

ESTUDO HISTOQUÍMICO DA FIXAÇÃO DO GLICOGÊNIO
HEPÁTICO NO COELHO⁽¹⁾
HISTOCHEMICAL STUDY OF THE GLYCOGEN FIXATION IN RABBIT LIVER

LEONEL COSTACURTA⁽²⁾

S U M M A R Y

The author analyses the action of the picric acid, the Potassium bichromate, the acetic acid, the mercuric chlorid in aqueous solutions and the alcohol 95° in glycogen fixation of the rabbit liver, which has received intravenous injections of glucosic solutions. Sixty three different fixative solutions and the McManus method were used. It was possible to observe that the Potassium bichromate, as the picric acid, is an important ingredient in the fixative solutions of the glycogen liver.

I N T R O D U Ç Ã O

A preservação correta do glicogênio no interior das células de diferentes tipos de tecidos orgânicos ainda continua sendo motivo de novos e seguidos estudos. Em alguns tecidos (cartilagem hialina, epitélios estratificados escamosos) a fixação do glicogênio é relativamente fácil; entretanto, em outros (tecido muscular cardíaco, rim, placenta), isto é realmente difícil. No fígado, a preservação do glicogênio é moderadamente difícil e os resultados obtidos com as soluções fixadoras, recomendadas em histoquímica, não são concordantes nem convincentes. Esta é a razão porque propuzemos estudar a ação de diversas substâncias químicas sobre o glicogênio hepático, quer empregadas isoladamente, quer formando soluções compostas de dois, três ou quatro elementos.

As substâncias químicas utilizadas nesta pesquisa foram o ácido pícrico, o formol, o álcool, o ácido acético, o bricromato de potássio e o sublimado corrosivo, tendo-se em vista que as quatro primeiras são geralmente integrantes de soluções fixadoras comumente usadas em histoquímica, na preser-

vação do glicogênio dos tecidos orgânicos em geral. Com isto, esperamos trazer mais uma contribuição para o estudo da fixação do glicogênio das células hepáticas.

M A T E R I A L E M E T O D O S

Foram utilizados na presente pesquisa fragmentos de fígado de coelho que recebeu previamente a dose diária de 10 ml de soluto glicosado a 10%. O animal foi sacrificado no segundo dia e fragmentos de fígado foram mergulhados imediatamente em 63 soluções fixadoras geladas a 4°C; estas soluções eram combinações das seguintes substâncias químicas: ácido pícrico, formol, álcool, ácido acético, bricromato de potássio e sublimado corrosivo. Estas combinações encontram-se no quadro I.

Os fragmentos de fígado, após fixações, foram incluídos em parafina e, em seguida obtidos cortes com 9 microns de espessura, os quais foram distribuídos em uma série de oito lâminas, contendo cada uma um número de oito cortes conforme o quadro da pág. seguinte; foi obedecida a mesma ordem, em

(1) Realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da U.S.P. e na Faculdade de Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. Apresentado ao 5.º Congresso da Sociedade Brasileira de Anatomia, realizado na Fac. Med. U.F.R., Recife, em junho de 1970.
(2) Do Departamento de Anatomia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P.

1 -	P;	CP;	FP;	FCP;	AP;	ACP;	AFP;	AFCP;
2 -	S;	CS;	FS;	FCS;	AS;	ACS;	AFS;	AFCS;
3 -	SP;	CSP;	FSP;	FCSP;	ASP;	ACSP;	AFSP;	AFCSP;
4 -	B;	CB;	FB;	FCB;	AB;	ACB;	AFB;	AFCB;
5 -	BP;	CBP;	FBP;	FCBP;	ABP;	ACBP;	AFBP;	AFCBP;
6 -	BS;	SBS;	FBS;	FCBS;	ABS;	ACBS;	AFBS;	AFCBS;
7 -	BSP;	CBSP;	FBSP;	FCBSP;	ABSP;	ACBSP;	AFBSP;	AFCBSP;
8 -	C;	F;	FC;	A;	AC;	AF;	AFC;	---
1	2	3	4	5	6	7	8	

A = Alcool 95°
 B = Bicromato de potássio
 C = Acido acético

F = Formol
 P = Acido pícrico
 S = Sublimado

bora a última lâmina tivesse um número de cortes inferior a oito. Para a identificação do glicogênio foi utilizado o processo de coloração de McMANUS² (1946).

RESULTADOS

O exame do material utilizado na presente pesquisa permitiu observar inicialmente que o ácido pícrico, o sublimado corrosivo, o bicromato de potássio, o formol e o ácido acético, quando empregados isoladamente em soluções aquosas e também o álcool a 95°, não preservam satisfatoriamente o glicogênio no interior das células hepática, tanto da superfície como da zona central dos cortes histológicos. O álcool a 95° fixa o glicogênio sob a forma de pequenas massas irregulares intracelulares na periferia do corte como um fenômeno de superfixação; o fenômeno de fuga "Alkoholfucht" é acentuado (Fig. 1).

Nas preparações em que os fragmentos de fígado de coelho foram submetidos à ação

de fixadores constituídos de duas das substâncias químicas em estudo, observa-se que:

- Quando se acrescenta na solução aquosa de ácido pícrico o sublimado corrosivo, formol, ácido acético ou o álcool 95°, a preservação do glicogênio no interior das células hepáticas é melhor (Fig. 2). Quando a solução aquosa de ácido pícrico se adiciona o bicromato de potássio, o glicogênio se torna mais evidente, embora sob a forma de grânulos irregulares, tanto nas células da periferia como nas da zona central dos cortes (Fig. 3).
- Quando, às soluções aquosas de sublimado corrosivo, se adiciona o ácido acético, formol ou bicromato de potássio, o glicogênio das células hepáticas é mal preservado; porém, a solução de sublimado corrosivo em álcool 95°, faz com que o glicogênio se evidencie intra e extracelularmente sob a forma de grânulos de tamanhos variados, especialmente na periferia dos cortes. O fenômeno de fuga é acentuado.
- A solução aquosa de bicromato de potássio

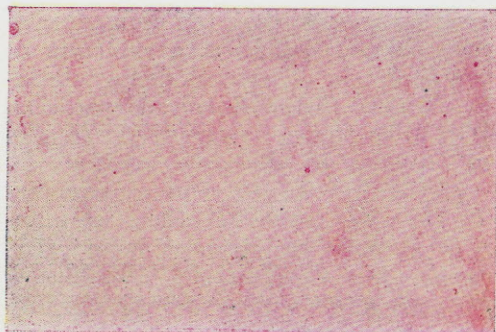


Fig. 1 — Fixação do glicogênio hepático de coelho em álcool 95°. Observar o fenômeno de fuga, uma característica do efeito do fixador sobre o glicogênio intracelular.

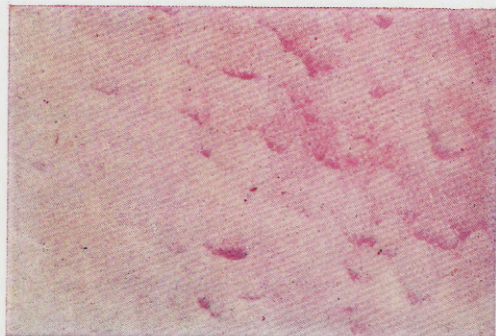


Fig. 4 — Com a solução de bicromato de potássio em álcool 95°, a fixação do glicogênio é feita em pequenas massas. O fenômeno da fuga sempre está presente.



Fig. 2 — Nas combinações binárias a fixação do glicogênio é melhor.

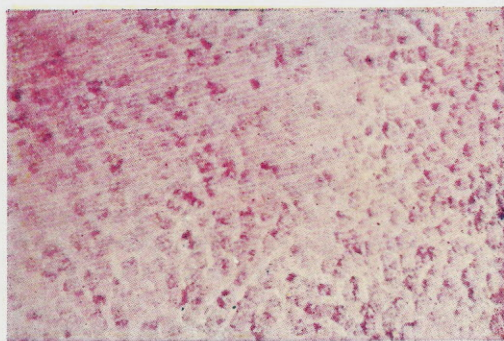


Fig. 5 — Fixação do glicogênio hepático em formol, ácido acético, bicromato de potássio e ácido pícrico em solução aquosa.

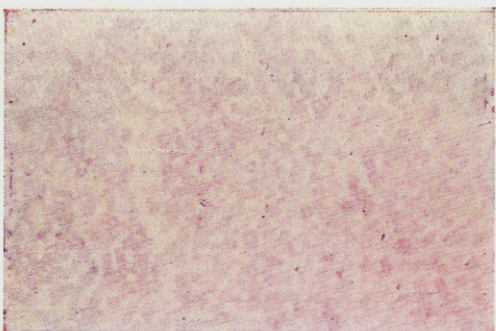


Fig. 3 — Na combinação ácido pícrico e bicromato de potássio em solução aquosa, o glicogênio hepático aparece sob a forma de grânulos irregulares, tanto na parte periférica como na zona central do corte.

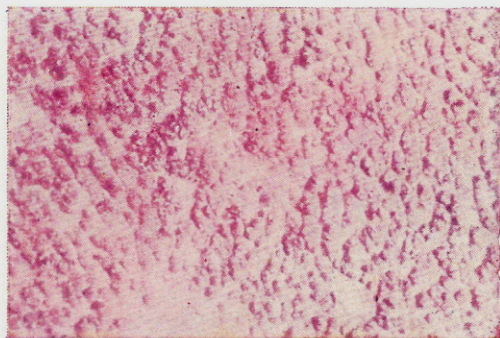


Fig. 6 — Fixação do glicogênio hepático em ácido pícrico, bicromato de potássio e formol em solução alcoólica a 95°.

à qual se adiciona o formol ou ácido acético e a solução de bicromato de potássio em álcool 95°, preservam o glicogênio hepático sob a forma de massas irregulares na periferia do corte histológico (Fig. 4). d) Com a adição de ácido acético glacial à solução aquosa de formol a 10%, a preservação do glicogênio é má; quando se adiciona álcool 95° à solução de formol a 10%, a fixação do glicogênio é semelhante àquela em que é usado somente o álcool 95°.

Entre as soluções compostas de três das substâncias químicas em estudo na fixação do glicogênio hepático, merecem ser destacadas aquelas nas quais participaram o ácido pícrico, o bicromato de potássio e o ácido acético em solução aquosa e a formada de bicromato de potássio, ácido pícrico e formol. Em ambas as soluções, o glicogênio hepático apareceu sob a forma de grânulos intracelulares e em áreas limitadas da superfície do corte histológico.

Das soluções compostas de quatro das substâncias químicas em estudo, destacaram-se aquelas formadas de: a) formol, ácido acético glacial, bicromato de potássio e ácido pícrico, em solução aquosa; b) ácido pícrico, formol, bicromato de potássio e álcool. Em a, o glicogênio foi preservado sob a forma de grânulos irregulares bem corados e dispersos regularmente no citoplasma das células hepáticas tanto da periferia como da zona central dos cortes histológicos (Fig. 5). Em b, o glicogênio apareceu bem corado sob a forma de massas irregulares nas células hepáticas de toda a superfície do corte, menos da sua zona central (Fig. 6); o fenômeno de fuga pode ser observado na superfície do corte.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu verificar que, embora PASTEELS & LÉONARD¹¹ (1935) tenham demonstrado que o ácido pícrico é o fator indispensável na solução de Bouin-Allen, o referido ácido, assim como o ácido acético glacial, o formol, o bicromato de potássio e o sublimado corrosivo, quando utilizados separadamente em solução aquosa, não se mostraram eficientes na fixação do glicogênio existente no interior das células hepáticas do coelho.

Na fixação em fase líquida constatou-se, nas combinações de duas, três e quatro substâncias químicas estudadas, a existência de interdependência de algumas destas substâncias, além da obrigatoriedade da participação do ácido pícrico na composição de soluções fixadoras do glicogênio hepático. Os artefatos de fixação, tais como o parecimento do glicogênio dentro das células sob a forma de grânulos ou pequenas massas irregulares, a fuga do glicogênio "Alkohlfucht" para o polo oposto ao de penetração dos fixadores, a superfixação e a presença de grânulos de glicogênio nos espaços intercelulares, foram relacionados a determinadas substâncias. Assim o fenômeno foi característico do efeito do álcool, formol e ácido acético; a presença de glicogênio sob a forma de finas granulações é característica do efeito do bicromato de potássio e do sublimado corrosivo. O ácido pícrico fixa o glicogênio em pequenas massas irregulares. Todos estes fatos nos levaram a considerar a escolha das diferentes substâncias químicas em estudo, na composição de uma solução fixadora do glicogênio hepático do coelho. Embora indicando a presença do glicogênio nas células hepáticas, deve ser lembrado que o ácido pícrico não age precipitando o glicogênio, mas sim imobilizando o substrato, provavelmente uma proteína (complexo glicogênio-proteína), ao qual o glicogênio está ligado (PASTEELS e LÉONARD, 1935). Então, a razão pela qual este ácido se torna indispensável na fixação do glicogênio, é que ele melhora a fixação do substrato.

Devido a existência dos diversos artefatos da fixação em fase líquida do glicogênio, é que vários autores procuraram outros meios de fixação do glicogênio, tais como a criodissecação e a congelação-dissolução (MANCINI⁶, 1947 e 1948; LISON⁵, 1949; BONDAEFF², 1957).

Na fixação em fase líquida em que participaram quatro das substâncias químicas estudadas, observou-se que, na maioria das combinações quaternárias, a preservação do glicogênio hepático não foi satisfatória, mesmo com aquelas em que o ácido pícrico estava presente; em outras, embora com os artefatos apontados, o glicogênio foi evidente e bem identificado pelo processo de coloração de McManus. Entre estas, destacaram-se as constituídas por: a) ácido pícrico, formol, bicromato de potássio e ácido acético em

solução aquosa; b) ácido pícrico, bicromato de potássio e formol em solução alcoólica. Estas soluções apresentam composição química semelhante à daquela proposta por Gendre para a fixação do glicogênio. Porém nelas, observa-se a presença do bicromato de potássio e na primeira, a solução é aquosa. Isto vem confirmar as observações de BAUER¹ (1933), DEANE³ (1946), LILLIE⁴ (1947), MORGAN & MOWRY⁹ (1951) e MORRIONE & MAMELOK¹⁰ (1952) que, em soluções aquosas, se pode obter bons fixadores do glicogênio. Assim, em ambas as soluções fixadoras quaternárias, os resultados foram igualmente satisfatórias na preservação do glicogênio das células hepáticas, principalmente quando usadas a temperatura de 4°C, como foi observado em uma experimentação preliminar.

RESUMO

O autor analisa a ação do ácido pícrico, bicromato de potássio, ácido acético, formol e do sublimado corrosivo, em soluções aquosas e do álcool 95° no processo de fixação do glicogênio hepático de coelho que recebeu previamente injeções endovenosas de solução glicosada. Usando 63 combinações das substâncias químicas acima referidas e o processo de identificação do glicogênio dos tecidos orgânicos de McManus, ficou constatada a importância do bicromato de potássio, além do ácido pícrico, na composição de soluções fixadoras do glicogênio hepático de coelho, tanto em meio aquoso como alcoólico.

Agradecimento — Ao Dr. Evandro Pimenta de Campos, Chefe da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, que nos possibilitou a obtenção da documentação do presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUER, H. — Mikroskopisch-chemischer Nachweis von Glykogen und einigen anderen Polysacchariden. *Z. mikr.-anat. Forsch.*, 33:143-160, 1933.
2. BONDAREFF, W. — Morphology of particulate glycogen in guinea pig liver revealed by electron microscopy after freezing and drying and selective staining in bloc. *Anat. Rec.*, 129:97-108, 1957.
3. DEANE, H. W. B. — Nasbett and Hastings, B. — Improved fixation for histological demonstration of glycogen and comparison with chemical determination in liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 63:401, 1946.
4. LILLIE, R. D. — Reticulum staining with Schiff reagent after oxidation by acidified sodium periodate. *J. Lab. Clin. Med.*, 32:910-12, 1947.
5. LISON, L. — Sur la fixation histochimique du glycogène. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 143:115-6, 1949.
6. MANCINI, R. E. — Nueva reacción del yodo para la investigación del glucógeno en tejidos. *Soc. Anat. Nor. y Pat.*, 6:628-1947.
7. MANCINI, R. E. — Histochemical study of glycogen in tissue. *Anat. Rec.*, 101:149-60, 1948.
8. McMANUS, J. F. A. — Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature (Lond.)*, 158:202, 1946.
9. MORGAN, C. and MOWRY, R. M. — Demonstration of glycogen in the human liver by the electron microscope. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 76:850-2, 1951.
10. MORRIONE, T. G. and MAMELOK, H. L. — Observations on the persistence of hepatic glycogen after death. *Amer. J. Path.*, 28:497-502, 1952.
11. PASTEELS, J. et LÉONARD, M. G. — Sur la détection du glycogène dans les coupes histologiques *Bull. Histol. Appl.* 12:293-317, 1935.

Recebido para publicação em 31 de agosto de 1971.

