do queratinócito e se deposita na face interna da membrana plasmática, passando a integrar a membrana espessada da célula queratinizada. Estes lípides, portanto, também colaboram na constituição da "queratina" da membrana espessada da célula queratinizada, contribuindo com parte de seu conteúdo em colesterol e vitamina D.

A membrana espessada da célula queratinizada, por conseguinte, contém material proveniente desses dois grupos de substâncias sudanófilas.

Os lípides mascarados, situados nos queratinócitos da camada espinhosa, precocemente se associam com a pré-queratina dos tonofilamentos; há evidência de que esta associação continue durante todo o decorrer do processo de queratinização, pois, no citoplasma da célula queratinizada, existem fosfolípidos contendo colina associados com as fibrilas de "queratina". Nesses dois locais, somente após tratamento desmascarante pode ser demonstrada colina reativa, a qual se apresenta quimicamente bloqueada, provavelmente, devido ao grau de sua ligação com as proteínas fibrosas.

Os resultados sugerem que dentre os lípides mascarados, do citoplasma da célula queratinizada, os que são desmascarados pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico sejam, ao menos parcialmente, provenientes de pequenas granulações lipídicas situadas nos queratinócitos das camadas espinhosa e granulosa, pois estes, também, são desmascarados pelo mesmo tratamento.

Com este fundamento, admitiu-se que os fosfolípidos contendo colina, mascarados, situados no citoplasma da célula queratinizada, provêm de duas origens: 1 - dos lípides associados com os tonofilamentos; 2 - de granulações situadas nos queratinócitos das camadas granulosa e espinhosa. Destes lípidos, os associados com os tonofilamentos situados nos queratinócitos da porção profunda da epiderme, passam a se relacio-

nar com as fibrilas de "queratina", no citoplasma da célula queratinizada, onde são desmascarados pelo ácido performico; os provenientes das granulações dos queratinócitos das camadas granulosa e espinhosa, se associam com a matriz interfilamentosa e são desmascarados pelo tratamento com metanol-clorofórmio-ácido clorídrico. O principal argumento favorável a esta interpretação consiste no seguinte: o tratamento pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico desmascara lípidos localizados no citoplasma da célula queratinizada e de queratinócitos das camadas granulosa e espinhosa, sem determinar sua extração; ao contrário, determina extração dos fosfolípidos associados com a pré-queratina dos tonofilamentos. Estes resultados sugerem que os lípidos desmascarados pelo metanol-clorofórmio-ácido clorídrico não são os relacionados com os tonofilamentos.

De acordo com esta interpretação, os lípidos mascarados, do citoplasma da célula queratinizada, se associam com proteínas que constituem tanto as fibrilas de "queratina" quanto a matriz interfilamentosa, participando diretamente do processo de queratinização epidérmica. Além disso, os resultados do presente trabalho sugerem que a diferenciação do queratinócito epidérmico, que ocorre durante o processo de queratinização, abrange tanto a biossíntese de proteínas específicas, bem conhecidas, quanto a de lípidos, que a elas intimamente se associam com a finalidade de constituir lipoproteínas, presentes na célula queratinizada.

Desta forma, substâncias lipídicas participam da constituição dos três elementos fundamentais da célula queratinizada epidérmica, quais sejam: a membrana espessada, as fibrilas de "queratina" e a matriz interfilamentosa, permitindo estabelecer as seguintes conclusões:

1 - Substâncias de natureza lipídica, associadas com proteínas, participam da constituição da membrana espessada e do citoplasma da célula queratinizada da epiderme.

2 - No citoplasma da célula queratinizada, a participação das substâncias lipídicas ocorre tanto no que diz respeito às fibrilas de "queratina" quanto à matriz interfilamentosa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAES-JORGENSEN, E. Essential fatty acids. *Physiol. Rev.*, 41: 1-51, 1961.
- ADAMS, C. W. M. A stricter interpretation of the ferric ferricyanide reaction with particular reference to the demonstration of protein-bond sulphhydryl and disulphide groups. *J. Histochem. Cytochem.*, 4: 23-35, 1956.
- ADAMSON, I. Y. R. & BOWDEN, D. H. The surface complexes of the lung. *Am. J. Path.*, 61: 359-368, 1970.
- ALBRIGHT, J. T. & LISTGARTEN, M. A. Observations of the fine structure of hamster cheek pouch epithelium. *Archs. Oral Biol.*, 7: 613-620, 1962.
- ALEXANDER, P. & HUDSON, R. F. *Wool its Chemistry and Physics*. New York, Reinhold Publishing Corp., 1954.
- ALFIN-SLATER, R. B. & AFTERGOOD, L. Essential fatty acids reinvestigated. *Physiol. Rev.*, 48: 758-784, 1968.
- ANDERSON, P. C. & MARTT, J. M. Myotonia and keratoderma induced by 20, 25-diazocholestenol. *Archs. Derm.*, 92: 181-183, 1965.
- ANSARI, M. N. A., NICOLAIDES, N. & FU, H. C. Fatty acid composition of the living layer and stratum corneum lipids of human sole skin epidermis. *Lipids*, 5: 838-845, 1970.
- ASHRAFI, S. H., MEYER, J. & SQUIER, C. A. The ultrastructural demonstration of membrane-coating granules in rat oral epithelium using the periodic acid-bismuth technique. *Archs. Oral Biol.*, 22: 343-347, 1977.

- ASTBURY, W. T. X-rays and the stoichiometry of the proteins, with special reference to the structure of the keratin-myosin group. *J. Chem. Soc.*, 337-347, 1942.
- BADEN, H. P. The physical properties of nail. *J. Invest. Derm.*, 55: 115-122, 1970.
- BADEN, H. P. & BONAR, L. C. The α -fibrous proteins of epidermis. *J. Invest. Derm.*, 51: 478-483, 1968.
- BADEN, H. P. & GOLDSMITH, L. A. The structural protein of epidermis. *J. Invest. Derm.*, 59: 66-76, 1972.
- BADEN, H. P., GOLDSMITH, L. A. & FLEMING, B. The polypeptide composition of epidermal prekeratin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 317: 303-311, 1973.
- BADEN, H. P., GOLDSMITH, L. A. & GIFFORD, A. M. Immunologic properties of the α -fibrous protein of human epidermis. *Acta Derm.-vener.*, 51: 327-330, 1971.
- BADEN, H. P., LEE, L. D. & KUBILUS, J. Intra and extracellular cementing substances. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 27: 433-441, 1976.
- BADEN, H. P. & MADERSON, P. F. A. Morphological and biophysical identification of fibrous proteins in the amniote epidermis. *J. exp. Zool.*, 174: 225-232, 1970.
- BAKER, J. R. The structure and chemical composition of the Golgi element. *Quart. J. microsc. Sci.*, 85: 1-71, 1944.
- BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. *Quart. J. microsc. Sci.*, 87: 441-470, 1946.
- BALIS, J. V. & CONEN, P. E. The role of alveolar inclusion bodies in the developing lung. *Lab. Invest.*, 13: 1215-1229, 1964.
- BALL, R. D., WALKER, G. K. & BERNSTEIN, I. A. Histidine-rich proteins as molecular markers of epidermal differentiation.

- J. Biol. Chem.*, 253: 5861-5868, 1978.
- BARNETT, R. J. & SELIGMAN, A. M. Histochemical demonstration of protein-bound alpha-acylamido carboxyl groups. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 169-176, 1958.
- BASNAYAKE, V. & SINCLAIR, H. M. Skin permeability in deficiency of essential fatty acids. *J. Physiol.*, 126: 55-56, 1954.
- BASNAYAKE, V. & SINCLAIR, H. M. The effect of deficiency of essential fatty acids upon the skin. In: *Biochemical Problems of Lipids*. POPJAK, G. & LEBRETON, E. (eds.) London; Butterworth, p. 476-484, 1956.
- BEJDL, W. Die saure Phosphatase in Haut and Vagina des Menschen und ihre Bedeutung für die Verhronung. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, 40: 389-400, 1954.
- BENEDETTI, E. L. & EMMELOT, P. Studies on plasma membranes. IV. Ultrastructural localization and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver and hepatoma. *J. Cell Sci.*, 2: 499-512, 1967.
- BENNETT, H. S. Morphological aspects of extracellular polysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, 11: 14-23, 1963.
- BERENSON, G. S. & BURCH, G. E. Studies of diffusion of water through dead human skin: the effect of different environmental states and of chemical alterations of the epidermis. *Am. J. Trop. Med.*, 31: 842-853, 1951.
- BERGSTRESSER, P. R., PARISER, R. J. & TAYLOR, J. R. Counting and sizing of epidermal cells in normal human skin. *J. Invest. Derm.*, 70: 280-284, 1978.
- BIRBECK, M. S. C. & MERCER, E. H. The electron microscopy of the human hair follicle. I. Introduction and hair cortex. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 3: 203-214, 1957.
- BLACK, O., Jr. & ANGLIN, J. H., Jr. Release of a guinea pig epidermal cellular component by ultraviolet light. *J. Invest.*

- Derm.*, 57: 87-93, 1971.
- BLACK, H. S. & RAUSCHKOLB, E. W. Effects of light on skin lipids metabolism. *J. Invest. Derm.*, 56: 387-391, 1971.
- BLANK, I. H. Further observations on factors with influence the water content of the stratum corneum. *J. Invest. Derm.*, 21: 259-269, 1953.
- BLIX, G., TISELIUS, A. & SVENSSON, H. Lipids and polysaccharides in electrophoretically separated blood serum proteins. *J. Biol. Chem.*, 137: 485-494, 1941.
- BLOOR, W. R. & SNIDER, R. Phospholipid content and activity in muscle. *J. Biol. Chem.*, 107: 459-470, 1934.
- BOLLIGER, A. & McDONALD, N. D. Histological investigation of glycogen in skin and hair. *Aust. J. exp. Biol. Med. Sci.*, 27: 223-228, 1949.
- BORYSENKO, J. Z. & RAVEL, J. P. Experimental manipulation of desmosome structure. *Am. J. Anat.*, 137: 403-421, 1973.
- BOUGHTON, B., MacKENNA, R. M. B., WHEATLEY, V. R. & WORMALL, A. Studies of sebum. 8. Observations on the squalene and cholesterol content of sebum and the possible function of squalene in human sebum. *Biochem. J.*, 66: 32-38, 1957.
- BOURNE, G. *Cytology and Cell Physiology*. Oxford, Clarendon Press, 1942.
- BOWSER, P. A. *Epidermal phospholipases with special reference to sphingomyelinase*. Ph. D. thesis, University of Birmingham, U. K., 1978.
- BOWSER, P. A. & GRAY, G. M. Sphingomyelinase in pig and human epidermis. *J. Invest. Derm.*, 70: 331-335, 1978.
- BRADBURY, J. H. The structure and chemistry of keratin fibers. *Adv. Protein Chem.*, 27: 111-211, 1973.

- BRANCA, A. Recherches sur la kératinisation. *J. Anat. Physiol.*, 43: 341-370, 1907.
- BRAUN-FALCO, O. Histochemical identification of esterases in normal and psoriatic skin. *Arch. klin. exp. Derm.*, 202: 153-162, 1956.
- BRAUN-FALCO, O. The histochemistry of Psoriasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 73: 936-976, 1958a.
- BRAUN-FALCO, O. The histochemistry of the hair follicle. In: *The Biology of Hair Growth*. MONTAGNA, W. & ELLIS, R. A. (eds.). New York, Academic Press, p. 65-87, 1958b.
- BRAUN-FALCO, O. & RUPEC, M. Die Verteilung der sauren Phosphatase bei normaler und psoriatischer Verhornung (eine elektronenmikroskopisch-cytochemische Untersuchung). *Dermatologica*, 134: 225-242, 1967.
- BREATHNACH, A. S., GOODMAN, T., STOLINSKI, C. & GROSS, M. Freeze-fracture replication of cells of stratum corneum of human epidermis. *J. Anat.*, 114: 65-81, 1973.
- BREATHNACH, A. S. & WYLLIE, L. M. A. Osmium iodide positive granules in spinous and granular layers of guinea pig epidermis. *J. Invest. Derm.*, 47: 58-60, 1966.
- BRODY, I. The keratinization of epidermal cells of normal guinea pig skin as revealed by electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 2: 482-511, 1959a.
- BRODY, I. An ultrastructural study on the role of the keratohyalin granules in the keratinization process. *J. Ultrastruct. Res.*, 3: 84-104, 1959b.
- BRODY, I. The ultrastructure of the tonofibrils in the keratinization process of normal human epidermis. *J. Ultrastruct. Res.*, 4: 264-297, 1960a.
- BRODY, I. An electron microscopic investigation of the keratinization process in the epidermis. *Acta Derm.-vener.*,

- 40: 74-84, 1960b.
- BRODY, I. Different staining methods for the electronmicroscopic elucidation of the tonofibrillar differentiation in normal epidermis. In: *The Epidermis*. MONTAGNA, W. & LOBITZ, W. C., Jr. (eds). New York, Academic Press, p. 251-273, 1964.
- BRODY, I. Intercellular space in normal human stratum corneum. *Nature*, 209: 472-476, 1966.
- BRODY, I. The Epidermis. In: *Jadassohn's Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten. Ergänzungswerk. Normale und pathologische Anatomie der Haut I*. Vol. I, Part I. GANS, O. & STEIGLEDER, G. K. (eds). Berlin, Springer, p.1-142, 1968.
- BRODY, I. The modified plasma membrane of the transition and horny cells in normal human epidermis as revealed by electron microscopy. *Acta Derm.-vener.*, 49: 128-138, 1969.
- BRODY, I. Electron microscopy of normal human plantar epidermis. 1. Strata lucidum and corneum. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.*, 86: 305-331; 1972.
- BRODY, I. Ultrastructure of the stratum corneum. *Int. J. Derm.*, 16: 245-256, 1977.
- BRUNK, U. T. & ERICSSON, J. L. E. The demonstration of acid phosphatase in "in vitro" cultured tissue cells. Studies on the significance of fixation, tonicity and permeability. *Histochem. J.*, 4: 349-363, 1972.
- BURR, G. O. & BURR, M. M. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *J. Biol. Chem.*, 82: 345-367, 1929.
- CALDWELL, M. D., JONSSON, H. T. & OTHERSEN, H. B., Jr. Essential fatty acid deficiency in an infant receiving prolonged parenteral alimentation. *J. Pediat.*, 81: 894-898, 1972.
- CARNEY, S. A., LAWRENCE, J. C. & RICKETTS, C. R. The effects of exogenous substrate on the metabolism of phosphorylcholine

- and phosphorylethanolamine by skin. *J. Invest. Derm.*, 46: 586-587, 1966.
- CARRUTHERS, C. Fatty acid composition of phosphatide and triglyceride fractions of human epidermis. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 115: 215-219, 1964.
- CARRUTHERS, C., WOERNLEY, D. L., BAUMLER, A. & LILGA, K. Studies on certain proteins in normal and pathological epidermis. *Br. J. Cancer*, 11: 597-604, 1957.
- CHAMPETIER, G. & LITVAC, A. Structures histologiques et structures moléculaires au cours de la kératinisation épidermique. *Archs. Anat. microsc.*, 35: 65-76, 1939.
- CHEVREMONT, M. & FREDERIC, J. Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulfhydrile. Application à l'épiderme, au poil et à la levure. *Archs. Biol.*, 54: 589-605, 1943.
- CHRISTENSEN, A. K. The fine structure of testicular interstitial cells in guinea pigs. *J. Cell Biol.*, 26: 911-935, 1965.
- CHRISTENSEN, A. K. & FAWCETT, D. W. The normal fine structure of opossum testicular interstitial cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 653-670, 1961.
- CIACCIO, C. Contributo alle conoscenza dei lipoidi cellulari. *Anat. Anz.*, 35: 17-31, 1910.
- CREWTER, W. G., DOBB, M. G., DOWLING, L. M. & HARRAP, B. S. The structure and aggregation of low-sulfur proteins derived from alpha keratins. In: *Symposium on Fibrous Proteins*. CREWTER, W. G. (ed.). New York, New York Plenum Press, p. 329-340, 1968.
- CREWTER, W. G., FRASER, R. D. B., LENNOX, F. G. & LINDLEY, H. The chemistry of keratins. *Adv. Protein Chem.*, 20: 191-346, 1965.
- CROUNSE, R. G. Epidermal keratin: A re-evaluation. *Nature*,

200: 539-542, 1963.

- CROUNSE, R. G. Keratin and the barrier. Human epidermal phospholipoprotein with water barrier properties. *Archs. envir. Hlth.*, 11: 522-528, 1965.
- DALE, B. A. Purification and characterization of a basic protein from the stratum corneum of mammalian epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, 491: 193-204, 1977.
- DALE, B. A. & LING, S. Y. Keratohyalin origin of a stratum corneum protein. *Fed. Proc.*, 36: 918, 1977.
- DALE, B. A. & LING, S. Y. Immunologic cross-reaction of stratum corneum basic protein and a keratohyalin granule protein. *J. Invest. Derm.*, 72: 257-261, 1979.
- DALE, B. A. & STERN, I. B. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins of newborn rat skin. I. Cell strata and nuclear proteins. *J. Invest. Derm.*, 65: 220-222, 1975a.
- DALE, B. A. & STERN, I. B. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of proteins of newborn rat skin. II. Keratohyalin and stratum corneum proteins. *J. Invest. Derm.*, 65: 223-227, 1975b.
- DALE, B. A., STERN, I. B., RABIN, M. & HUANG, L. Y. The identification of fibrous proteins in fetal rat epidermis by electrophoretic and immunologic techniques. *J. Invest. Derm.*, 66: 230-235, 1976.
- DANIELS, F., Jr. Physiological and pathological extracutaneous effects of light on man and mammals, not mediated by pineal or other neuroendocrine mechanisms. In: *Sunlight and Man*. PATHAK, M. A. (ed.). Tokyo, University of Tokyo Press, p. 247-258, 1974.
- DeTOMAS, M. E., BRENNER, R. R. & PELUFFO, R. O. Position of eicosatrienoic acid in phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine from rats deficient in essential fatty acids.

- Biochim. Biophys. Acta*, 70: 472-474, 1963.
- DEUEL, H. J., Jr. *The Lipids*. Vol. I: Chemistry. New York, Interscience Publishers Inc., 1951.
- DOWNES, A. M., SHARRY, L. F. & ROGERS, G. E. Separate synthesis of fibrillar and matrix protein in the formation of keratin. *Nature*, 199: 1059-1061, 1963.
- DOWNING, D. T. & STRAUSS, J. S. Synthesis and composition of surface lipids of human skin. *J. Invest. Derm.*, 62:228-244, 1974.
- DYKES, P. J., MARKS, R., DAVIES, M. G. & REYNOLDS, D. J. Epidermal metabolism in hereditary atactica polyneuritiformis (Refsum's disease). *J. Invest. Derm.*, 70: 126-129, 1978.
- ECKSTEIN, H. C. & WILE, U. J. The cholesterol and phospholipid content of the cutaneous epithelium of man. *J. Biol. Chem.*, 69: 181-186, 1926.
- EISEN, A. Z., ARNDT, K. A. & CLARK, W. H., Jr. The ultrastructural localization of acid phosphatase in human epidermis. *J. Invest. Derm.*, 43: 319-326, 1964.
- ELIAS, P. M. Epidermal lipids, membranes, and keratinization. *Int. J. Derm.*, 20: 1-19, 1981.
- ELIAS, P. M. & BROWN, B. E. The mammalian cutaneous permeability barrier: defective function in essential fatty acid deficiency correlates with abnormal intercellular lipid deposition. *Lab. Invest.*, 39: 574-583, 1978.
- ELIAS, P. M., BROWN, B. E., FRITSCH, P., GOERKE, J., GRAY, G.M. & WHITE, R. J. Localization and composition of lipids in neonatal mouse stratum granulosum and stratum corneum. *J. Invest. Derm.*, 73: 339-348, 1979a.
- ELIAS, P. M. & FRIEND, D. S. The permeability barrier in mammalian epidermis. *J. Cell Biol.*, 65: 185-191, 1975.

- ELIAS, P. M., FRIEND, D. S. & GOERKE, J. Membrane sterol heterogeneity: Freeze-fracture detection with saponins and filipin. *J. Histochem. Cytochem.*, 27: 1247-1260, 1979b.
- ELIAS, P. M., FRITSCH, P. & EPSTEIN, E. E., Jr. The staphylococcal scalded skin syndrome: review of recent clinical, micro biological, and biochemical advances. *Archs. Derm.*, 113: 207-219, 1977a.
- ELIAS, P. M., GOERKE, J. & FRIEND, D. S. Permeability barrier lipids: Composition and influence on epidermal structure. *J. Invest. Derm.*, 69: 535-546, 1977b.
- ELIAS, P. M., GOERKE, J. & FRIEND, D. S. Mammalian epidermal barrier layer lipids: composition and influence on structure. *J. Invest. Derm.*, 69: 535-546, 1977c.
- ELIAS, P. M., GOERKE, J. & FRIEND, D. S. Freeze-fracture identification of sterol-digitonin complexes in cell and liposome membranes. *J. Cell Biol.*, 78: 577-596, 1978.
- ELIAS, P. M., McNUTT, N. S. & FRIEND, D. S. Membrane alterations during cornification of mammalian squamous epithelia: A freeze-fracture, tracer, and thin-section study. *Anat. Rec.*, 189: 577-594, 1977d.
- ENTENMAN, C. General procedures for separating lipid components of tissue. In: *Methods in Enzymology*. Vol. III. COLOWICK, S. P. & KAPLAN, N. O. (eds). New York, Academic Press, p. 299-317, 1957.
- FARBMAN, A. I. Electron microscope study of a small cytoplasmic structure in rat oral epithelium. *J. Cell Biol.*, 21: 491-495, 1964.
- FARBMAN, A. I. Plasma membrane changes during keratinization. *Anat. Rec.*, 156: 269-282, 1966.
- FARQUHAR, M. G. & PALADE, G. E. Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol.*, 26: 263-291, 1965.

- FARQUHAR, M. G. & PALADE, G. E. Adenosine triphosphatase localization in amphibian epidermis. *J. Cell Biol.*, 30: 359-379, 1966.
- FELSHER, Z. & ROTHMAN, S. The insensible perspiration of the skin hyperkeratotic conditions. *J. Invest. Derm.*, 6: 271-278, 1945.
- FERNÁNDEZ-MORÁN, H. Low-temperature electron microscopy and X-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation*, 26: 1039-1065, 1962.
- FIRKET, J. Recherches sur la genèse des fibrilles épidermiques chez le poulet. *Anat. Anz.*, 38: 537-549, 1911.
- FLESCH, P. & ESODA, E. C. J. Isolation of a glycoproteolipid from human horny layers. *J. Invest. Derm.*, 39: 409-415, 1962.
- FRASER, R. D. B., MACRAE, T. P., ROGERS, G. E. & FILSHIE, B. K. Lipids in keratinized tissues. *J. Mol. Biol.*, 7: 90-91, 1963.
- FRATER, R. Immunologic studies on wool proteins. *Aust. J. Biol. Sci.*, 21: 815-819, 1968.
- FREINKEL, R. K. Lipogenesis during cornification of chicken skin in organ culture. *J. Invest. Derm.*, 59: 339-344, 1972a.
- FREINKEL, R. K. Lipogenesis in epidermal differentiation of embryonic chicken skin. *J. Invest. Derm.*, 59: 332-338, 1972b.
- FREINKEL, R. K. & ASO, K. Esterification of cholesterol in the skin. *J. Invest. Derm.*, 52: 148-154, 1969.
- FREINKEL, R. K. & ASO, K. Esterification of cholesterol by epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, 239: 98-102, 1971.
- FREINKEL, R. K. & FIEDLER-WEISS, V. Esterification of sterols during differentiation and cornification of developing rat epidermis. *J. Invest. Derm.*, 62: 458-462, 1974.

- FRIEND, D. S. & BRASSIL, G. E. Osmium staining of endoplasmic reticulum and mitochondria in the rat adrenal cortex. *J. Cell Biol.*, 46: 252-266, 1970.
- FRITHIOF, L. & WERSÄLL, J. A highly ordered structure in keratinizing human oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res.*, 12: 371-379, 1965.
- FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W. L. Epidermal keratinization: Localization of isotopically labelled amino acids. *J. Invest. Derm.*, 47: 551-560, 1966.
- FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W. L. Synthesis of RNA and protein during epidermal cell differentiation in man. *Archs. Derm.*, 98: 75-79, 1968.
- FUKUYAMA, K., NAKAMURA, T. & BERNSTEIN, I. A. Differentially localized incorporation of amino acids in relation to epidermal keratinization in the newborn rat. *Anat. Rec.*, 152: 525-536, 1965.
- FUKUYAMA, K., BUXMAN, M. M. & EPSTEIN, W. L. The preferential extraction of keratohyalin granules and interfilamentous substances of the horny cells. *J. Invest. Derm.*, 51: 355-364, 1968.
- FULCO, A. J. & MEADS, J. F. Metabolism of essential fatty acids. *J. Biol. Chem.*, 234: 1411-1416, 1959.
- GAYLOR, J. L. & SAULT, F. M. Localization and biosynthesis of 7-dehydrocholesterol in rat skin. *J. Lipid Res.*, 5: 422-431, 1964.
- GIBBINS, J. R. An electron microscopic study of the normal epithelium of the palate of the albino rat. *Archs. Oral Biol.*, 7: 287-295, 1962.
- GIL, J. & REISS, O. K. Isolation and characterization of lamellar bodies and tubular myelin from rat lung homogenates. *J. Cell Biol.*, 58: 152-171, 1973.

- GIROUD, A. & LEBLOND, C. P. The keratinization of epidermis and its derivatives, especially the hair, as shown by X-ray diffraction and histochemical studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 53: 613-626, 1951.
- GOLDSMITH, L. A. & BADEN, H. P. A uniquely oriented epidermal lipid. *Nature*, 225: 1052-1053, 1970.
- GOLDYNE, M. E. Prostaglandins and cutaneous inflammation. *J. Invest. Derm.*, 64: 377-385, 1975.
- GOLODETZ, L. & UNNA, P. G. Chemistry of the skin. *Mschr. prakt. Derm.*, 48: 149-150, 1909.
- GRANDEL, H. Über Vitamin F. *Fette Seifen Anstr.-Mittel*, 46: 150-152, 1939.
- GRAY, G. M. Phosphatidyl-(N-acyl)-ethanolamine: a lipid component of mammalian epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, 431: 1-8, 1976.
- GRAY, G. M., KING, I. A. & YARDLEY, H. J. The plasma membrane of granular cells from pig epidermis: Isolation and lipid and protein composition. *J. Invest. Derm.*, 71: 131-135, 1978a.
- GRAY, G. M., KING, I. A. & YARDLEY, H. J. The plasma membrane of Malpighian cells from pig epidermis: Isolation and lipid and protein composition. *Br. J. Derm.*, 103: 505-516, 1980.
- GRAY, G. M. & WHITE, R. J. Glycosphingolipids and ceramides in human and pig epidermis. *J. Invest. Derm.*, 70: 336-341, 1978.
- GRAY, G. M. & WHITE, R. J. Comunicação pessoal. Citado por: ELIAS, P. M., BROWN, B. E., FRITSCH, P., GOERKE, J., GRAY, G. M. & WHITE, R. J.. 1979a.
- GRAY, G. M., WHITE, R. J. & MAJER, J. R. 1-(3'-O-acyl)- β -glucosyl-N-dihydroxypentatriacontadienoylsphingosine, a major component of the glucosylceramides of pig and human epidermis. *Biochim. Biophys. Acta*, 528: 127-137, 1978b.

- GRAY, G. M. & YARDLEY, H. J. Different populations of pig epidermal cells: Isolation and lipid composition. *J. Lipid Res.*, 16: 441-447, 1975a.
- GRAY, G. M. & YARDLEY, H. J. Lipid composition of cells isolated from pig, human, and rat epidermis. *J. Lipid Res.*, 16: 434-440, 1975b.
- GREENE, R. S., DOWNING, D. T., POCHI, P. E. & STRAUSS, J. S. Anatomical variation in the amount and composition of human surface lipid. *J. Invest. Derm.*, 54: 240-247, 1970.
- GREENSPAN, F. P. The convenient preparation of peracids. *J. Am. Chem. Soc.*, 68: 907-908, 1946.
- GRIESEMER, R. D. & THOMAS, R. W. Lipogenesis in human skin. II. The effect of physical and chemical factors in "in vitro" lipogenesis from acetate. *J. Invest. Derm.*, 41: 95-98, 1963a.
- GRIESEMER, R. D. & THOMAS, R. W. Lipogenesis in human skin. III. Variation with body site. *J. Invest. Derm.*, 41: 235-238, 1963b.
- GRIESEMER, R. D. & THOMAS, R. W. Lipogenesis in human skin. IV. "In vitro" rate studies. *J. Invest. Derm.*, 47: 432-436, 1966.
- GRUBB, C., HACKEMANN, M. & HILL, K. R. Small granules and plasma membrane thickening in human cervical squamous epithelium. *J. Ultrastruct. Res.*, 22: 458-468, 1968.
- GUMUCIO, J., FELDKAMP, C. & BERNSTEIN, I. A. Studies on localization of "histidine-rich" peptide material present in epidermis of the newborn rat. *J. Invest. Derm.*, 49: 545-551, 1967.
- HADLER, W. A., CRUZ-HÖFLING, M. A. & ZITI, L. M. The benzidine technique for histochemical detection of the SO_4 ion. *Acta histochem.*, 61: 197-203, 1978.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Identificação histoquímica

- de alguns lipídeos e esteróis nos epitélios queratinizados. *Ciência e Cultura*, 28 (Supl.): 325, 1976.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Novas técnicas para a demonstração histoquímica de tocoferol e de vitamina D. *Ciência e Cultura*, 29 (Supl.): 584, 1977.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Histochemical technique to detect choline-containing lipids. *Acta histochem.*, 63: 265-270, 1978.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Isolamento, purificação e identificação do α -tocoferol na pele. *Ciência e Cultura*, 31 (Supl.): 494, 1979.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Substâncias responsáveis pela positividade da reação do ferricianeto férrico na epiderme. I- Estudo em frações isoladas da camada córnea. *Ciência e Cultura*, 32 (Supl.): 587-588, 1980.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Técnica histoquímica que permite discriminar o colesterol de substâncias afins e de seus ésteres. *Ciência e Cultura*, 33 (Supl.): 586-587, 1981a.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Destino da vitamina D sintetizada na epiderme: Estudo histoquímico. *Ciência e Cultura*, 33 (Supl.): 587, 1981b.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. A technique to tocopherol (vitamin E) histochemical detection. *Acta histochem.*, 68: 1-10, 1981c.
- HADLER, W. A. & SILVEIRA, S. R. Identification of tocopherol (vitamin E) in the skin and its histochemical detection. *Acta histochem.*, 68: 11-21, 1981d.
- HADLER, W. A., ZITI, L. M., LUCCA, O. de & PATELLI, A. S. A new technique for histochemical detection of cholesterol and cholesterol-like compounds. *Acta histochem.*, 30: 70-78, 1968.
- HALPRIN, K. M. & OHKAWARA, A. Carbohydrate metabolism in

- psoriasis: An enzymatic study. *J. Invest. Derm.*, 46: 51-69, 1966.
- HAMMARSTROM, S., HAMBERG, M., SAMUELSSON, B., DUELL, E. A., STAWISKI, M. & VOORHEES, J. J. Increased concentrations of nonesterified arachidonic acid, 12L-hydroxy-5,8,10,14-eicosatetraenoic acid, prostaglandin E₂, and prostaglandin F_{2α} in epidermis of psoriasis. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 72: 5130-5134, 1975.
- HANSEN, A. E., HAGGARD, M. E., BOELSCHE, A. N., ADAM, D. J. D. & WIESE, H. F. Essential fatty acids in infant nutrition. *J. Nutr.*, 66: 565-576, 1958.
- HANSEN, A. E., HOLMES, S. G. & WIESE, H. F. Fat in the diet in relation to nutrition of the dog. IV. Histological features of skin from animals fed diets with and without fat. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 9: 555-570, 1951.
- HANSEN, A. E. & WIESE, H. F. Clinical and blood lipid studies in a child with chylous ascites. *Am. J. Dis. Child.*, 68: 351-352, 1944.
- HANUSOVA, S. Psoriasis im flächenbild. *Arch. klin. exp. Derm.*, 210: 227-251, 1960.
- HARTOP, P. J. & PROTTEY, C. Changes in transepidermal water loss and the composition of epidermal lecithin after applications of pure fatty acid triglycerides to skin of essential fatty acid-deficient rats. *Br. J. Derm.*, 95: 255-264, 1976.
- HASHIMOTO, K. Cellular envelopes of keratinized cells of the human epidermis. *Arch. klin. exp. Derm.*, 235: 374-385, 1969.
- HASHIMOTO, K. Infolded plasma membranes of keratinized cells. *Arch. klin. exp. Derm.*, 238: 53-60, 1970.
- HASHIMOTO, K. The marginal band: A demonstration of the thickened cellular envelope of the human nail cell with the aid of Lanthanum staining. *Archs. Derm.*, 103: 387-393, 1971a.

- HASHIMOTO, K. Cementsome. A new interpretation of the membrane coating granule. *Arch. Derm. Forsch.*, 240: 349-364, 1971b.
- HASHIMOTO, K., GROSS, B. G., NELSON, R. & LEVER, W. F. The ultrastructure of the skin of human embryos. III. The formation of the nail in 16-18 week old embryos. *J. Invest. Derm.*, 47: 205-217, 1966.
- HAYWARD, A. F. Electron microscopic observations on cell coat and membrane-coating granules of the epithelium of the hard and soft palate in the rat. *Archs. Oral Biol.*, 18: 67-75, 1973.
- HAYWARD, A. F. Ultrastructural changes in contents of membrane-coating granules after extrusion from epithelial cells of hamster cheek pouch. *Cell Tiss. Res.*, 187: 323-331, 1978.
- HAYWARD, A. F. & HACKEMANN, M. Electron microscopy of membrane-coating granules and a cell surface coat in keratinized and nonkeratinized human oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res.*, 43: 205-219, 1973.
- HELLER, M. & SHAPIRO, B. Enzymic hydrolyses of sphingomyelin by rat liver. *Biochem. J.*, 98: 763-769, 1966.
- HELWIG, E. B. & MOSTOFI, F. K. *The Skin*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1971.
- HENRIKSON, R. C. & STACY, B. D. The barrier to diffusion across ruminal epithelium a study by electron microscopy using horseradish peroxidase, lanthanum and ferritin. *J. Ultrastruct. Res.*, 34: 72-82, 1971.
- HERDENSTAM, C. G. Survey of previous biochemical studies on psoriasis. *Acta Derm.-vener.*, 42 (Suppl. 47): 9-12, 1962.
- HIRSCH, G. C. *Form- und Stoffwechsel der Golgi-Körper*. Berlin, Springer, 1939.
- HOAGLAND, C. L., SMADEL, J. E. & RIVERS, T. M. Constituents of elementary bodies of vaccinia. I. Certain basic analyses

- and observations on lipid components of the virus. *J. exp. Med.*, 71: 737-750, 1940.
- HOLMAN, R. T. Essential fatty acid deficiency. In: *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*. Vol. IX. Oxford, Pergamon, p. 279-348, 1968.
- HOLMES, A. W. A fatty acid/protein complex in human hair. *Nature*, 189: 923, 1961.
- HOLT, E., TIDWELL, H. C., KIRK, C. M., CROSS, D. M. & BALTIMORE, S. N. Fat absorption in normal infants. *J. Pediat.*, 6: 427-479, 1935.
- HÖNIGSMANN, H. & WOLFF, K. Continuity of intercellular space and endoplasmic reticulum of keratinocytes. *Exp. Cell Res.*, 80: 191-209, 1973.
- HOTCHKISS, R. D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.*, 16: 131-141, 1948.
- HUET, C. & HERZBERG, M. Effects of enzymes and EDTA or ruthenium red and concanavalin A labeling of the cell surface. *J. Ultrastruct. Res.*, 42: 186-199, 1973.
- IDSON, B. Water and the skin. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 24: 197-212, 1973.
- INNES, P. B. The nature of the granules within sulcular epithelial cells. *J. periodont. Res.*, 8: 252-262, 1973.
- JARRETT, A. In: *Progress in the Biological Sciences in Relation to Dermatology*. BROOK, A. (ed.). London, Cambridge University Press, p. 135-147, 1960.
- JARRETT, A. & RILEY, P. A. Esterase activity in dendritic cells. *Br. J. Derm.*, 75: 79-81, 1963.
- JARRETT, A. & SPEARMAN, R. I. Histochemistry in normal epidermal keratinization. In: *Histochemistry of the Skin-*

- Psoriasis*. London, The English Universities Press, p. 8-23, 1964.
- JARRETT, A., SPEARMAN, R. I. & HARDY, J. A. Histochemistry of keratinization. *Br. J. Derm.*, 71: 227-295, 1959.
- JOHNSON, P. L. & Bevelander, G. Glycogen and phosphatase in the developing hair. *Anat. Rec.*, 95: 193-197, 1946.
- KANDUTSCH, A. A. Sterol metabolism in skin and epidermis. In: *The Epidermis*. MONTAGNA, W. & LOBITZ, W. C., Jr. (eds.). New York, Academic Press, p. 493-510, 1964.
- KILE, R. L., SNYDER, F. H. & HAEFELE, J. W. Nature of skin lipids in acne. *Arch. Derm. Syph.*, 61: 792-798, 1950.
- KING, L. S. Effects of podophyllin on mouse skin. III. A study of epidermal fibrils. *J. Nat. Cancer Inst.*, 10: 689-709, 1950.
- KINGERY, F. A. J. & KELLUM, R. C. Essential fatty acid deficiency. Histochemical changes in the skin of rats. *Archs. Derm.*, 91: 272-279, 1965.
- KIRKMAN, H. & SEVERINGHAUS, A. E. A review of the Golgi apparatus. I. *Anat. Rec.*, 70: 413-429, 1938a.
- KIRKMAN, H. & SEVERINGHAUS, A. E. A review of the Golgi apparatus. II. *Anat. Rec.*, 70: 557-573, 1938b.
- KIRKMAN, H. & SEVERINGHAUS, A. E. A review of the Golgi apparatus. III. *Anat. Rec.*, 71: 79-103, 1938c.
- KLIGMAN, A. M. & Shelley, W. B. An investigation into the biology of the sebaceous gland. *J. Invest. Derm.*, 30: 99-125, 1958.
- KOOYMAN, D. J. Lipids of the skin: Some changes in the lipids of the epidermis during the process of keratinization. *Arch. Derm. Syph.*, 25: 444-450, 1932.

- KOPPENHOEFFER, R. M. A review of the role of lipids in the manufacture of leather. *J. Am. Leath. Chem. Assn.*, 37: 118-131, 1942.
- KORN, E. D. & WEISMAN, R. A. I. Loss of lipids during preparation of amoebae for electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 116: 309-316, 1966.
- KUROSUMI, K. Some aspects of the keratinization process of epidermal and pilary epithelial cells as observed by electron microscopy. In: *Biochemistry of Cutaneous Epidermal Differentiation*. SEIJI, M. & BERNSTEIN, I. A. (eds.). London, University of Park Press, p. 3-28, 1977.
- LAVKER, R. M. Lipid synthesis in chick epidermis. *J. Invest. Derm.*, 65: 93-101, 1975.
- LAVKER, R. M. Membrane coating granules: The fate of the discharged lamellae. *J. Ultrastruct. Res.*, 55: 79-86, 1976.
- LEE, L. D. & BADEN, H. P. Chemistry and composition of the keratins. *Int. J. Derm.*, 14: 161-171, 1975.
- LEE, L. D., BADEN, H. P., KUBILUS, J. & FLEMING, B. F. Immunology of epidermal fibrous proteins. *J. Invest. Derm.*, 67: 521-525, 1976.
- LEE, L. D., FLEMING, B. F., WAITKUS, R. F. & BADEN, H. P. Isolation of the polypeptide chains of prekeratin. *Biochim. Biophys. Acta*, 412: 82-90, 1975.
- Le ROSEN, A. L., MORAVEK, R. T. & CARLTON, J. K. Streack reagents for chromatography. *Anal. Chem.*, 24: 1335-1336, 1952.
- LEVIN, E., JOHNSON, R. M. & ALBERT, S. Mitochondrial changes associated with essential fatty acid deficiency in rats. *J. Biol. Chem.*, 228: 15-21, 1957.
- LEWIS, C. A. & HAYWARD, B. J. Human skin surface lipids. *Mod. Trends Derm.*, 4: 89-121, 1971.

- LILLIE, R. D. *Histopathological Technic and Practical Histochemistry*. 2nd. ed., New York, Blakiston, 1954.
- LILLIE, R. D. & FULLMER, H. M. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York, McGraw-Hill Book Co., 1976.
- LINCKE, H. Beiträge zur Chemie und Biologie des Hautoberflächenfettes. *Arch. Derm. Syph.*, 188: 453-481, 1949.
- LINCKE, H. & KLÄWI, K. Zur Cholesterinbestimmung in Hautfett. *Arch. Derm. Syph.*, 192: 402-422, 1951.
- LINSER, P. Über den Hauttalg beim gesunden und bei einigen Hauterkrankungen. *Dt. Arch. klin. Med.*, 80: 201-224, 1904.
- LISON, L. *Histochimie et Cytochimie animales*. Paris, Gauthier Villars, 1960.
- LISTGARTEN, M. A. The ultrastructure of human gingival epithelium. *Am. J. Anat.*, 114: 49-69, 1964.
- LITVAC, A. Sur la kératinisation épithéliale "in vitro". *Archs. Anat. microsc.*, 35: 55-63, 1940.
- LOMBARDO, C. Il glicogeno della cute. *Giorn. ital. mal. vener.*, 42: 448-464, 1907.
- LONG, V. J. W. Variations in lipid composition at different depths in the cow snout epidermis. *J. Invest. Derm.*, 55: 269-273, 1970.
- LONG, V. J. W. Changes in the fatty acid composition of the phospholipids, triglycerides and free fatty acids with depth in the cow snout epidermis. *Br. J. Derm.*, 87: 227-234, 1972.
- LONG, V. J. W. Phospholipase A and lysophospholipase activity of the epidermis. *Br. J. Derm.*, 92: 603-610, 1975.
- LONG, V. J. W. & BOYCE, K. M. The phospholipid composition of

- guinea pig skin in relation to endogenous respiration. *Br. J. Derm.*, 85: 357-362, 1971.
- LORD, J. T. & ZIBOH, V. A. Specific binding of prostaglandin E_2 to membrane preparations from human skin: receptor modulation by UVB-irradiation and chemical agents. *J. Invest. Derm.*, 73: 373-377, 1979.
- LORD, J. T., ZIBOH, V. A. & WARREN, S. K. Specific binding of prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ by membrane preparations from rat skin. *Endocrinology*, 102: 1300-1309, 1978.
- LOWE, N. J. & STOUGHTON, R. B. Essential fatty acid deficient hairless mouse: a model of chronic epidermal hyperproliferation. *Br. J. Derm.*, 96: 155-162, 1977.
- LUCY, J. A. The fusion of biological membranes. *Nature*, 227: 815-817, 1970.
- LUDFORD, R. J. Cell organs during keratinization in normal and malignant growth. *Quart. J. microsc. Sci.*, 69: 27-57, 1924.
- LUZZATI, V. & HUSSON, F. The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems. *J. Cell Biol.*, 12: 207-219, 1962.
- MAHRLE, G. & ORFANOS, C. E. Ultrastructural localization and differentiation of membrane-bound ATP utilizing enzymes including adenyl cyclase in normal and psoriatic epidermis. *Br. J. Derm.*, 93: 495-507, 1975.
- MALI-NIJMEGEN, J. W. H. The transport of water through the human epidermis. *J. Invest. Derm.*, 27: 451-469, 1956.
- MARTINEZ, I. R., Jr. Fine structural studies of migrating epithelial cells following incision wounds. In: *Epidermal Wound Healing*. MAIBACH, H. I. & ROVEE, D. T. (eds.). Chicago, Year Book, p. 323-342, 1972.
- MARTINEZ, I. R., Jr. & PETERS, A. Membrane-coating granules and membrane modifications in keratinizing epithelia. *Am.*

- J. Anat.*, 130: 93-120, 1971.
- MATOLTSY, A. G. The chemistry of keratinization. In: *The Biology of Hair Growth*. MONTAGNA, W. & ELLIS, R. A. (eds.). New York, Academic Press, p. 135-165, 1958.
- MATOLTSY, A. G. Prekeratin. *Nature*, 201: 1130-1131, 1964a.
- MATOLTSY, A. G. Amino acid composition of prekeratin. *Nature*, 204: 380-381, 1964b.
- MATOLTSY, A. G. Soluble proteins in different levels of the epidermis. *J. Invest. Derm.*, 42: 111-114, 1964c.
- MATOLTSY, A. G. Soluble prekeratin. In: *Biology of the Skin and Hair Growth*. LYNE, A. G. & SHORT, B. F. (eds.). Sydney, Australia, Angus & Robertson, p. 291-305, 1965.
- MATOLTSY, A. G. Keratinization of the avian epidermis. An ultrastructural study of the newborn chick skin. *J. Ultrastruct. Res.*, 29: 438-458, 1969.
- MATOLTSY, A. G. Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: Their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. *J. Invest. Derm.*, 65: 127-142, 1975.
- MATOLTSY, A. G. Keratinization. *J. Invest. Derm.*, 67: 20-25, 1976.
- MATOLTSY, A. G. & BALSAMO, C. A. A study of the components of the cornified epithelium of human skin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1: 339-360, 1955.
- MATOLTSY, A. G., DOWNES, A. M. & SWEENEY, T. M. Studies of the epidermal water barrier. II. Investigations of the chemical nature of the water barrier. *J. Invest. Derm.*, 50: 19-26, 1968.
- MATOLTSY, A. G. & MATOLTSY, M. N. A study of soluble proteins of normal and pathologic horny tissues by a modified disc electrophoresis technic. *J. Invest. Derm.*, 41: 255-257, 1963.

- MATOLTSY, A. G. & PARAKKAL, P. F. Membrane-coating granules of keratinizing epithelia. *J. Cell Biol.*, 24: 297-307, 1965.
- MATOLTSY, A. G. & PARAKKAL, P. F. Keratinization. In: *Ultrastructure of Normal and Abnormal Skin*. ZELICKSON, A. S. (ed.). Philadelphia, Lea & Febiger, p. 76-104, 1967.
- MATTHEWS, V. J., NEWTON, J. K. & BLOOR, W. R. Skin lipids in experimental diabetes. *J. Biol. Chem.*, 108: 145-151, 1935.
- MCCULLOUGH, J. L., SCHREIBER, S. H. & ZIBOH, V. A. Cell proliferation kinetics of epidermis in the essential fatty acid deficient rat. *J. Invest. Derm.*, 70: 318-320, 1978.
- McMANUS, J. F. A. The histochemical demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202, 1946.
- MENTON, D. N. The relationship of transepidermal water loss to the epidermal hyperplasia produced by essential fatty acid deficiency. *Anat. Rec.*, 157: 287A, 1967.
- MENTON, D. N. The effects of essential fatty acid deficiency on the skin of the mouse. *Am. J. Anat.*, 122: 337-355, 1968.
- MENTON, D. N. The effects of essential fatty acid deficiency on the fine structure of mouse skin. *J. Morphol.*, 132: 181-205, 1970.
- MERCER, E. H. Some experiments on the orientation and hardening of keratin in the hair follicle. *Biochim. Biophys. Acta*, 3: 161-169, 1949.
- MERCER, E. H. *Keratin and Keratinization. An Essay in Molecular Biology*. New York, Pergamon Press, 1961.
- MICKELSEN, O. & KEYS, A. The composition of sweat with special reference to the vitamins. *J. Biol. Chem.*, 149: 479-490, 1943.
- MIER, P. D. & VAN DEN HURK, J. J. M. A. Direct biochemical assay of the lipase activity of epidermis. *Dermatologica*,

149: 284-288, 1975.

- MONTAGNA, W. Perinuclear sudanophil bodies in mammalian epidermis. *Quart. J. microsc. Sci.*, 91: 205-208, 1950.
- MONTAGNA, W. The cytology of mammalian epidermis and sebaceous glands. *Int. Rev. Cytol.*, 1: 265-304, 1952.
- MONTAGNA, W. *The Structure and Function of Skin*. 2nd. ed., New York, Academic Press, 1962.
- MONTAGNA, W. & CHASE, H. B. Redifferentiation of sebaceous glands in the mouse after total extirpation with methylcholanthrene. *Anat. Rec.*, 107: 82-92, 1950.
- MONTAGNA, W. & FORMISANO, V. Histology and cytochemistry of human skin. VII. The distribution of succinic dehydrogenase activity. *Anat. Rec.*, 122: 65-78, 1955.
- MONTAGNA, W. & HAMILTON, J. B. The sebaceous glands of the hamster. II. Some cytochemical studies in normal and experimental animals. *Am. J. Anat.*, 84: 365-395, 1949.
- MONTAGNA, W. & NOBACK, C. R. Histochemical observations on the sebaceous glands of the rat. *Am. J. Anat.*, 81: 39-62, 1947.
- MONTAGNA, W., NOBACK, C. R. & ZAK, F. G. Pigment, lipids and other substances in the glands of the external auditory meatus of man. *Am. J. Anat.*, 83: 409-436, 1948.
- MONTAGNA, W. & PARKS, H. F. A histochemical study of the glands of the anal sac of the dog. *Anat. Rec.*, 100: 297-318, 1948.
- MOSER, H. W. & LEES, M. Sulfatide Lipidosis; Metachromatic Leukodystrophy. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease*. 2nd. ed., STANBURY, J. B., WYNGAARDEN, J. B. & FREDERICKSON, D. S. (eds.). New York, McGraw-Hill, p. 539-564, 1966.

- NICOLAIDES, N. Human skin surface lipids: origin, composition and possible function. *Adv. Biol. Skin.*, 4: 167-187, 1963.
- NICOLAIDES, N. Lipids, membranes and the human epidermis. In: *The Epidermis*. MONTAGNA, W. & LOBITZ, W. C., Jr. (eds.). New York, Academic Press, p. 511-538, 1964.
- NICOLAIDES, N. Skin lipids. II - Lipid class composition of samples from various species and anatomical sites. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 42: 691-702, 1965.
- NICOLAIDES, N. Skin lipids: Their biochemical uniqueness. *Science*, 186: 19-26, 1974.
- NICOLAIDES, N., ANSARI, M. N. A., FU, H. C. & LINDSAY, D. G. Lipid composition of comedones compared with that of human skin surface in acne patients. *J. Invest. Derm.*, 54: 487-495, 1970.
- NICOLAIDES, N., FU, H. C., ANSARI, M. N. A. & RICE, B. R. The fatty acids of wax esters and sterol esters from vernix caseosa and from human skin surface lipid. *Lipids*, 7: 506-517, 1972.
- NICOLAIDES, N. & ROTHMAN, S. The site of sterol and squalene synthesis in the human skin. *J. Invest. Derm.*, 24: 125-129, 1955.
- NICOLAU, S. Recherches histologiques sur la graisse cutanée. *Annls. Derm. Syph.*, 2: 641-658, 1911.
- NIEBAUER, G. & EBNER, H. Zur elektronenmikroskopischen Darstellung der Keratinosomen (Odland-Körper) mit Hilfe der Osmium-Zinkjodid-Methode. *Cytobiologie*, 1: 322-327, 1970.
- NIEBAUER, G., KRAWCZYK, W. S., KIDD, R. L. & WILGRAM, G. F. Staining of lipids in keratinosomes. *J. Invest. Derm.*, 52: 367-368, 1969.
- NIEMINEN, E., LEIKOLA, E., KOLJONEN, M., KIISTALA, U. & MUSTAKALLIO, K. K. Quantitative analysis of epidermal

- lipids by TLC with special reference to seasonal and age variation. *Acta Derm.-vener.*, 47: 327-338, 1967.
- NOVIKOFF, A. B., ESSNER, E., GOLDFISCHER, S. & HEUS, M. Nucleosidediphosphatase activities of cytomembranes. In: *The Interpretation of Ultrastructure*. HARRIS, R. J. C. (ed.). New York, Academic Press, p. 149-192, 1962.
- NOVIKOFF, A. B. & GOLDFISCHER, S. Nucleosidediphosphatase activity in the Golgi apparatus and its usefulness for cytological studies. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 47: 802-810, 1961.
- ODLAND, G. F. The fine structure of the interrelationship of cells in the human epidermis. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4: 529-538, 1958.
- ODLAND, G. F. A submicroscopic granular component in human epidermis. *J. Invest. Derm.*, 34: 11-15, 1960.
- OHKIDO, M., ABE, T. & MATSUO, I. Epidermal cholesterol as a barrier for transepidermal water loss. In: *Biochemistry of Cutaneous Epidermal Differentiation*. SEIJI, M. & BERNSTEIN, I. A. (eds.). London, University of Park Press, p. 230-237, 1977.
- OHKIDO, M., MATSUO, I., USUKI, K., HATANO, H. & KANNO, T. Phospholipids biosynthesis in psoriatic epidermis. *Jap. J. Derm., Ser. B*, 80: 80-83, 1970.
- OHKIDO, M., SUGIHARA, I. & ONO, M. Lipogenesis in the rat epidermis utilization of acetate. *Jap. J. Derm., Ser. A*, 82: 511-517, 1972a.
- OHKIDO, M., SUGIHARA, I. & OHNO, M. Synthesis in epidermal triglycerides. *Jap. J. Derm., Ser. A*, 82: 734-738, 1972b.
- OHKIDO, M., SUZUKI, K., SUGIHARA, I. & MIZUNO, N. Effects of ultraviolet irradiation on human skin lipids. In vivo and in vitro studies. *Acta Derm.-vener.*, 54: 223-226, 1974.

- OLÁH, I. & RÖHLICH, P. Phospholipidgranula im verhornender Oesophagusepithel. *Z. Zellforsch.*, 73: 205-219, 1966.
- OLSON, R. L., NORDQUIST, J. & EVERETT, M. A. Ultrastructural localization of aryl sulfatase in human epidermis. *Acta Derm.-vener.*, 48: 556-562, 1968.
- OLSON, R. L., NORDQUIST, J. & EVERETT, M. A. Small granules of the superficial epidermis. *Arch. klin. exp. Derm.*, 234: 15-24, 1969.
- ONKEN, H. D. & MOYER, C. A. The water barrier in human epidermis. Physical and chemical nature. *Archs. Derm.*, 87: 584-590, 1963.
- OTTENSTEIN, B., BONCODDO, N., WALKER, A. & THURMON, F. M. Experiments on the choline content of the skin and sebum. *J. Invest. Derm.*, 19: 105-108, 1952.
- OVERTON, J. Cell junctions and their development. *Prog. Surf. Memb. Sci.*, 8: 161-171, 1974.
- PANOS, T. C. & FINERTY, J. C. Effects of a fat-free diet on growing female rats, with special reference to the endocrine system. *J. Nutr.*, 49: 397-424, 1953.
- PARAKKAL, P. F. & MATOLTSY, A. G. An electron microscopic study of developing chick skin. *J. Ultrastruct. Res.*, 23: 403-416, 1968.
- PARAT, M. Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme. Chondriome, vacuome, appareil de Golgi, enclaves, colorations vitales; pH, oxidases, peroxidases, rH de la cellule animale. *Archs. Anat. microsc.*, 24: 73-357, 1928.
- PARRISH, J. A., BADEN, H. P., GOLDSMITH, L. A. & MATZ, M. H. Studies of the density and the properties of the hair in a new inherited syndrome of hypotrichosis. *Ann. Human Genet.*, 35: 349-356, 1972.
- PARSONS, W. B., Jr. & FLINN, J. H. Reduction of serum cholesterol

- levels and beta-lipoprotein cholesterol levels by nicotinic acid. *Archs. intern. Med.*, 103: 783-790, 1959.
- PASCHER, I. Molecular arrangements in sphingolipids. Conformation and hydrogen bonding of ceramide and their implication on membrane stability and permeability. *Biochim. Biophys. Acta*, 455: 433-451, 1976.
- PEARSE, A. G. E. *Histochemistry. Theoretical and Applied*. 2nd. ed., London, Churchill, 1960.
- PROTTEY, C. Essential fatty acids and the skin. *Br. J. Derm.*, 94: 579-587, 1976.
- PROTTEY, C. Investigation of functions of essential fatty acids in the skin. *Br. J. Derm.*, 97: 29-38, 1977.
- PROTTEY, C., HARTOP, P. J. & PRESS, M. Correction of the cutaneous manifestations of essential fatty acid deficiency in man by application of sunflower-seed oil to the skin. *J. Invest. Derm.*, 64: 228-234, 1975.
- RAKNERUD, N. Marginal band of the transitional and horny cells of the epidermis of the hairless mouse. *J. Ultrastruct. Res.*, 42: 404A, 1973.
- RAKNERUD, N. The ultrastructure of the interfollicular epidermis of the hairless (hr./hr.) mouse. II. Plasma membrane modifications during keratinization. *Virchows Arch. path. Anat.*, 17: 113-135, 1974.
- RAKNERUD, N. Intercellular substance in the horny layer of the epidermis of hairless mouse. *J. Ultrastruct. Res.*, 50: 370A, 1975.
- RAMALINGASWAMI, V. & SINCLAIR, H. M. The relation of deficiencies of vitamin A and of essential fatty acids to follicular hyperkeratosis in the rat. *Br. J. Derm.*, 65: 1-22, 1953.
- RAMASASTRY, P., DOWNING, D. T., POCHI, P. E. & STRAUSS, J. S. Chemical composition of human skin surface lipids from

- birth to puberty. *J. Invest. Derm.*, 54: 139-144, 1970.
- RAMBOURG, A. Morphological and histochemical aspects of glycoproteins at the surface of animal cells. *Int. Rev. Cytol.*, 31: 57-114, 1971.
- RAMBOURG, A. & LEBLOND, C. P. Electron microscope observations on the carbohydrate-rich cell coat present at the surface of cells in the rat. *J. Cell Biol.*, 32: 27-53, 1967.
- RANVIER, L. Histologie de la peau. I. La matière grasse de la couche cornée de l'épiderme chez l'homme et les mammifères. *Archs. Anat. microsc.*, 2: 510-514, 1898.
- RAUSCHKOLB, E. W., DAVIS, H. W., FENIMORE, D. C., BLACK, H. S. & FABRE, L. F., Jr. Identification of vitamin D₃ in human skin. *J. Invest. Derm.*, 53: 289-294, 1969.
- REINERTSON, R. P. & WHEATLEY, V. R. Studies on the chemical composition of human epidermal lipids. *J. Invest. Derm.*, 32: 49-59, 1959.
- REWALD, B. & SCHWIEGER, A. Über den Phosphatidgehalt der Haut. *Biochem. Z.*, 259: 180-181, 1933.
- RHODIN, J. A. G. & REITH, E. J. Ultrastructure of keratin in oral mucosa, skin, esophagus, claw, and hair. In: *Fundamentals of Keratinization*. BUTCHER, E. O. & SOGNAES, R. F. (eds.). Washington, D. C., American Association for the Advancement of Science, Publication n° 70, p. 61-94, 1962.
- RIELLA, M. C., BROVEAC, J. W. & WELLS, M. Essential fatty acid deficiency in human adults during total parenteral nutrition. *Ann. Intern. Med.*, 83: 786-789, 1975.
- ROGERS, G. E. Newer findings on the enzymes and proteins of hair follicles. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 83: 408-428, 1959.
- ROTHMAN, S. Abnormalities in the chemical composition of the skin surface film in psoriasis. *Arch. Derm. Syph.*, 62: 814-819, 1950.

- ROTHMAN, S. *Physiology and Biochemistry of the Skin*. Chicago, University of Chicago Press, 1954.
- ROTHMAN, S. & SCHAAF, F. Die Chemie der Haut. In: *Handbuch der Haut und Geschlechtskrankheiten*. JADASSOHN, J. (ed.). Berlin, Springer, 1/2, p. 161-377, 1929.
- ROWDEN, G. Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. I. Combined electron microscope and cytochemical study of lysosomes in mouse epidermis and esophageal epithelium. *J. Invest. Derm.*, 49: 181-189, 1967.
- ROWDEN, G. Ultrastructural studies of keratinized epithelia of the mouse. II. Aryl sulfatase in lysosomes of mouse epidermis and esophageal epithelium. *J. Invest. Derm.*, 51: 51-61, 1968.
- RUDALL, K. M. The proteins of the mammalian epidermis. *Adv. Protein Chem.*, 7: 253-290, 1952.
- RUPEC, M. Die Lysosomen. *Z. Haut. GeschlKrankh.*, 45: 67-83, 1970.
- SABATINI, D. D., BENSCH, K. & BARNETT, R. J. Cytochemistry and electron microscopy; the preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. *J. Cell Biol.*, 17: 19-58, 1963.
- SALKOWSKI, E. Über das Vorkommen von Cholesterinestern in der menschlichen Epidermis und die Reaktionen derselben. *Biochem. Z.*, 23: 361-363, 1910.
- SASAKAWA, M. Beiträge zur Glykogenverteilung in der Haut unter normalen und pathologischen Zuständen. *Arch. Derm. Syph.*, 134: 418-443, 1921.
- SCHEUPLEIN, R. J. Properties of the skin as a membrane. *Adv. Biol. Skin*, 12: 125-152, 1972.
- SCHEUPLEIN, R. J. & BLANK, I. H. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.*, 51: 702-747, 1971.

- SCHREINER, E. & WOLFF, K. Die Permeabilität des epidermalen Interzellularraumes für kleinmolekulares Protein. Ergebnisse elektronenmikroskopisch-cytochemischer Untersuchungen mit Peroxidase als Markierungssubstanz. *Arch. klin. exp. Derm.*, 235: 78-88, 1969.
- SCHREINER, E. & WOLFF, K. Der Interzellularraum der Epidermis. Ultrastrukturell-cytochemische Traceruntersuchungen. *Acta histochem.*, *Suppl. X*: 174-180, 1971.
- SCHULTZ, A. Eine Methode des mikrochemischen Cholesterinnachweises am Gewebsschnitt. *Zentbl. allg. Path. path. Anat.*, 35: 314-316, 1924.
- SCHURINGA, G. J., ISINGS, J. & ULTÉE, A. J., Jr. The chemical composition of the epicuticle of wool. I. The protein character of the epicuticle. *Biochim. Biophys. Acta*, 9: 457-467, 1952.
- SELBY, C. C. An electron microscope study of thin sections of human skin. II. Superficial cell layers of footpad epidermis. *J. Invest. Derm.*, 29: 131-149, 1957.
- SHEPHERD, M. I. & LINN, D. R. Evaluation of vitamin F. *Drug. Cosmet. Ind.*, 38: 629-632, 1936.
- SHIMIZU, T., FUKUYAMA, K. & EPSTEIN, W. L. Partial purification of proteins isolated from mammalian cornified cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 359: 389-400, 1974.
- SILVEIRA, S. R. & HADLER, W. A. Demonstração histoquímica da presença de vitamina D, colesterol e tocoferol, em epitélios queratinizados. *Ciência e Cultura*, 29 (Supl.): 583, 1977.
- SILVEIRA, S. R. & HADLER, W. A. Localização do tocoferol nas células epidérmicas, em diferentes fases de queratinização. In: *Resumos do II Congresso Brasileiro de Biologia Celular e VII Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica*, Rio de Janeiro, Brasil, p. 184-185, 1980a.

- SILVEIRA, S. R. & HADLER, W. A. Substâncias responsáveis pela positividade da reação do ferricianeto fêrrico na epiderme. II. Estudo em cortes histológicos de pele de mamíferos. *Ciência e Cultura*, 32 (Supl.): 588, 1980b.
- SILVEIRA, S. R. & HADLER, W. A. Demonstração histoquímica do local de síntese da vitamina D, nos queratinócitos epidérmicos. *Ciência e Cultura*, 33 (Supl.): 587, 1981a.
- SILVEIRA, S. R. & HADLER, W. A. Destino do colesterol sintetizado na epiderme: Estudo histoquímico. *Ciência e Cultura*, 33 (Supl.): 586, 1981b.
- SIMPSON, G. M., BLAIR, J. H. & CRANSWICK, E. H. Cutaneous effects of new butyrophenone drug. *Clin. Pharmac. Ther.*, 5: 310-321, 1964.
- SINCLAIR, H. M. Essential fatty acids and the skin. *Br. Med. Bull.*, 14: 258-262, 1958.
- SINCLAIR, R. G. The physiology of the phospholipids. *Physiol. Rev.*, 14: 351-403, 1934.
- SINCLAIR, R. G. Fat metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, 6: 245-268, 1937.
- SKERROW, C. J. & MATOLTSY, A. G. Chemical characterization of isolated epidermal desmosomes. *J. Cell Biol.*, 63: 524-576, 1974.
- SNIDER, B. L., GOTTSCHALK, H. R. & ROTHMAN, S. The fate of choline in normal and pathologic keratinization. *J. Invest. Derm.*, 13: 323-324, 1949.
- SONDERGAARD, J., WADSKOV, S. A. & KOBAYASI, T. Electron microscopic cytochemical demonstration of adenyl cyclase in psoriatic epidermis. *J. Invest. Derm.*, 64: 294A, 1975.
- SPIER, H. W., RÖCKL, H. & PASCHER, G. Papiereléktrophoretische Studien über die löslichen Eiweisstoffe der menschlichen Haut. *Klin. Wschr.*, 32: 795-798, 1954.

- SPRUIT, D. & MALTEN, K. E. The regeneration rate of the water vapour loss of heavily damaged skin. *Dermatologica*, 132: 115-123, 1966.
- SQUIER, C. A. Ultrastructural observations of the keratinization process in rat buccal epithelium. *Archs. Oral Biol.*, 13: 1445-1451, 1968.
- SQUIER, C. A. The permeability of keratinized and nonkeratinized oral epithelium to horseradish peroxidase. *J. Ultrastruct. Res.*, 43: 160-177, 1973.
- SQUIER, C. A. & WATERHOUSE, J. P. Lysosomes in oral epithelium. The ultrastructural localization of acid phosphatase and non-specific esterase in keratinized oral epithelium in man and rat. *Archs. Oral Biol.*, 15: 153-168, 1970.
- SRERE, P. A., CHAIKOFF, I. L., TREITMAN, S. S. & BURSTEIN, L. S. The extrahepatic synthesis of cholesterol. *J. Biol. Chem.*, 182: 629-634, 1950.
- STEIN, O. & STEIN, Y. Lipid synthesis, intracellular transport, storage, and secretion. I. Electron microscopic radioautographic study of liver after injection of tritiated palmitate or glycerol in fasted and ethanol-treated rats. *J. Cell Biol.*, 33: 319-339, 1967.
- STERN, I. B., SEKERI-PATARYAS, K. H. & RABIN, M. Electrophoresis of soluble proteins extracted from cell suspensions of neonatal rat epidermis. *J. Invest. Derm.*, 61: 366-370, 1973.
- STEVENS, C. R. & DEVILLEZ, R. L. Enzymology, with applications to dermatology. *Int. J. Derm.*, 19: 295-309, 1980.
- STOECKENIUS, W. Some electron microscopical observations on liquid-crystalline phases in lipid-water systems. *J. Cell Biol.*, 12: 221-229, 1962.
- STOECKENIUS, W. & ENGELMAN, D. M. Current models for the structure of biological membranes. *J. Cell Biol.*, 42: 613-646,

1969.

- SUSKIND, R. R. The chemistry of the human sebaceous gland. I. Histochemical observations. *J. Invest. Derm.*, 17: 37-54, 1951.
- SUZUKI, H. & ISHIKAWA, K. Fine-structural changes in epidermal keratinocytes after chloroform-methanol treatment. *Jap. J. Derm., Ser. A*, 83: 616-619, 1973.
- SWANBECK, G. Macromolecular organization of epidermal keratin. An X-ray diffraction study of the horny layer from normal, ichthyotic and psoriatic skin. *Acta Derm.-vener.*, 39 (Suppl. 43): 1-37, 1959.
- SWANBECK, G. & THYRESSON, N. A study of the state of aggregation of the lipids in normal and psoriatic horny layer. *Acta Derm.-vener.*, 42: 445-457, 1962.
- SWEENEY, T. M. & DOWNING, D. T. The role of lipids in the epidermal barrier to water diffusion. *J. Invest. Derm.*, 55: 135-140, 1970.
- TAYLOR, J. D., PAUL, H. E. & PAUL, M. F. Biochemistry of wound healing. III. Total lipid, phospholipid, and cholesterol content of skin and repair tissue of skin wounds. *Arch. Biochem.*, 17: 421-428, 1948.
- TEZUKA, T. The extraction and partial purification of the deoxycholate-soluble matrix protein from human plantar horny layers. *Acta Derm.-vener.*, 55: 401-412, 1975.
- TEZUKA, T. Electron microscopic, histochemical and disc gel electrophoretic studies on the deoxycholate soluble proteins from human plantar horny layers. *Tohoku J. Exp. Med.*, 11: 209-221, 1976.
- TEZUKA, T. & FREEDBERG, I. M. Epidermal structural proteins. I. Isolation and purification of keratohyalin granules of the newborn rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 261: 402-417, 1972a.

- TEZUKA, T. & FREEDBERG, I. M. Epidermal structural proteins. II. Isolation and purification of tonofilaments of the newborn rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 263: 382-396, 1972b.
- THEISE, H. Lipide. In: *Molekulare Biologie der Zelle*. BEILKA, H. (ed.). Jena, VEB Gustav Fischer Verlag, p. 123-148, 1973.
- THOMPSON, R. H. S. & WHITTAKER, V. P. The esterases of skin. *Biochem. J.*, 38: 295-299, 1944.
- TIEDEMANN, K. Elektronenmikroskopischer Nachweis der Adenosintriphosphataseaktivität am Amnion-, Nabelstrang- und Hautepithel beim Schaffetus. *Histochemie*, 27: 310-319, 1971.
- UNNA, P. G. *Biochemie der Haut*. Jena, G. Fischer, 1913.
- UNNA, P. G. *Histochemie der Haut*. Leipzig, F. Deuticke, 1928.
- UNNA, P. G. & GOLODETZ, L. Biochemie der Haut. In: *Oppenheimer, Handbuch der Biochemie*. Suppl. vol., 1st. ed., Jena, G. Fischer, p. 327-348, 1903.
- UNNA, P. G. & GOLODETZ, L. Die Hautfette. *Biochem. Z.*, 20: 469-502, 1909.
- UNNA, P. G. & GOLODETZ, L. Die Cholesterinester der Hornschicht. *Biochem. Z.*, 25: 425-426, 1910.
- UNNA, P. G. & SCHUMACHER, J. *Lebensvorgänge in der Haut der Menschen und der Tiere*. Leipzig, F. Deuticke, 1925.
- VINSON, L. J., CHOMAN, D. R., KOEHLER, W. R., LEHMAN, M. D., MASURAT, T. & SINGER, E. J. Basic studies in percutaneous absorption. *Semiannual report to the Army Chem. Ctr.* Edgewood, Md. July - Dec., 1961.
- WARD, W. H. & LUNDGREN, H. P. The formation, composition, and properties of the keratins. *Adv. Protein Chem.*, 9: 243-297, 1954.

- WARWICK, W. J., HOLMAN, R. T., QUIE, P. G. & GOOD, R. A. Chylous ascites and lymphedema. *Am. J. Dis. Child.*, 98: 317-329, 1959.
- WEBSTER, D., FRANCE, J. T., SHAPIRO, L. D. & WEISS, R. X-linked ichthyosis due to steroid sulfatase deficiency. *Lancet*, 1: 70-72, 1978.
- WHALEY, W. G., DAUWALDER, M. & KEPHART, J. E. Assembly, continuity, and exchanges in certain cytoplasmic membrane systems. In: *Origin and Continuity of Cell Organelles*. Vol. 2. REINERT, J. & URSPRUNG, H. (eds.). Berlin, Springer, p. 1-45, 1974.
- WHEATLEY, V. R. Possible clinical applications of the study of the cutaneous lipids with special reference to a simple method for the rapid quantitative examination of surface-lipid samples. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 41: 353-369, 1965.
- WHEATLEY, V. R. & FLESCH, P. Horny layer lipids. II. Further studies on the overall chemical composition of lipids from normal and pathological human stratum corneum. *J. Invest. Derm.*, 49: 198-205, 1967.
- WHEATLEY, V. R., FLESCH, P., ESODA, E. C. J., COON, W. M. & MANDOL, L. Studies of the chemical composition of the horny layer lipids. *J. Invest. Derm.*, 43: 395-405, 1964.
- WHITE, A., HANDLER, P. & SMITH, E. L. *Principles of Biochemistry*. New York, McGraw-Hill, Book, 1973.
- WICKS, L. F. & SUNTZEFF, V. Reduction of total lipid-protein nitrogen ratio of mouse epidermis by single application of methylcholanthrene. *J. Nat. Cancer Inst.*, 3: 221-226, 1942.
- WIESE, H. F. Deficiency effects in human beings. In: *The Vitamins*. Vol. 3. SEBRELL, W. H., Jr. & HARRIS, R. S. (eds.). New York, Academic Press, p. 327-335, 1971.
- WILGRAM, G. F., KIDD, R. L., KRAWCZYK, W. S. & COLE, P. L. Sunburn effect on keratinosomes. A report with special note

- on ultraviolet induced dyskeratosis. *Archs. Derm.*, 101: 505-519, 1970.
- WILGRAM, G. F., KRAWCZYK, W. S. & CONNOLLY, J. E. Extraction of osmium zinc iodide staining material in keratinosomes. *J. Invest. Derm.*, 61: 12-21, 1973.
- WILKINSON, D. I. Variability in composition of surface lipids. The problem of epidermal contribution. *J. Invest. Derm.*, 52: 339-343, 1969.
- WILKINSON, D. I. Incorporation of acetate-1-¹⁴C into fatty acids of isolated epidermal cells. *J. Invest. Derm.*, 54: 132-138, 1970.
- WILKINSON, D. I. & FARBER, E. M. Free and esterified sters in surface lipids from uninvolved skin in psoriasis. *J. Invest. Derm.*, 48: 249-251, 1967.
- WILSON, J. D. Studies on the regulation of cholesterol synthesis in the skin and preputial gland of the rat. *Adv. Biol. Skin*, 4: 148-166, 1963.
- WILSON, J. W. & LEDUC, E. H. Mitochondrial changes in the liver of essential fatty acid-deficient mice. *J. Cell Biol.*, 16: 281-296, 1963.
- WINKELMANN, R. K., PERRY, H. O., ACHOR, R. W. & KIRBY, T. J. Cutaneous syndromes produced as side effects of triparanol therapy. *Archs. Derm.*, 87: 372-377, 1963.
- WISLOCKI, G. B. The staining of the intercellular bridges of the stratified squamous epithelium of the oral and vaginal mucosa by Sudan black B and Baker's hematein method. *Anat. Rec.*, 109: 388-389, 1951.
- WISLOCKI, G. B., FAWCETT, D. W. & DEMPSEY, E. W. Staining of stratified squamous epithelium of mucous membranes and skin of man and monkey by the periodic acid-Schiff method. *Anat. Rec.*, 110: 359-375, 1951.

- WOLFF, K. Über die Adenosintriphosphatase-aktivität der menschlichen Haut: eine histochemische Studie. *Arch. klin. exp. Derm.*, 218: 254-273, 1964.
- WOLFF, K. & SCHREINER, E. Differential enzymatic digestion of cytoplasmic components of keratinocytes. Electron microscopic observations. *J. Ultrastruct. Res.*, 36: 437-454, 1971.
- WOLFF-SCHREINER, E. C. Ultrastructural cytochemistry of the epidermis. *Int. J. Derm.*, 16: 77-102, 1977.
- WOLMAN, M. The lipids stained by the periodic acid-Schiff technique. *Stain Technol.*, 31: 241-245, 1956.
- WRIGHT, R. K., MANDY, S. H., HALPRIN, K. M. & HSIA, S. L. Defects and deficiency of adenyl cyclase in psoriatic skin. *Archs. Derm.*, 107: 47-53, 1973.
- YARDLEY, H. J. Sterols and keratinization. *Br. J. Derm.*, 81 (Suppl. 2): 29-38, 1969.
- YASUMA, A. & Ichikawa, T. Ninhydrin-Schiff and alloxan-Schiff staining. A new histochemical staining method for protein. *J. Lab. Clin. Med.*, 41: 296-299, 1953.
- YORK-MOORE, M. E. & RUNDLE, A. T. Rud's syndrome. *J. ment. Defic. Res.*, 6: 108-118, 1962.
- ZELICKSON, A. S. Normal human keratinization processes as demonstrated by electron microscopy. *J. Invest. Derm.*, 37: 369-379, 1961.
- ZELICKSON, A. S. *Electron Microscopy of Skin and Mucous Membrane*. Springfield, Charles C. Thomas, 1963.
- ZIBOH, V. A. & HSIA, S. L. Effects of prostaglandin E₂ on rat skin: Inhibition of sterol ester biosynthesis and clearing of scaly lesions in essential fatty acid deficiency. *J. Lipid Res.*, 13: 458-467, 1972.
- ZIBOH, V. A., LORD, J. T. & PENNEYS, N. S. Alterations of

prostaglandins E_2 -9-ketoreductase activity in proliferating skin. *J. Lipid Res.*, 18: 37-43, 1977.