

REAVLIAÇÃO DA COLORAÇÃO SEQÜENCIAL AZUL DE ALCIAN-SAFRANINA O NO ESTUDO DOS MASTÓCITOS DO RATO

VALMOR OLAVO MENDONÇA*

RESUMO

A coloração seqüencial azul de alcian-safranina O tem sido amplamente usada como um indicador seguro do grau de sulfatação de glicosaminoglicanas. Em mastócitos, com base nesta coloração, foram descritos quatro estádios de maturação dos grânulos. Numa etapa inicial, os grânulos, azul de alcian-positivos, conteriam um precursor não sulfatado da heparina. Com o amadurecimento, os grânulos passariam a conter heparina altamente sulfatada, tornando-se safranina-positivos. Estudamos a influência de fatores, como a fixação e o tempo de coloração pelo azul de alcian, na coloração final dos grânulos dos mastócitos pela seqüência azul de alcian-safranina O. Utilizamos fragmentos de língua e de mesentério de ratos adultos, preservados por diferentes processos de fixação, corados com azul de alcian em diferentes tempos e seguido de safranina O por cinco minutos. Os resultados evidenciaram que a coloração final dos grânulos dos mastócitos foi fortemente influenciada tanto pelo tipo de fixação como pelo tempo de coloração pelo azul de alcian.

PALAVRAS-CHAVE: Mastócitos, Glicosaminoglicanas, Grânulo, Maturação, Heparina, Rato.

ABSTRACT

The alcian blue-safranin O staining has been largely used as a secure indicator of the glycosaminoglycans sulfatation grade. In mast cells, based on this staining, four stages of granules maturation were described. In an initial phase, the granules alcian blue-positives would contain a non sulfated precursor of the heparin. With the development, the granules would start containing heparin higly sulfated, becoming safranin-positives. We studied the influence of factors, as the fixing and the time of coloration by the alcian blue, in the final coloration of mast cells granules by the combined alcian blue-safranin O technic. We used

* Departamento de Ciências Morfo-Biológicas, Fundação Universidade do Rio Grande.

rat's tongue and mesenteric fragments, preserved by different processes of fixing, stained with alcian blue in different times and followed by safranin O for five minutes. The results evidenced that the final coloration of mast cells granules was strongly influenced even by the type of fixing and also by the time of coloration by the alcian blue.

KEY-WORDS: Mast cells, Glycosaminoglycans, Granule, Maturation, Heparin, Rat.

INTRODUÇÃO

A técnica de coloração seqüencial azul de alcian-safranina O, descrita por SPICER (1960), como adequada para diferenciar glicosaminoglicanas altamente sulfatadas daquelas fracamente sulfatadas, tem sido utilizada para avaliar o grau de maturação dos mastócitos. COMBS et al. (1965), baseados nesta coloração combinada, descreveram quatro estádios no desenvolvimento dos mastócitos em embriões de rato: no estádio I os grânulos coram-se pelo azul de alcian; no estádio II apresentam grânulos corados de vermelho; no estádio III a maioria dos grânulos está corada de vermelho e, no estádio IV, todos os grânulos mostram-se corados de vermelhos. Estes achados foram corroborados por PRETLOW & CASSADY (1970), em mastócitos da cavidade peritoneal de ratos adultos e por YONG (1980) em tecidos de ratos recém-nascidos e de adultos. TAS (1977) publicou que a coloração dos grânulos dos mastócitos peritoneais e do mesentério de rato, pela técnica seqüencial azul de alcian-safranina O, depende do tipo de fixação empregada. Nos mastócitos peritoneais de rato a maior afinidade dos grânulos pela coloração azul ou vermelha, segundo KORETOU (1988), está relacionada com a quantidade de protease I dos mastócitos de rato (RMCP I – rat mast cell protease I). Diante destes dados, propusemo-nos, no presente trabalho, reavaliar o uso da coloração seqüencial azul de alcian-safranina O no estudo dos mastócitos de rato, utilizando diferentes métodos de preservação e variando o tempo de coloração pelo azul de alcian.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos adultos, da linhagem Wistar, de ambos os sexos que, após anestesia com éter, eram decapitados e retirados o mesentério e a língua. Peças da língua, com aproximadamente 4mm de espessura, foram fixadas em a) Bouin, b) álcool a 80%-formalina-ácido acético (85:10:5 v/v)-alfac (LILLIE, 1965), c) subacetato de chumbo a 4% em etanol 50% e ácido acético 1% (MOTA & VUGMAN, 1956), d) formalina a 10%, todos durante 24 horas, e e) Carnoy (LILLIE) durante 6 horas; processadas pela técnica de inclusão em parafina e feito cortes histológicos de 7 μ m de espessura. O mesentério era dividido em vários fragmentos e fixados pelos mesmos processos durante 30 minutos. Os cortes de língua e os fragmentos de mesentério foram corados pelo azul de alcian 8 GX (Imp. Chemical Ind.) a 1% em ácido acético 3% (pH 2,4), durante 8, 15, 30 e 120 minutos, seguido de safranina O (G. Gruble Co.) a 0,3% em HCl 0,125 N (pH 0,9) por 5 minutos (TAS, 1977). As avaliações, ao microscópio óptico, eram realizadas por 3 observadores independentemente.

TABELA 1 — Mastócitos da língua de rato corados por azul de alcian, em vários tempos, seguidos de safranina O por 5 minutos.

Solução Fixadora	Azul de alcian			
	8 min	15 min	30 min	120 min
	+ Safranina (5 min)			
Bouin	3 A (-) 1 A (---) 1 V (+)	4 A (-) 1 A (---)	4 A (-) 1 A (---)	4 A (-) 1 A (---)
Alfac	3 V (+) 1 V (++) 1 A (-)	2 V (+) 2 V (++) 1 A (-)	2 V (+) 2 V (++) 1 A (-)	2 V (++) 1 V (+) 2 A (--)
Subacetato de chumbo a 4% em etanol 50% e ácido acético 1%	2 V (++) 2 V (+++) 1 A (---)	3 V (+++) 2 A (--)	3 V (+++) 2 A (--)	3 V (+++) 2 A (--)
Formalina a 10%	1 V (+) 2 V (++) 2 V (+++)	1 V (++) 3 V (+++) 1 A (---)	1 V (++) 2 V (+++) 2 A (--)	3 AV 2 A (---)
Carnoy	3 V (+++) 2 AV	2 V (+++) 3 AV	1 V (+++) 3 AV 1 A (---)	5 AV

V = mastócitos vermelhos;

A = mastócitos azuis;

AV = mastócitos com equilíbrio das duas colorações;

1 = raros; 2 = vários; 3 = muitos; 4 = maioria; 5 = todos;

(+++)= muitos grânulos azuis;

(---) = idem vermelhos;

(++) = vários grânulos azuis;

(--)= idem vermelhos;

(+) = escassos grânulos azuis;

(-) = idem vermelhos.

RESULTADOS

A coloração final dos mastócitos pela seqüência azul de alcian-safranina O foi fortemente influenciada pelo fixador e pelo tempo de coloração com o azul de alcian. Nos mastócitos da língua excetuando-se os fixados em Bouin quando sempre predominou a coloração azul, inicialmente havia um predomínio da coloração vermelha. Com o aumento do tempo de azul de alcian, aumentava a quantidade de grânulos corados em azul, os quais predominavam com 120 minutos

TABELA 2 – Mastócitos do mesentério de ratos corados por azul de alcian, em vários tempos, seguidos de safranina O por 5 minutos.

Solução Fixadora	Azul de alcian			
	8 min	15 min	30 min	120 min
	+ Safranina (5 min)			
Bouin	3 A 1 V (++) 1 V (+++)	3 A 1 V (++) 1 V (+++)	3 A 1 V (++) 1 V (+++)	3 A 1 V (++) 1 V (+++)
Alfac	1 V (+) 1 V (++) 3 V (+++)	1 V (+) 4 V (+++)	1 V (++) 4 V (+++)	1 V (++) 4 AV
Subacetato de chumbo a 1% em etanol 50% e ácido acético 1%	1 V (+) 1 V (++) 1 V (+++) 2 AV	1 V (++) 1 V (+++) 3 AV	1 V (++) 1 V (+++) 3 AV	5 AV
Formalina a 10%	4 V 1 V (++)	2 V (++) 1 V (+++) 2 AV	1 V (++) 1 V (+++) 3 AV	1 V (+) 4 AV
Carnoy	5 V	5 V	5 V	5 V

V = mastócitos vermelhos;

A = mastócitos azuis;

AV = mastócitos com equilíbrio das duas colorações;

1 = raros; 2 = vários; 3 = muitos; 4 = maioria; 5 = todos;

(+++)= muitos grânulos azuis;

(---) = idem vermelhos;

(++) = vários grânulos azuis;

(--)= idem vermelhos;

(+) = escassos grânulos azuis;

(-) = idem vermelhos.

(Tabela I). Da participação variável dos dois corantes observou-se mastócitos corados em várias tonalidades como: vermelho-escuros, castanhos, castanho-escuros, azul-escuros, roxos, pretos e, ainda, com regiões distintamente coradas em vermelho e azul. No mesentério, com exceção dos mastócitos fixados em Carnoy que se coraram de vermelho, após os outros fixadores ocorreu um predomínio de grânulos vermelhos nos tempos menores com azul de alcian e um equilíbrio nos tempos maiores com este corante, com pequenas diferenças entre os métodos de

preservação, caracterizando um aumento da coloração azul com o aumento do tempo de azul de alcian (Tabela II). Como ocorrera com os mastócitos da língua, observou-se células coradas em diferentes tonalidades, além de variações nos resultados de fragmento para fragmento e, nos fixados em formalina a 10%, mastócitos com grânulos vermelhos predominavam na região central dos fragmentos.

DISCUSSÃO

Estudando as propriedades histoquímicas das glicosaminoglicanas em tecidos de rato, camundongo, cobaia e coelhos, fixados em formalina a 10%, SPICER (1960) apresentou evidências de que a coloração seqüencial azul de alcian-safranina O era capaz de diferenciar glicosaminoglicanas altamente sulfatadas das fracamente sulfatadas. Estas corando-se de azul, aquelas de vermelho. Este achado foi confirmado por JASMIN & BOIS (1962) em mastócitos tumorais de rato, por WORTHINGTON & BAILEY (1962) em distendidos de tecido conjuntivo, e por BURTON (1964) em mastócitos de tecidos embrionários e adultos de rato, registrando a presença de grânulos com afinidade por um ou por outro corante. Deve ser enfatizado que estes autores usaram como fixador a formalina, ou misturas fixadoras que a continham. Sempre que a formalina fazia parte da fixação, também verificamos grânulos com afinidade por um ou por outro corante. Após Carnoy, que não contém formalina, houve predominância de grânulos vermelhos.

COMBS et al. (1965), utilizando a coloração seqüencial azul de alcian-safranina O em tecidos embrionários de rato, descreveram quatro estádios de maturação para os mastócitos: numa etapa inicial, ou estágio I, os grânulos, azul de alcian positivos, conteriam um precursor da heparina não sulfatado; no estágio II apresentavam um número variável de grânulos — de uns poucos até mais ou menos a metade dos de uma célula — corados em vermelho que indicam a presença de glicosaminoglicanas sulfatadas; no estágio III a maioria dos grânulos corada de vermelho e, finalmente, o estágio IV quando todos os grânulos se apresentavam vermelhos. Estes autores enfatizaram, no entanto, que estes quatro estádios somente foram observados nos tecidos embrionários, nos adultos registraram apenas células no estágio IV. Entretanto, com base na mesma técnica de coloração, PRETLOW & CASSADY (1970) observaram, em mastócitos da cavidade peritoneal de ratos adultos, células nos estádios descritos por COMBS et al. Resultados semelhantes foram publicados por YONG et al. (1975; 1977; 1979) e por YONG (1980), em mastócitos de tecidos de ratos recém-nascidos e de adultos. Sabe-se que os mastócitos do rato adulto são células de longa duração e que seus grânulos renovam-se lentamente, se o fazem (PADAWER, 1974). Portanto seria difícil a observação destas células nos diferentes estádios de maturação nos tecidos adultos. Conseqüentemente os registros da presença, em tecidos de animais adultos, de mastócitos corados de azul pela técnica seqüencial azul de alcian-safranina O, lançam dúvida sobre a aplicação da técnica no estudo do grau de maturação dos mastócitos. Esta dúvida foi ratificada por TAS (1970) em mastócitos peritoneais e do mesentério de rato adulto, ao publicar que a coloração final dos grânulos

depende do tipo de fixação e, também, do nível de coloração destes grânulos com o azul de alcian, concluindo que esta técnica de coloração seqüencial não fornece informações sobre o grau de sulfatação das glicosaminoglicanas e, por conseguinte, sobre o grau de maturação dos mastócitos. Mais recentemente, CROW et al. (1988), usando esta técnica combinada no estudo de mastócitos de útero humano, relataram que a coloração final destas células variou acentuadamente com o tipo de fixação. Cabe destacar que SPICER (1963) já havia verificado a existência de diferenças nas propriedades de coloração destas células nos tecidos de um mesmo animal, bem como a influência do fixador. Nossos resultados também evidenciaram a forte influência do método de preservação, assim como o tempo de coloração com o azul de alcian, na coloração final dos mastócitos da língua e do mesentério de rato pela seqüência azul de alcian-safranina O. Estes dados provavelmente constituam a explicação para os vários tipos de mastócitos descritos, em tecidos adultos, por BURTON, PRETLOW & CASSADY, YONG et al. (1975; 1977; 1979) e YONG (1980).

Diante destes dados e admitindo-se que os mastócitos do mesentério e da língua de rato adulto têm, presumivelmente, o mesmo grau de maturação, concluímos que a coloração seqüencial azul de alcian-safranina O parece não constituir um método preciso para distinguir o grau de sulfatação da heparina e, por conseguinte, a avaliação, de maneira generalizada, do grau de maturação dos mastócitos de rato.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao professor Dr. Ithamar Vugman, orientador dos cursos de Mestrado e Doutorado; a João Cassemiro Mendonça Soares e Maria Inês Almeida Santos, laboratoristas do Departamento de Ciências Morfo-Biológicas, Fundação Universidade do Rio Grande, RS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURTON, A. L. Histochemical studies on developing mast cells. *Anat. Rec.*, 150:265-69, 1964.
- COMBS, J. W.; LAGUNOFF, D.; BENDITT, E. P. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J. Cell Biol.*, 25:577-92, 1965.
- CROW, J.; MORE, L.; HOWE, S. The mast cells of the human uterus. *APMIS*, 96:921-26, 1988.
- JASMIN, C. & BOIS, P. Coloration différentielle des mastocytes chez le rat. *Rev. Canad. Biol.*, 20:773-74, 1961.
- KORETOU, O. Relationship between the same property of mast cell granule with alcian blue-safranin O and toluidine blue O, and the content of mast cell protease in the granule of rat peritoneal mast cell. *Acta Histochem. Cytochem.*, 21:25-32, 1988.
- LILLIE, R. D. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. New York, McGraw-Hill Co., 1965.

- MOTA, I. & VUGMAN, I. Effect of anaphylatic shock and compound 48/80 on mast cells of the guinea pig lung. *Nature*, 177:427-29, 1956.
- PADAWER, J. Mast cell; extended lifespan and lack of granule turnover under normal "in vivo" conditions. *Exp. Mol. Path.*, 30:269-80, 1974.
- PRETLOW, T. G. & CASSADY, I. M. Separation of mast cells in successive stages of differentiation using programmed gradient sedimentation. *Am. J. Path.*, 61:323-37, 1970.
- SPICER, S. S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem. Cytochem.*, 8:18-33, 1960.
- SPICER, S. S. Histochemical properties of mucopolysaccharide and basic protein in mast cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 103:322-33, 1963.
- TAS, J. The alcian blue and combined alcian blue-safranin O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem. J.*, 9:205-30, 1977.
- WORTHINGTON, W. C. & BAILEY, N. C. Dual staining of mast cell cytoplasmic constituents by alcian blue and safranin. *J. Histochem. Cytochem.*, 10:503, 1962.
- YONG, L. C. A combined histochemical and autoradiographic study of the distribution and maturation of peritoneal mast cells in the rat. *Experientia*, 36:451-52, 1980.
- YONG, L. C.; WATKINS, S. C.; BOLAND, J. E. The mast cell; III. distribution and maturation in various organs of the young rat. *Pathology*, 11:427-45, 1979.
- YONG, L. C.; WATKINS, S. C.; WILHELM, D. L. The mast cell; distribution and maturation in the peritoneal cavity of the adult rat. *Pathology*, 7:307-18, 1975.
- YONG, L. C.; WATKINS, S. C.; WILHELM, D. L. The mast cell; II. distribution and maturation in the peritoneal cavity of the young rat. *Pathology*, 9:221-232, 1977.