

CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA CONSTITUCION QUIMICA DE LA SUSTANCIA CORNEA

PABLO P. GUAYMÁS

PROLOGO

La realización del trabajo de Seminario, titulado *Contribución al conocimiento de la constitución química de la sustancia córnea*, encuadrada en la rama de la Histología denominada Histoquímica, me ha deparado la satisfacción de iniciar el árduo camino de la investigación científica.

Como bien expresa Charles Oberling, en su libro *El problema del cáncer*, de que en Biología es necesario constancia y suerte, estoy convencido de tal acerto, y en alusión al último factor, puedo decir que, en mi caso, tuve la doble fortuna de encontrar en el Jefe de Anatomía Patológica del Instituto del Bocio de la Facultad de Medicina de la U.N.T., Dr. Dardo A. Escalante, al amigo y maestro inspirador, gracias al cual puede llevar a feliz término el fin propuesto, y de encontrar en la Histoquímica, ciencia ligada estrechamente a la Química Biológica, un vasto campo de experimentación.

La serie de ensayos que demandó el cumplimiento de mi tarea, la realicé en las instalaciones del Laboratorio de Anatomía Patológica del Instituto del Bocio, donde siempre se me facilitó deferentemente, todo lo necesario relativo a instrumental, material, drogas, etc., además de brindármese la cordialidad de todo su personal.

Debo agradecer también al profesor de Histología y Embriología de la Facultad de Ciencias Naturales, Dr. Faustino Carreras su ayuda en la realización del seminario.

Están presentes en mi memoria todas las personas que me hicieron llegar constantemente su voz de aliento en el curso de mi carrera, y a ellas hago llegar también mi reconocimiento.

INTRODUCCION

Como se sabe en la piel humana y en diversas faneras, aparece una sustancia, a nivel de la llamada capa granulosa del epitelio de cubierta que es la queratohialina que al transformarse en elaidina constituye la sustancia córnea. Por un mecanismo semejante aparece dicha sustancia a nivel de anexos como pelos, uñas, etc.

En lo que respecta a su función, parece la misma, estar vinculada particularmente a protección, de los elementos celulares subyacentes, aunque es probable que también se vincule a la eliminación de determinados productos del metabolismo celular.

Esta capa córnea se presenta como modificación a nivel de mucosas que normalmente no la poseen, como sucede en cuello uterino, labios, laringe, cuerdas vocales, etc., originando la lesión llamada leucoplasia. Es de gran interés que a nivel de esta lesión se observa una transformación carcinomatosa elevada, tanto que numerosos autores llegan a considerarla como lesión preneoplásica.

Por ello nos parece que conocer su composición química y de ser posible, deducir de ella su vinculación con el metabolismo celular, puede tener mayor interés del que a una consideración rápida del problema pudiera surgir.

Referente a su constitución química dice A. G. Everson Pearse (Histoquímica Teórica y Aplicada) Ed. Aguilar Madrid 1960 pág. 107, lo siguiente:

Queratina: Esta proteína fibrosa se caracteriza por su alto contenido de aminoácidos básicos: arginina, lisina e histidina y del aminoácido sulfurado cistina.

Referente al proceso de queratinización, dice el mismo autor en la pág. 108 de la obra mencionada:

El proceso de queratinización". El principal cambio que tiene lugar en la piel humana normal es la oxidación de los grupos SH-

en los extractos inferiores para formar grupos S.S. en el extracto córneo.

Vemos pues que hace especial referencia a los grupos SH- y su posterior transformación.

En otros textos de Histoquímica a nuestro alcance, tales como L. Lison, *Histochimie et Cytochimie Animales*, Gauthier-Villars editores París 1953, y en George Gomori. *Microscopic Histochemistry* The University of Chicago Press. 1954, no hemos encontrado información especial sobre el problema. Sin embargo, en el libro mencionado de Lison, se lee en la pág. 241, en la referencia que dicho autor hace sobre los grupos SH- lo siguiente:

"Se puede admitir que la fijación histológica elimina las sustancias solubles y que sólo las sustancias con grupos SH- ligadas a las proteínas son puestas en evidencia después de la fijación.

Observaciones realizadas por nosotros, nos llevaban al convencimiento de que, por lo menos en la piel humana, intervienen en la constitución de la sustancia córnea, lípidos y en especial, fosfolípidos. Con el objeto de comprobar la veracidad de esta observación se efectuaron los estudios que se detallan a continuación:

MATERIAL Y METODOS

Se ha utilizado fragmentos de piel humana de personas recientemente fallecidas, en general dentro de las tres horas de haberse producido el deceso, los que fueron fijados en formal al 10 % y formol más cloruro de calcio al 1 %.

Se ha tratado así de evitar alteraciones cadavéricas ya que las mismas pueden ser descartadas, si la fijación de la piel se hace antes de las seis horas de haberse producido la muerte del enfermo.

El formol con el cloruro de calcio, se empleó porque de acuerdo con la técnica preconizada por Baker, el ion calcio evitaría la difusión de los fosfolípidos en el líquido fijador. Se supone que la acción de los iones calcio, cobalto y cadmio se debe a la formación de coacervatos complejos, es decir agrupamientos de fosfolípidos con otros constituyentes celulares (proteínas, mucopolisacáridos etc.). Con el material así fijado se realizaron las siguientes técnicas.

- I Coloración general de lípidos, con Sudán III y Sudán IV o rojo escarlata y Sudán Black.
- II Coloración de fosfolípidos, por el método de Smith-Baker.
- III Extracción de fosfolípidos con alcohol, luego éter y nueva coloración de Smith-Baker.
- IV Extracción con piridina para fosfolípidos y coloración de Smith-Baker.
- V Coloración de grupos sulfhidrilos con la técnica de Chevrèmont y Frederic.
- VI Bloqueo con cloruro mercúrico de los grupos sulfhidrilos y coloración de fosfátidos con la técnica de Smith-Baker.
- VII Bloqueo con cloruro mercúrico de los grupos sulfhidrilos y posterior coloración con el método de Chevrèmont y Frederic.
- VIII Coloración con métodos de plata para grupos derivados del fenilo, como tirosina, melanina, etc.
- IX Método de von Kossa para determinación indirecta de fosfatos.
- X Método de Lorrain-Smith-Cain, para grasas neutras y fosfolípidos.

A continuación examinaremos con más detenimiento los fundamentos en que se basan las coloraciones y algunos aspectos de sus técnicas.

I COLORACION GENERAL DE LIPIDOS CON SUDAN III

El Sudán III es un colorante artificial diazoico, indiferente, es decir ni ácido ni básico, con dos grupos cromóforos azoicos.

Es un polvo rojo pardo. P. F. 181-188°C, insoluble en agua, ácidos débiles y álcalis; soluble en alcohol, acetona, lípidos, aceites esenciales y vaselinas.

La coloración es posvital, progresiva, directa y simple, estando basada, en la solubilidad de los colorantes inertes bisazo, por acciones físicas de ósmosis, capilaridad, absorción y adsorción en las grasas, inclusive en pequeñas cantidades de fosfátidos.

Se ha demostrado, que con las técnicas corrientes que se describen a continuación, la tinción en grados variables, se realiza no sólo sobre las grasas neutras sino también sobre lípidos diversos, incluyendo los fosfolípidos. Como control se han utilizado técnicas específicas para estos últimos, que serán detallados en otro apartado.

Soluciones Necesarias

Hematoxilina de Mayer (Preparada en 2 días)
Sudán III
Alcohol de 70°

PREPARACIONES

Hematoxilina de Mayer

Sol. A: Disolver 1 gr. de hematoxilina de 10 ml. de alcohol de 100° en frío.

Sol. B: Disolver 50 gr. de Alumbre de Potasio (en polvo) en más o menos 500 ml. de agua destilada.

Sal. C: Iodato de sodio 0,2 gr. Es importante no poner más cantidad que ésta.

Agregar Sol. A, en la Sol. B y también C, dejando de un día hasta el siguiente, hasta color violeta intenso.

Sol D: Hidrato de Cloral 50 gr. disuelto en 200 ml. de agua destilada.

Sol E: Acido cítrico (en cristales) 1 gr. disuelto en 100 ml. de agua destilada.

Estas dos preparaciones D y E, añadir a la mezcla anterior y completar con agua destilada hasta 1000 ml.

Alcohol de 70° a partir de un alcohol de 96°

Alcohol 96	184 ml.
Agua destilada hasta	250 ml.

Preparación de Sudán III

Alcohol de 70°	100 ml.
Agregar Sudán hasta saturación, más o menos	150 mgr.

Técnica de la coloración para cortes hechos por congelación

Luego de practicados los cortes por congelación, se depositan en agua destilada y:

1º Llevar a hematoxilina de Mayer, diez minutos, para colorear núcleos.

2º Se viran en agua común y lavan en agua destilada diez minutos.

3º Pasaje rápido por alcohol de setenta grados, aproximadamente un minuto.

4º Llevar al Sudán III en tapa de Borrel a estufa de 37°C. (sin tapar ni envolver), durante 30 minutos.

5º Sacar y pasar por alcohol de setenta grados y luego agua destilada.

6º Levantar los cortes en portaobjeto sin albúmina, secar con papel de filtro, montar en glicerina, bordear con parafina y observar.

b) Coloración General de Lípidos con Sudán IV o Rojo Escarlata

El Sudán IV, lo mismo que el Sudán III, es también un colorante azoico, indiferente, artificial.

Es un polvo rojizo, insoluble en agua, menos soluble en alcohol que el Sudán III, soluble en lípidos, acetona, etc.

Todo lo dicho para el Sudán III, tanto en su mecanismo de la coloración como en su técnica es valedero para este colorante. Sólo agregaremos la fórmula que empleamos en su preparación.

Alcohol de 70°	50 ml.
Acetona	50 ml.
Agregar el Sudán IV hasta obtener solución saturada.	

c) Coloración general de lípidos con Sudán Black

El Sudán Black, es un colorante de tipo análogo a los anteriores.

Es insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos y lípidos.

Preparación

Se disuelve el Sudán Black, en alcohol de 70° hasta solución saturada.

Técnica de la coloración

Los cortes hechos por congelación se llevan al agua destilada y luego a:

1º Solución de Sudán Black a 37°C. en estufa durante una hora.

2º Pasar por alcohol de 70º para eliminar el exceso.

3º) Lavar en agua destilada y montar en glicerina.

II COLORACION DE FOSFOLIPIDOS CON EL METODO DE SMITH-BAKER

El fundamento del método de Dietrich, se basaba en el tratamiento del tejido con mezcla de formaldehído-bicromato de potasio, mediante los cuales los lipoides se oxidaban y combinaban con el cromo. Este a su vez, produce un color negro con la hematoxilina ácida. Los lípidos que se podían poner en evidencia con este método, comprendían fosfolípidos y galaetolípidos o cerebrósidos. La cromación se efectuó originalmente a 37°C, pero Kaufman y Lehmann consideraron necesaria, la temperatura de 60°C. Lisson considera que un tinte grisáceo no tiene valor porque puede ser producido por grasas neutras. Baker, por ensayos in vitro, demostró, que la cefalina y la esfingomiéline se tiñen en negro con el procedimiento de Smith-Dietrich, como lo hacen las lecitinas cuando se combinan con otros lípidos. La lecitina sola, no reacciona.

Métodos de la hemateína ácida

El principio del método de Smith-Dietrich fue utilizado por Baker. Después de la fijación del tejido en formol-calceio, se efectúa una prolongada cromación a 22º ó 60°C, según el método a seguir, en una mezcla de bicromato de potasio-cloruro de calcio. Se colocan los cortes en una solución recientemente preparada y oxidada de hemateína ácida. La diferenciación se llevaba a cabo en una mezcla de bórax-ferricianuro de potasio.

Las reacciones que se pueden obtener según Baker con este método son:

Fibrinógeno	Azul pálido sucio
Colágeno	Negativo
Mucina	Azul oscuro
Hemoglobina	Gris
Lecitina		} Azul oscuro
Cefalina	
Esfingomielina		
Nucleoproteínas	Azul oscuro

Baker estudió la reacción de la galactolipina purificada y obtuvo resultado negativo. Concluyó, que el método es específico para los fosfolípidos. Según Cain, los resultados son útiles, considerando sólo los francamente positivos.

Según este autor, el mecanismo de la reacción es como sigue:

1º Los fosfolípidos no son fijados por el formaldehído-calcio, pero se impide su paso a la solución por el calcio, por formación de coacervatos complejos.

2º Los fosfolípidos se combinan constantemente con las sales de cromo y se vuelven insolubles y ácidos.

3º Al teñir, se forman colores azules o pardos, cuando el colorante se une al cromo.

4º Al diferenciar, los colores intensos dados por las sustancias que contienen fosfolípidos, permanecen resistentes. La mayoría de los colores pardos o azules débiles son reducidos o eliminados. Por esta razón, no debe abreviarse el período de diferenciación.

5º El período de cromación no debe prolongarse por la relativa afinidad que pueden tener otros lípidos con las sales de cromo.

Método de Smith-Baker o de la hemateína ácida para cortes por congelación.

Soluciones Necesarias

- 1º Fijador Formol-calcio
- 2º Solución de dicromato-calcio
- 3º Solución de hemateína ácida
- 4º Diferenciador, Bórax-ferricianuro.

Preparación de las soluciones

1º Fijador formol-calcio

Formalina comercial al 40 %	10 ml
Cloruro de calcio (anhidro)	1 gr
Agua destilada hasta	100 ml

2º Solución de dicromato-calcio

Dicromato de potasio	5 gr
Cloruro de calcio (anhidro)	1 gr
Agua destilada hasta	100 ml

3º Solución de hemateína ácida

Hematoxilina	50 mg
Yodato de sodio al 1 %	1 ml
Acido acético glacial	1 ml
Agua destilada	48 ml

Se coloca todo lo indicado en las proporciones consignadas, excepto el ácido acético glacial, en un vaso de precipitación y se calienta hasta que el agua comienza a hervir; enfriar entonces y añadir el ácido. Esta solución debe usarse el mismo día de su preparación.

4º Diferenciador Bórax-ferricianuro

Ferricianuro de potasio	0,25 gr
Bórax	0,25 gr
Agua destilada	100 ml

Esta solución debe mantenerse en la oscuridad.

Técnica de la coloración

Los fragmentos de tejidos, luego de la fijación durante veinticuatro horas en formol-calcio, se someten a cortes por congelación y llevándolos al agua destilada, para pasarlos:

1º Dicromato-calcio, una hora en estufa a 60°C o dejar de 24 a 48 horas a temperatura ambiente (nosotros dejamos a temperatura ambiente).

2º Se lava en agua y dejan los cortes en la solución de hemateína ácida cinco horas a 37°C.

3º Se sacan de allí y se lavan en la solución del diferenciador, quedando luego en el diferenciador dieciocho horas.

4º Lavar y sin deshidratar, montar en glicerina y bordear con parafina.

III COLORACION DE SMITH-BAKER PREVIA EXTRACCION CON ALCOHOL-ETER

Los cortes hechos con el micrótono de congelación, se pasan al agua destilada y después a la extracción con alcohol común a 60°C, durante dos horas, posteriormente, extracción con éter por espacio de seis horas; despojamos de los restos de éter con un lavado en alcohol común, luego agua destilada y de aquí al dicromato-calcio, siguiendo ulteriormente con la técnica conocida.

IV COLORACION DE SMITH-BAKER, PREVIA EXTRACCION CON PIRIDINA

Una constatación negativa eficaz, en el reconocimiento de fosfolípidos, es someter los cortes de tejidos a una extracción prolongada con piridina y luego practicar sobre ellos la coloración específica para fosfátidos, previa cromación; una reacción positiva indicaría, que la misma es producida por sustancias que no corresponden al tipo de los fosfolípidos.

Método operatorio

Los cortes por congelación luego de lavados en agua destilada, se llevan a piridina por espacio de veinticuatro horas a temperatura ambiente, y después lavarlos con abundante agua. A continuación se practica el proceso de cromación y luego la técnica de coloración de Smith-Baker.

V COLORACION CON EL METODO DE CHEVREMONT- FREDERIC PARA GRUPOS SULFHIDRILOS

Este método ha sido empleado para grupos SH- de los aminoácidos azufrados, como cisteína, existentes en las proteínas constituyentes de la sustancia córnea.

Como de acuerdo con los autores consultados, en la capa córnea predominan grupos SH-, realizamos su identificación con el objeto siguiente:

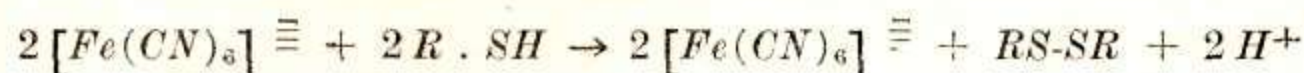
1º Determinar en una apreciación histológica, la proporción probable de ambos grupos: sulfhidrilos y fosfolípidos.

2º Establecer si la reacción de Smith-Baker para fosfolípidos, no producía reacciones, inespecíficas con los grupos SH-. Para ello, luego de identificar estos últimos, se efectuó el bloqueo con cloruro de mercurio.

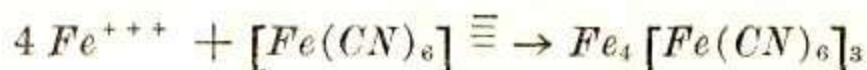
De esta manera, y aplicando este bloqueo previo a la realización de la técnica de Smith-Baker, se podía descartar que la positividad de la misma se debiera a grupos SH-, ya que dicho bloqueo inhibe las reacciones para estos grupos.

El fundamento de método de Chevrèmont y Frederic, estriba en lo siguiente:

Se basa en la reducción de una solución recientemente preparada de ferricianuro alcalino en medio ácido, pH- 2,4, mediante los grupos SH-tisulares.



El ion ferrocianuro resultante, se combina con el ion férrico suministrado por la solución de sulfato férrico, para dar un precipitado de azul de Prusia.



El método da reacción positiva con la lipofuesina y también con la melanina y grupos argentafines.

Utilizando el cloruro de mercurio, se bloquean los grupos sulfhidrilos; de manera que sólo pueden considerarse tales, a aquellos que después de bloqueados no reaccionen con la técnica de Chevrèmont y Frederic.

TECNICA DE LA COLORACION

Soluciones necesarias

- a) Solución de ferricianuro de potasio al 0,1 %
- b) Solución de $(SO_4)_3 Fe_2$ al 0,2 %

En el momento de usar, se mezclan las dos soluciones, el $(SO_4)_3 Fe_2$ y el ferricianuro en la proporción de 3 : 1 partes, respectivamente.

Método operatorio

1º Se fija durante algunas horas los fragmentos de piel, en formol al 10 % y se practican cortes por congelación.

2º Se llevan al agua destilada y de allí a la mezcla de reactivos en un tiempo de quince a veinte minutos, cambiando tres veces el reactivo y dejando más o menos cinco minutos en cada una.

3º Luego se lavan en agua destilada y se monta en glicerina.

VI BLOQUEO CON CLORURO DE MERCURIO Y COLORACION CON EL METODO DE CHEVREMONT Y FREDERIC

Como se ha dicho, el cloruro de mercurio, reaccionando con los grupos sulfhidrilos, bloquea a estos, con la formación de derivados mercaptánicos, impidiendo así, que reaccionen, reduciendo al ion ferricianuro.

Método operatorio

1º Los cortes hechos por congelación se lavan en agua destilada, para librarlos de restos de formaldeído.

2º Poner luego en una solución saturada de cloruro mercúrico, una hora a temperatura ambiente.

3º Lavar con agua destilada y pasar luego a

4º La mezcla de reactivos, formada por el ferricianuro de potasio y el sulfato férrico, en la manera corriente de ejecución de este método.

5º Luego lavar en agua y montar en glicerina.

VII BLOQUEO CON CLORURO MERCURICO DE LOS GRUPOS SH- Y POSTERIOR COLORACION CON EL METODO DE SMITH-BAKER

El bloqueo es hecho con el objeto de descartar una posible influencia perturbadora de los grupos tioles en la marcha de la coloración de fosfátidos, presentes en la sustancia córnea.

Método operatorio

1º) Los cortes por congelación, se lavan en agua destilada y luego de bloquear los SH-, como indicamos más arriba, lavamos con agua destilada y sometemos los cortes a la coloración específica para los fosfolípidos de Smith-Baker.

VIII COLORACION CON METODOS DE PLATA AMONICAL DE DEL RIO HORTEGA, PARA GRUPOS DERIVADOS DEL FENILO, COMO TIROSINA, MELANINA, Etc. PARA CORTES POR CONGELACION

La visualización del pigmento melánico, puede realizarse por la llamada dopa reacción, ante la dioxifenilalanina y por los métodos de impregnación argéntica. Estos últimos pueden corresponder a reacciones de argentafinidad o de argentofilia. Las primeras reacciones de argentafinidad, no emplean un reductor después de la impregnación con el licor argéntico; tipo de esta técnica es la reacción de Masson. Las coloraciones argentófilas, se logran empleando un reductor tal como el formol u otros, como los reductores de tipo fotográficos, después de la acción de la solución de plata amoniacal. Este último tipo de reacción no es específica y según algunos autores, pigmentos lipóidicos también pueden producirla. En lo que respecta a la constitución de la melanina, se está hoy de acuerdo, que corresponde a un tipo de la dioxifenilalanina oxidada. Las células productoras de melanina, poseen las oxidasas necesarias.

A efecto de establecer:

1º) Si los lipoides de la capa córnea, podían dar esta reacción, y

2º) Si en dichas capas existían cuerpos de estructuras semejantes a la melanina que pudieran ser responsables de reacciones falsas para lipoides, se efectuaron las impregnaciones argénticas, con la técnica que a continuación consignamos.

Soluciones necesarias

- a) Carbonato de plata amoniacal
- b) Sulfito de sodio al 0,5 %
- c) Formol al 1 %

Preparación de las soluciones

- a) *Carbonato de plata amoniacal*
Carbonato de sodio al 5 % 90 ml.
Nitrato de plata al 10 % 30 ml
Agua destilada hasta 450 ml

En un vaso de precipitación, se ponen las soluciones de carbonato de sodio y nitrato de plata, agregando luego amoníaco suficiente hasta disolver el precipitado; finalmente completar con agua destilada.

- b) Solución de sulfito de sodio al 5 %, recientemente preparada.
- c) Formalina comercial al 40 % 2,5 ml
Agua destilada hasta 100 ml

Método operatorio

1º) Sacados los cortes del agua destilada, pasar al sulfito de sodio y llevar a estufa a 56°C., durante 10 a 15 minutos.

2º) Llevar al carbonato de plata amoniacal, en pasaje rápido, más o menos tres segundos.

3º) Virar en formol soplando con el fin de remover suavemente los cortes.

4º) Volver al agua destilada, levantar en portas, deshidratar comúnmente y cubrir con bálsamo.

IX METODO DE VON KOSSA, PARA INVESTIGACION INDIRECTA DE FOSFATOS

El método reposa en el hecho de que, fosfatos y carbonatos de plata son más insoluble que las correspondientes sales de calcio.

Una suspensión de fosfato de calcio tratada con una sal de plata, se transforma en fosfato de plata, mientras que el calcio pasa cuantitativamente a la solución.

El objeto de esta reacción en el curso del presente estudio, fue el de establecer, si los compuestos fosforados, pertenecían realmente al grupo de los fosfolípidos o si se encontraban en formas más simples, tales como fosfatos de calcio.

Soluciones necesarias

a) Nitrato de plata al	2 %
b) Hidroquinona	0,5 %
c) Tiosulfato de sodio	5 %
d) Zafranina	1 %

Todas soluciones en agua destilada.

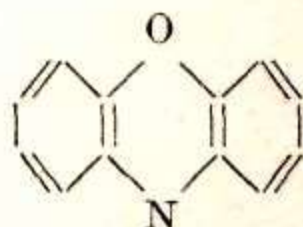
Método operatorio

Cortes en parafina.

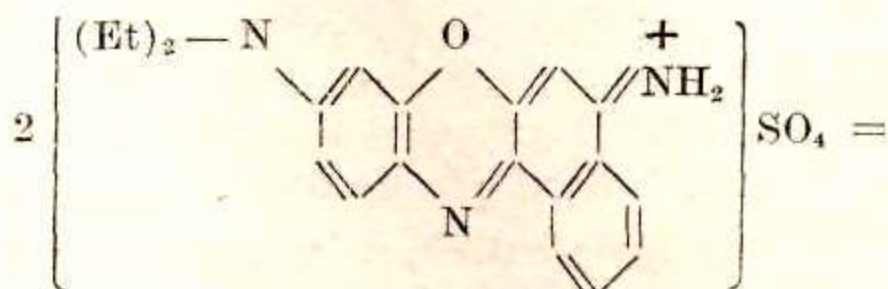
- 1) Desparafinar e hidratar los cortes.
- 2º) Llevar al agua destilada.
- 3º) Dejar en nitrato de plata, a luz vista, de medio a un minuto.
- 4º) Lavar en agua destilada y llevar a hidroquinona dos minutos.
- 5º) Lavar con agua destilada.
- 6º) Pasaje rápido por tiosulfato de sodio, a fin de eliminar exceso de nitrato de plata.
- 7º) Lavar en agua destilada y pasar por Zafranina un minuto, para teñir núcleos.
- 8º) Virado en agua común, deshidratar y cubrir con bálsamo.

X METODO DE LORRAIN-SMITH-CAIN, PARA GRASAS NEUTRAS Y FOSFOLIPIDOS

Este método se basa en el uso de una sal de Azul de Nilo, que corresponde al grupo de los colorantes de la exozina, colorante que contienen un átomo de oxígeno y otros de nitrógeno en su núcleo que es el siguiente:



El sulfato de Azul de Nilo, comercial, es una mezcla de la oxazona, de color rojo, y del sulfato de oxazina de color azul, que es el Azul de Nilo propiamente dicho. El ácido sulfúrico de la solución acuosa del Azul de Nilo, provoca la hidrólisis de la sal, suministrando la base libre oxazina de color rojo, de modo que para la interpretación de los resultados de la tinción, tendremos en cuenta los tres grupos colorantes. La fórmula del sulfato de Azul de Nilo es la siguiente:



La oxazona contiene un oxígeno quinónico en reemplazo del grupo imino.

De acuerdo con Caín (1947), los resultados que se pueden obtener con este método son los que siguen:

1º) Sustancias al estado sólido, no se colorean con el sulfato de Azul de Nilo.

2º) Los triglicéridos o mezclas de ellos, libres o disueltos en hidrocarburos, se colorean en rojo por la oxazona, y mucho menos por la base libre, oxazina.

3º) Los ácidos grasos libres, o disueltos en hidrocarburos se colorean en azul por la oxazina, formando sales, y en azul con las soluciones diluídas del sulfato de Azul de Nilo.

4º) La lecitina, tal vez todos los fosfátidos, se tiñe de azul intenso, cuando está sólida, con la oxazina, o con soluciones acuosas diluídas o concentradas de Azul de Nilo.

Soluciones necesarias

- a) Solución de sulfato de Azul de Nilo al 1 %
- b) Acido acético al 1 %

Método operatorio .

Los cortes de tejidos hechos por congelación, luego de lavados en agua destilada llevan a:

- 1º) Solución de Azul de Nilo cinco minutos a 37°C.
- 2º) Lavar en agua destilada a 37°C, treinta segundos.
- 3º) Diferenciar en ácido acético a 37°C, treinta segundos.
- 4º) Montar en glicerina y bordear con parafina.

Observaciones:

En esta técnica, introdujimos la variante de los 37°C, en vez de los 60°C, que figuran en la técnica correspondiente, en el libro de Everse Pearse, por haber constatado que a 37º era mucho más notable la coloración azul intensa en la capa córnea. A temperatura ambiente no dio coloración positiva, el mencionado estrato córneo.

RESULTADOS

Los métodos de Sudán, o sea el Sudán III, IV o el negro Sudán, son comunes a las grasas neutras, ácidos grasos o lípidos, como ya se dijo en la parte referente a material y métodos. Dichas coloraciones son positivas a nivel de la sustancia córnea. También resultan positivas, en el tejido adiposo hipodérmico y en las células macrofágicas cargadas de lipoides, existentes a nivel de la dermis. Ver fotomicrografía Nº 1 y Nº 2.

El método de Smith-Baker, que con las restricciones ya aclaradas en el capítulo de material y método es altamente específico para fosfolípidos, produce resultados francamente positivos a nivel de la sustancia córnea Ver fotomicrografía Nos. 3 y 4.

Es posible extraer los fosfolípidos, con alcohol y éter de acuerdo al procedimiento analizado en el capítulo mencionado de material y método; también con piridina podemos efectuar esta extracción.

Realizados ambos procedimientos y posteriormente la coloración de Smith-Baker, la misma es ampliamente negativa, lo que nos indica que los cuerpos responsables del primer resultado positivo, habían sido eliminados. Ver fotomicrografía Nos. 5 y 6.

La técnica de Chevrèmont y Frederic, es positiva con los grupos sulfhidrilos activos, y a nivel de la sustancia córnea, resulta fácil demostrar su presencia. Sin embargo haremos notar que objetivamente, sin que se pueda, por los medios a nuestro alcance, valorarse resultados cuantitativos, es evidentemente mucho menor la extensión y cantidad de las sustancias que a nivel de la capa córnea producen reacción de grupos SH-, en relación con los producidos por los fosfolípidos. Ver fotomicrografía N° 7.

El bloqueo con cloruro mercúrico, impide la reacción de los grupos sulfhidrilos, por las razones establecidas en un capítulo anterior y la técnica de Chevrèmont y Frederic después de este bloqueo, nos ha dado resultados claramente negativos. Ver fotomicrografía N° 8.

Repitiendo la técnica de Smith-Baker, después del bloqueo mercúrico, no se altera su positividad. Ver fotomicrografía N° 9.

Las impregnaciones de plata, según la técnica de Del Río Hortega, se ha demostrado, sin que todavía se haya aclarado el fundamento químico, que son altamente positivas con cuerpos denominados argentófilos como los derivados del fenilo, ya puntualizado, por ejemplo. Realizada esta técnica los resultados son negativos a nivel de la capa córnea. Ver fotomicrografía N° 10.

El método de Von Kossa, nos permite caracterizar sales de calcio como fosfatos y en la sustancia córnea, los resultados son negativos. Ver fotomicrografía N° 11.

El método de Lorrain-Smith-Cain, resulta ser una técnica delicada, probablemente debido a la complejidad de factores físicos y químicos que concurren en la reacción, como ser temperatura, grado de hidrólisis del colorante, etc., para la formación de oxazina, oxazona, etc. que colorearán con distinto color e intensidad los diversos tipos de lípidos. Ver fotomicrografía N° 12.

Los resultados los resumimos en el cuadro N° 1.

RESULTADOS		
METODOS	OBJETO	RESULTADOS
SUDAN III SUDAN IV SUDAN BLACK	COLORACION GENERAL DE LIPIDOS	FRANCAMENTE POSITIVA EN LA SUSTANCIA CORNEA
SMITH-BAKER	COLORACION DE FOSFOLIPIDOS	FRANCAMENTE POSITIVA EN LA SUSTANCIA CORNEA
EXTRAC CON ALCOHOL-ETER Y COLORACION DE SMITH-BAKER	ELIMINACION DE FOSFOLIPIDOS Y COLORACION CONTROL	COLORACION NEGATIVA EN LA SUSTANCIA CORNEA
EXTRAC CON PIRIDINA Y COLORACION DE SMITH-BAKER	ELIMINACION DE FOSFOLIPIDOS Y COLORACION CONTROL	FRANCAMENTE NEGATIVA A NIVEL DE LA SUSTANCIA CORNEA
TECNICA DE CHEVREMONT Y FREDERIC	COLORACION DE GRUPOS SH-	POSITIVA DE MEDIANA INTENSIDAD A NIVEL DE LA SUSTANCIA CORNEA
BLOQUEO CON Cl_2 Y TECNICA DE CHEVREMONT Y FREDERIC	BLOQUEO GRUPOS SH-	NEGATIVA A NIVEL DE LA SUSTANCIA CORNEA
BLOQUEO CON Cl_2 Y COLORACION DE SMITH-BAKER	CONTROL DE LA REACCION DE FOSFOLIPIDOS	NETAMENTE POSITIVA A NIVEL DE LA SUSTANCIA CORNEA
IMPREGNACION CON METODOS DE PLATA	DIFERENCIAR FOSFATIDOS Y GRUPOS FENILOS	NEGATIVO A NIVEL DE LA SUSTANCIA CORNEA
METODO DE VON KOSZA	INVESTIGAR FOSFATOS SIMPLES	NEGATIVO EN SUSTANCIA CORNEA
METODO DE LORRAIN-SMITH-CAIN	DIFERENCIACION RELATIVA ENTRE FOSFOLIPIDOS Y GRASAS NEUTRAS	POSITIVOS Y PARCIALMENTE POSITIVOS EN SUSTANCIA CORNEA A 37°C.

CUADRO N° 1

CONSIDERACIONES

Los resultados enumerados, nos permiten establecer lo siguiente:

1º) A nivel de la sustancia córnea, existen grupos sulfhidrilos y lípidos.

2º) Por el análisis realizado, podemos asegurar la existencia de fosfolípidos, demostrada por reacciones específicas, tales como la técnica de Smith-Baker, controlada con las extracciones con alcohol-éter y piridina. Si bien las sustancias grasas también pueden extraerse con estos solventes; las mismas no reaccionan con el método de Smith-Baker.

3º) Los grupos sulfhidrilos, en nuestro estudio, existen en menor proporción que los fosfolípidos de la sustancia córnea. No dan reacciones inespecíficas con la coloración para fosfátidos como se pudo comprobar con los bloqueos previos con cloruro mercurio y las tinciones de control con los métodos de Chevrèmont y Frederic por una parte y el método de Smith-Baker por otra.

4º) No existen sales de fósforo simples, tales como fosfatos, ya que el método de Von Kossa, es en grado sumo, específico para dichas sales y resulta negativo a nivel de la sustancia córnea.

De ello deducimos que los compuestos de fósforo, existentes a nivel de la capa córnea, se encuentran en combinaciones complejas, del tipo de los fosfolípidos.

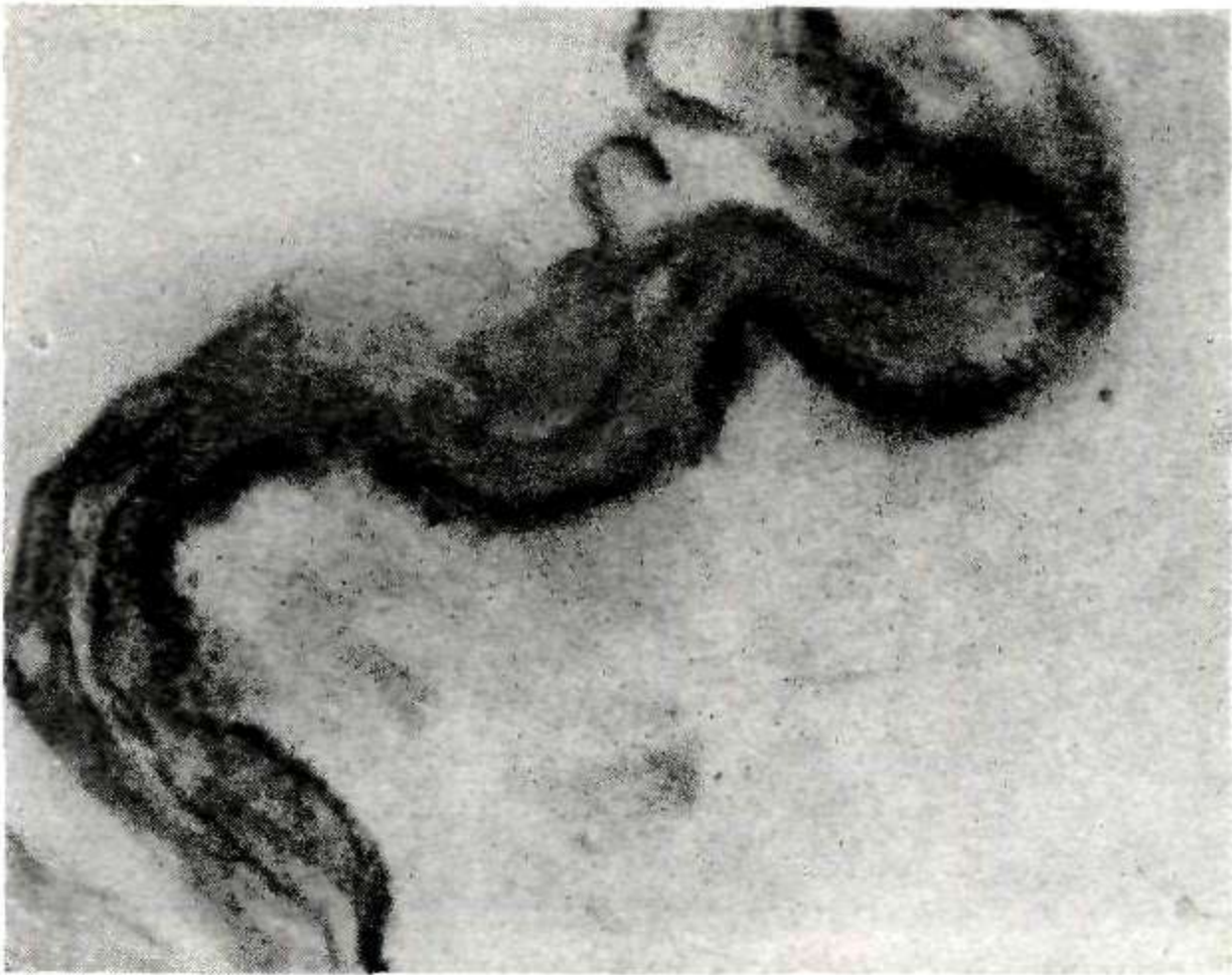
Además como ya se explicó en el capítulo de material y métodos, en lo referente a la fijación se ha establecido, para los grupos sulfhidrilos, que sólo los unidos a las proteínas, permanecen en los tejidos, mientras que los no unidos a estos cuerpos pasan a la solución.

Es probable que los fosfolípidos también se encuentren unidos a las proteínas, por su elevada resistencia a pasar al fijador. Esto será motivo de posteriores estudios.

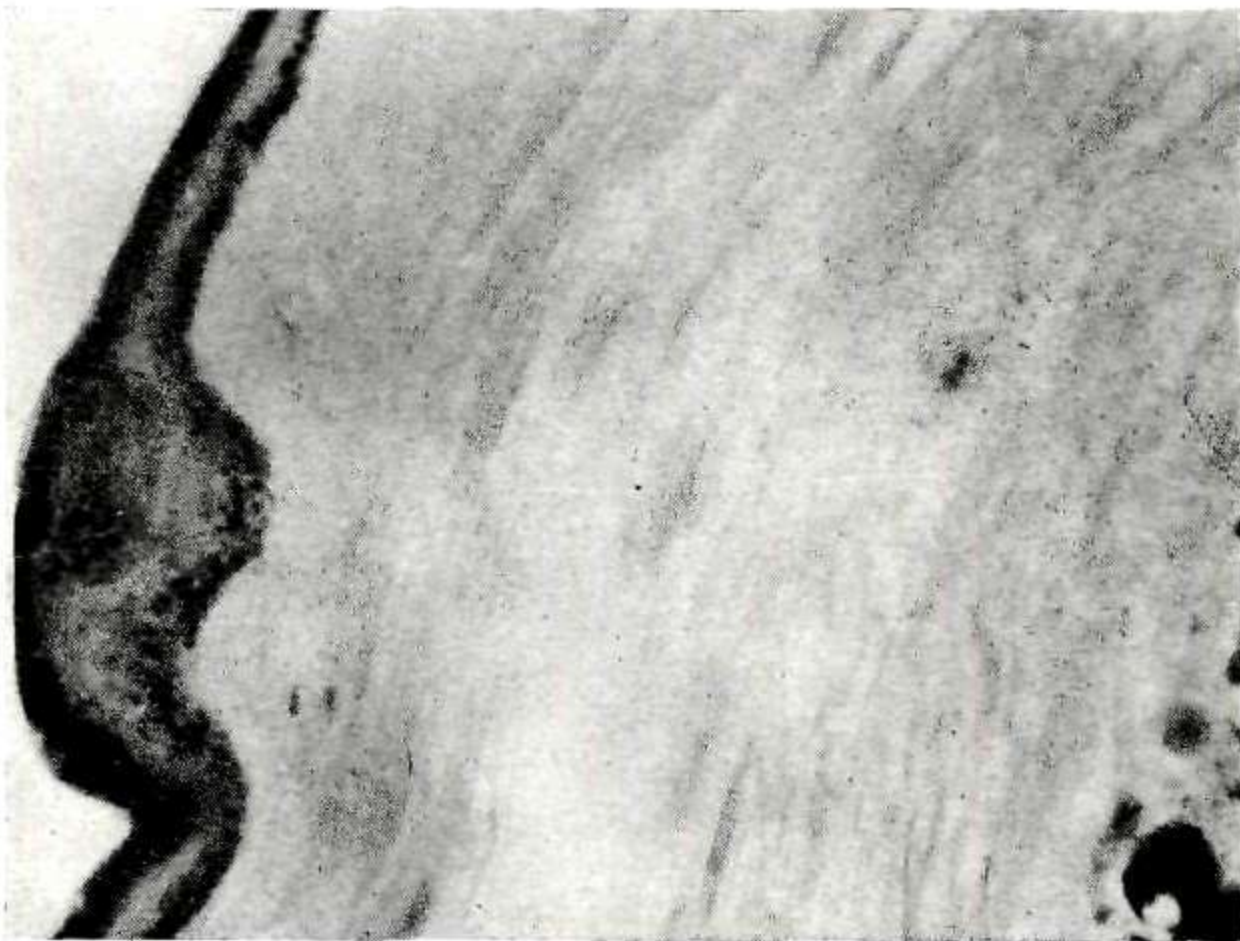
5º) A pesar de que algunos autores sostienen que las coloraciones argentófilas podrían ser producidas por lípidos, en nuestro estudio, las impregnaciones han resultado siempre negativas en la sustancia córnea. Esto nos permite indirectamente también, concluir, que en la capa córnea, no existen grupos cromáticos del tipo del fenilo, que son responsables de las reacciones de argentofilia.

CONCLUSIONES

- I A nivel de la sustancia córnea existen grupos SH- y fosfolípidos.
- II Por la intensidad de las reacciones, parecen ser más abundantes los fosfolípidos que los grupos SH-.
- III Los compuestos de fósforos no se encuentran en forma de sales simples y por su resistencia a solubilizarse en el fijador, es probable que se encuentren unidos a grupos proteicos.



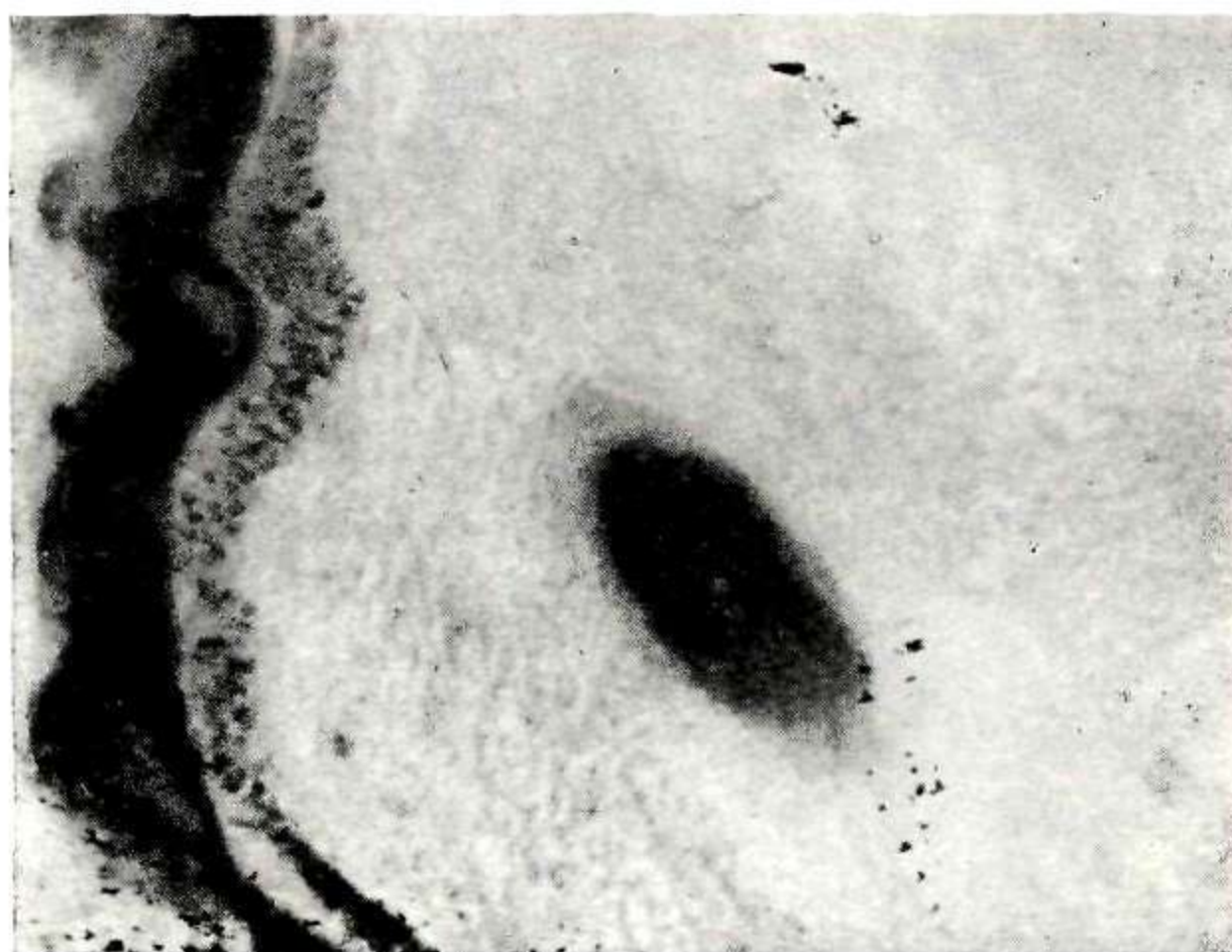
Fotomicrografía Nº 1 - Sudán III. Se observa resultado moderadamente positivo en la capa córnea.



Fotomicrografía Nº 2 - Sudán Black. Positivo en la sustancia córnea y en la capa adiposa subcutánea.



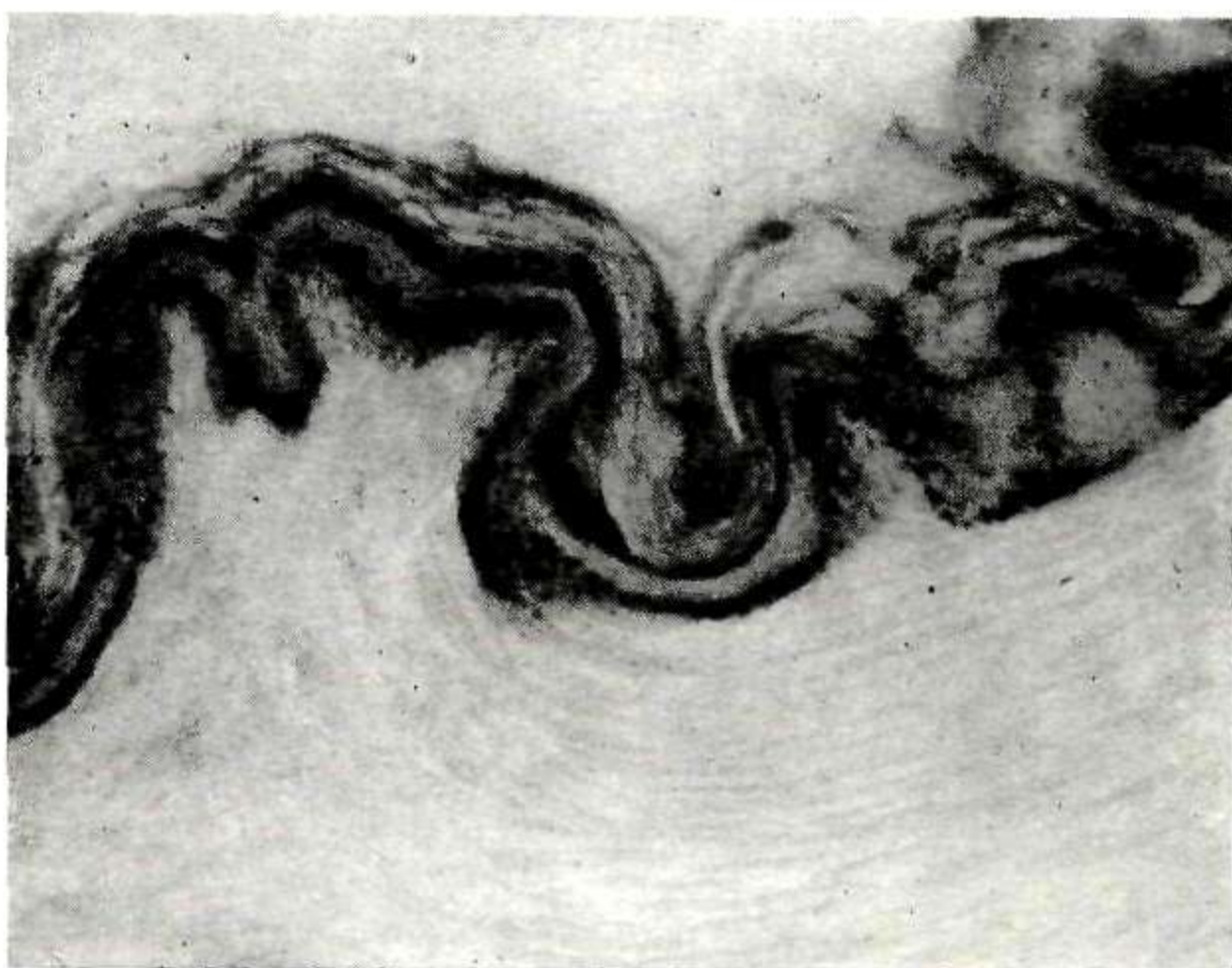
Fotomicrografía Nº 3.- Método de Smith-Baker, intensamente positivo en toda la sustancia córnea y en parte de la granulosa.



Fotomicrografía Nº 4.- Método de Smit-Baker, intensamente positivo a nivel de la sustancia córnea y folículo piloso.



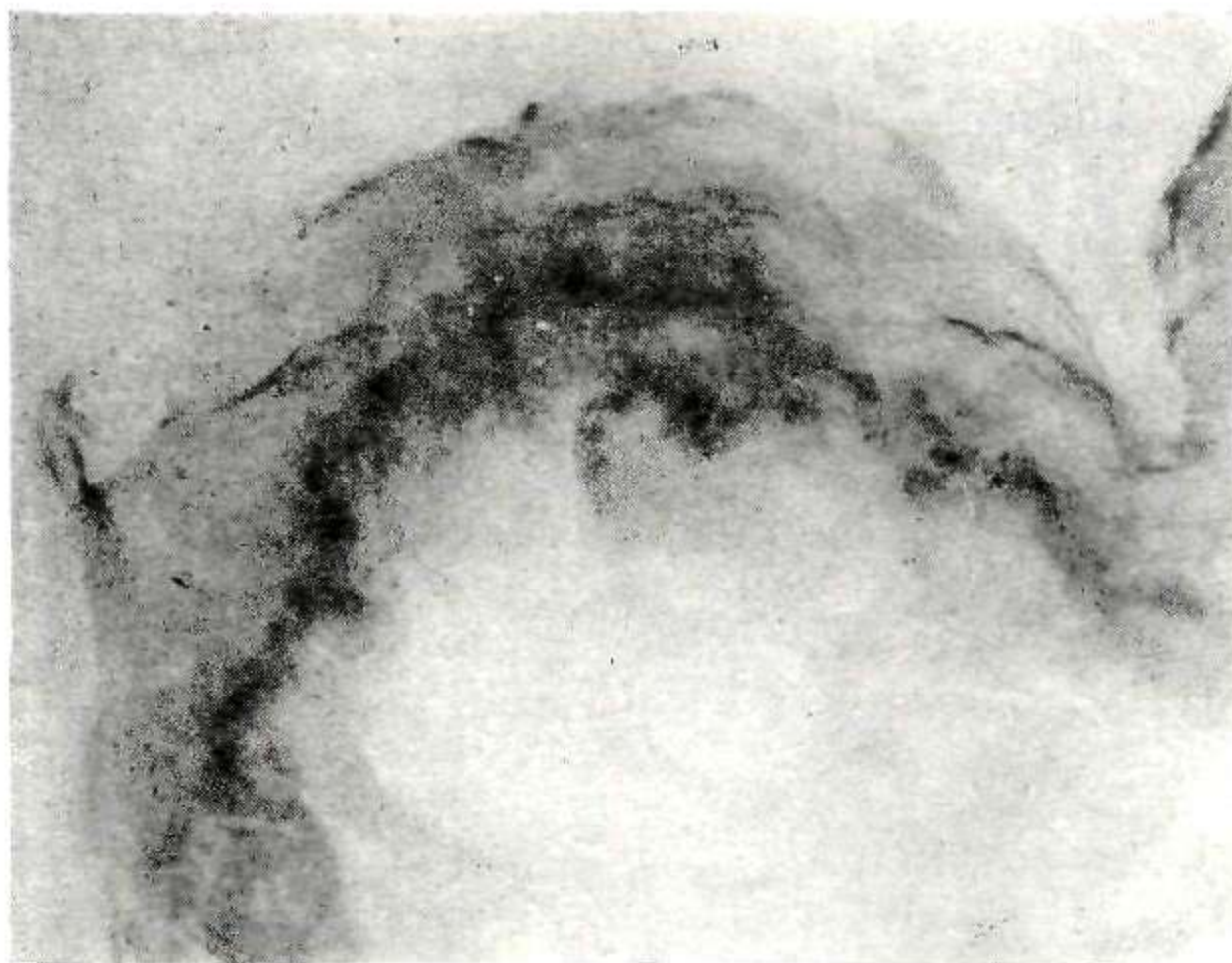
Fotomicrografía Nº 5.- Después de la extracción con alcohol-éter, desaparece la positividad para el método de Smit-Baker.



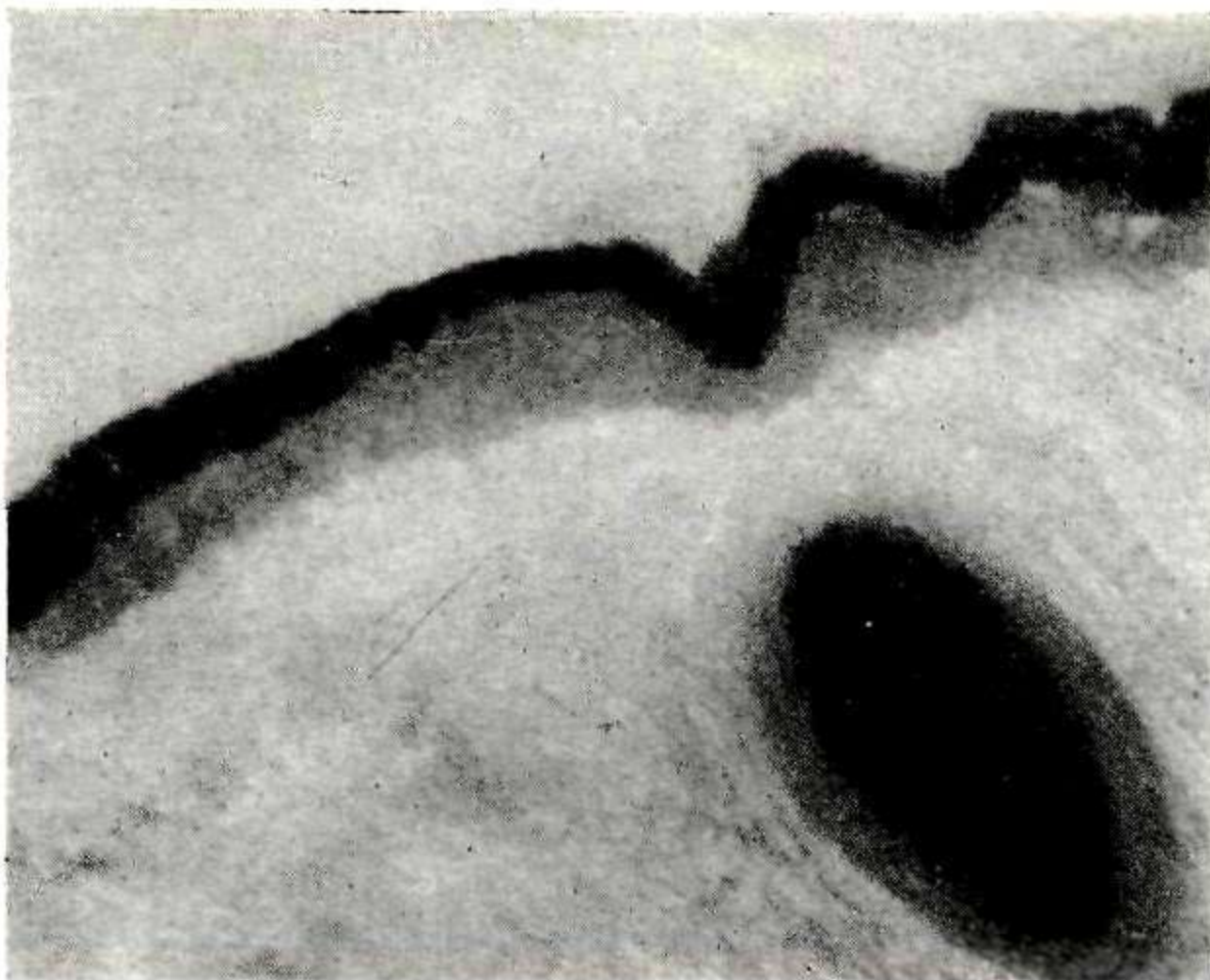
Fotomicrografía Nº 6.- Después de la extracción con piridina, desaparece la positividad del método de Smith-Baker.



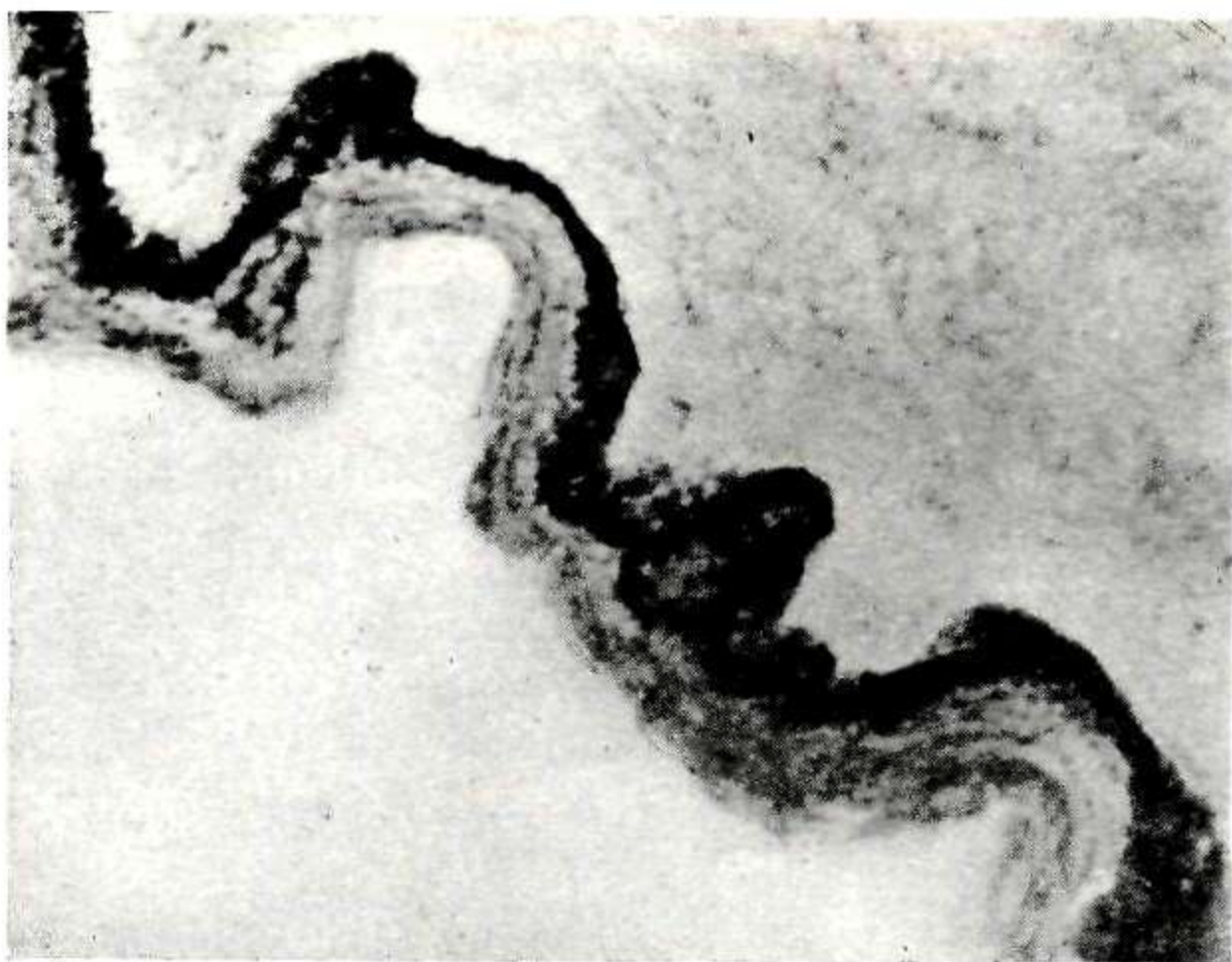
Fotomicrografía Nº 7.- Método de Chevrement y Frederic para grupos SH-, positivo de mediana intensidad, en la capa córnea.



Fotomicrografía Nº 8.- Bloqueo con cloruro mercúrico. Desaparece la reacción de grupos SH- con el método de Chevrement y Frederic.



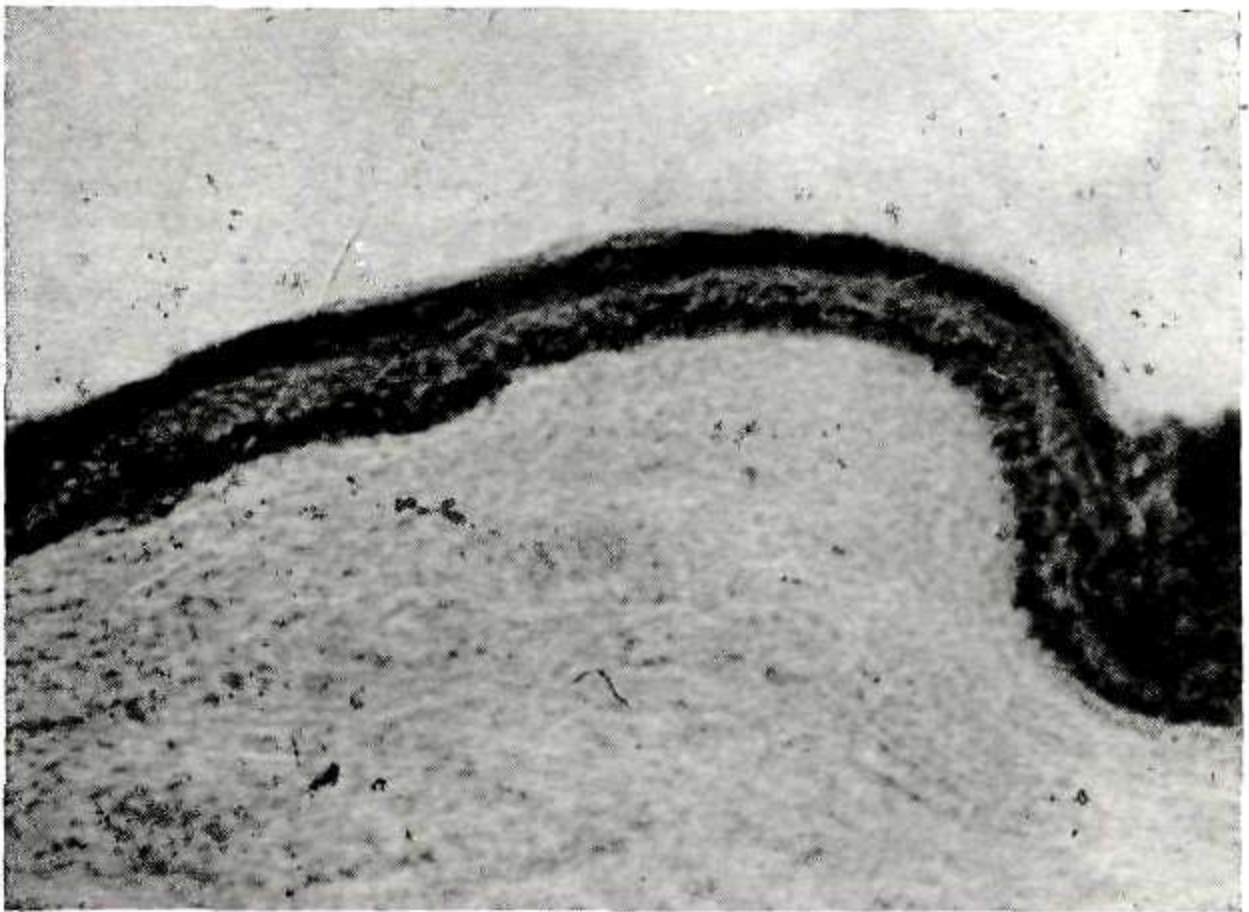
Fotomicrografía N^o 9 - Previo bloqueo con cloruro mercurico, la técnica de Smith-Baker para fosfolípidos es igualmente positivo.



Fotomicrografía N^o 10.- Impregnación argéntica, método de Del Río Ortega, intensamente positiva con la melanina. Negativa en la capa córnea.



Fotomicrografía Nº 11.- Método de Von Kossa, negativo en la sustancia córnea.



Fotomicrografía Nº 12.- Método del sulfato de Azul de Nilo, de Lorrain-Smith-Cain, positivo en la sustancia córnea.

BIBLIOGRAFIA

- GOMORI, G., *Microscopic Histochemistry*. The University of Chicago Press, 1954.
- LISSON, L., *Histochimie et Cytochimie Animales*. Gauthiers-Villars, París, 1953.
- EVERSON PEARSE, A. G., *Histoquímica Teórica y Aplicada*. Ed. Aguilar, Madrid, 1960.
- LILIE, R. D., *Curso de Histoquímica para post-graduados*, Buenos Aires, 1956.