

UTILIZAÇÃO DE VÁRIOS TIPOS DE FUCSINA BÁSICA NO PREPARO DO REATIVO DE SCHIFF PARA COLORAÇÃO DOS ALDEÍDOS EM CORTES DE TECIDOS *

Evandro Pimenta de CAMPOS **
Antonio James BRANDI **
Adriana Manginelli MASSIGNANI **
Nilza BAPTISTA **

RIAL-A/425

CAMPOS, E. P.; BRANDI, A. J.; MASSIGNANI, A. M. & BAPTISTA, N. —
Utilização de vários tipos de fucsina básica no preparo do reativo de Schiff para coloração dos aldeídos em cortes de tecidos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 127-130, 1975/76.

RESUMO: Qualquer tipo de fucsina básica poderá ser empregado com sucesso no preparo do reativo de Schiff, para a coloração dos aldeídos, e não somente as fucsinas básicas indicadas pelos livros de técnicas histológicas, usando-se as seguintes normas: a) eliminar o máximo de oxigênio da água, fervendo durante uns 15 minutos; b) cessar a ebulição afastando-a da chama e só então juntar a fucsina; c) colocar o metabissulfito no fundo do reativo bem acidificado; d) não deixar nenhum traço de carvão na solução; e) evitar contacto de ar com o reativo, durante sua estocagem.

DESCRIPTORIOS: leucofucsina, preparo; coloração de aldeído em tecido; aldeído em tecido, coloração.

I N T R O D U Ç Ã O

Os tratados de técnicas histológicas indicam que somente determinados tipos de fucsina básica podem produzir uma leucofucsina que serve para a coloração de glicogênio com o reativo de Schiff. Este fato vinha há tempos chamando nossa atenção, parecendo-nos que poderíamos utilizar outras fucsinas para obter uma leucofucsina, usando a fórmula de Tomasi, citada por PEARSE † (1960), para preparação do reativo

de Schiff. Com alguns cuidados e fazendo algumas modificações, chegamos à conclusão de que qualquer tipo de fucsina básica dará uma leucofucsina em perfeitas condições de uso para utilização nessa técnica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram usados cortes de fígado, rim, baço, pulmão e de outros órgãos de camun-

* Realizado na Seção de Anatomia Patológica do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

** Do Instituto Adolfo Lutz.

dongos nos quais foram injetados, por via intramuscular, 2 ml de solução de sucrose a 3,5%; estes animais, sacrificados 3 horas após a injeção, mostraram nos órgãos grandes quantidades de glicogênio. Foram utilizadas lâminas negativas para glicogênio, empregando-se o teste da saliva, para controle.

As peças foram fixadas em formol alcoólico gelado, assim preparado: 20 ml de formol puro, 40 vol., 50 ml de água destilada e o volume completado até 230 ml com álcool absoluto. Estas peças, colocadas no fixador formol alcoólico, foram conservadas em geladeira durante 24 horas e, depois de fixadas, foram colocadas em álcool absoluto, 3 mudanças de 1 hora cada; em clorofórmio, 2 mudanças de 1 hora cada; em parafina, 3 mudanças de 1 hora cada. Foram feitos cortes de 6 microns de espessura.

Também foram coradas lâminas de fungos pelo método de Gridley, sabendo-se que nesta coloração usa-se uma leucofucsina.

1. Reativo de Schiff (segundo Tomasi apud PEARSE⁴), conforme nossa técnica:

Ferva 400 ml de água destilada, durante 15 minutos até que o volume seja reduzido a 200 ml, afaste a chama e espere até que cesse a ebulição. Junte, sem triturar, 1 g de fucsina básica. Agite vagarosamente durante 5 minutos. Deixe a solução esfriar até 50°C. Filtre diretamente para um balão volumétrico de 250 ml de cor âmbar e adicione à solução 20 ml de ácido clorídrico normal. Deixe que a solução esfrie até 25°C e adicione, através de um funil de tubo longo (fig. 1), 1 g de metabissulfito de sódio, fazendo com que este caia no fundo da solução. Tampe imediatamente o balão. Agite suavemente durante um minuto e deixe o reativo em repouso no escuro, em temperatura ambiente, por 24-48 horas. Junte unicamente 2 g de carvão ativo (Norit). Agite a solução durante 1 minuto e filtre, várias vezes, em papel de filtro Whatman n.º 1, para eliminar qualquer traço de carvão que seria prejudicial ao reativo. Trans-

fira a solução para um frasco escuro apropriado e tampe. O frasco deverá conter um máximo de solução, para que a camada de ar entre a tampa e o reativo seja a menor possível. O contacto da solução com o oxigênio do ar oxida a leucofucsina¹. Conserve a solução assim obtida em geladeira a 0,5°C; porém, antes de seu uso, ela deve adquirir a temperatura do ambiente, para o que basta deixá-la em repouso sobre uma mesa durante 1 hora.

2. Coloração pelo método de Schiff (PAS)

A coloração para evidenciar o glicogênio deve ser sempre feita sob uma película protetora de celoidina, como foi sugerido por LISON³ (1960), LILLIE² (1954) e PEARSE^{5,6}, 1960.

Soluções

- a) Celoidina a 1% (álcool a 95% e éter em partes iguais);
- b) Ácido periódico diluído ($\text{HIO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, conc. 0,5 g; água destilada, 100 ml);
- c) Reativo de Schiff, preparado conforme foi descrito anteriormente, partindo de qualquer fucsina básica ou New Fuchsin;
- d) Hematoxilina de Harris sem ácido acético, de fórmula conhecida.

Coloração

1. Xilol 1 (p. desparafinar) 5 min
2. Xilol 2 (p. desparafinar) 5 min
3. Álcool absoluto 3 min
4. Álcool a 95% 3 min
5. Solução A (para proteger) 10 min
6. Deixar secar perfeitamente as lâminas em pé.
7. Álcool a 80% (para endurecer a celoidina) 5 min
8. Lavar em água de torneira 5 min
9. Lavar em água destilada 5 min
10. Colocar na solução B (para oxidar) 5 min
11. Lavar somente em água destilada.

12. Corar na solução C (o frasco de Borel deverá estar fechado e protegido da luz) 15 min
13. Lavar em água de torneira para desenvolver a cor rosa 10 min
14. Corar na solução D 2 min
15. Lavar em água corrente, diferenciar rapidamente em álcool ácido (HCl 0,5 ml e álcool a 70%, 95 ml), 2 mergulhos.
16. Lavar em água corrente 10 min
17. Colocar em álcool a 95% e em álcool absoluto e enxugar as lâminas em papel de filtro, com o corte voltado para baixo.
18. Xilol (2 mudas) 5 min
19. Montar em bálsamo sintético do Canadá diluído em toluol.

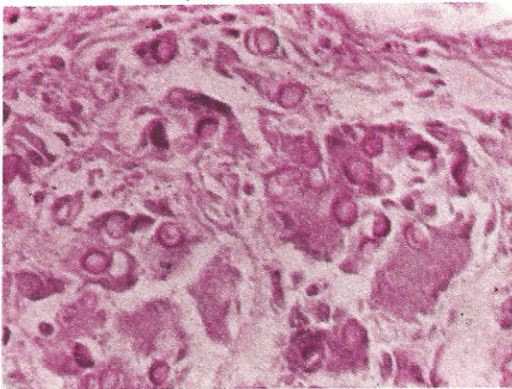


Fig. 1 — Corte de gânglio linfático com blastomicose sul-americana, com fungos corados pelo Método de Gridley (PAS): membrana (PAS positivo), corada de vermelho forte; núcleo (corado pela fucsina alceídica), arroxeadado; citoplasma das células fagocitárias corado pela hematoxilina de Harris em azul. 400 x.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PEARSE ⁶ (1960) acha que nem todos os lotes de fucsina básica produzem uma reação satisfatória. Todavia, quando o reativo não funciona, nem sempre depende da mar-

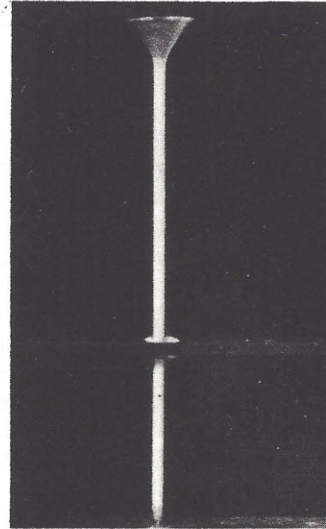


Fig. 2 — Funil de vidro com haste bastante longa utilizado na técnica.

ca do corante nem da partida, mas sim da maneira como o reativo foi preparado. Experimentamos vários tipos de fucsina básica, a saber: Fucsina Merck em pó e Merck-Diamant; fucsina B.D.H. (British Drug House); fucsina Grüber; New Fuchsin Harleco; fucsina básica Harleco; fucsina básica Carlo Erba; fucsina básica Schiaparelli; fucsina básica Gurr; fucsina básica Difco; fucsina básica Biochemical Research, e com todos eles obtivemos leucofucsinas, que deram ótimos resultados na coloração pelo PAS.

Recomendamos, portanto, que, para se obterem resultados satisfatórios no preparo das leucofucsinas, é necessário eliminar todo o oxigênio da água destilada empregada e evitar a oxidação da fucsina básica, ao colocá-la em ebulição, bastando para isso afastar a chama; colocar o metabissulfito na solução resfriada, a 25°C, através de um funil de tubo bem longo, que atinja quase o fundo do balão volumétrico, para que a redução não se dê fora da solução, mas que a perda de oxigênio se dê dentro da solução com desprendimento de SO₂; evitar ao máximo o contacto da solução com o oxigênio do ar, para o que se deve filtrá-la rapidamente, tampar logo o frasco e re-

tirar todo o carvão da solução com papel de filtro apropriado, fazendo várias filtrações com o mesmo papel.

Aconselhamos sempre, antes de se desprezar o reativo de Schiff, experimentá-lo em lâminas positivas pois, às vezes, podemos ter reativos de Schiff que, apesar de se apresentarem corados, dão ótimas colorações para o glicogênio e, outras vezes, podemos ter leucofucsinas perfeitamente cristalinas que não funcionam; este último fato se deve ao excesso na quantidade de carvão utilizado para descolorar o reativo, considerando que o carvão, possuindo propriedades físicas de adsorção, vai descolorar totalmente o corante, não permitindo mais

que, nos cortes, a fucsina reaja com o aldeído, dando a cor vermelha. A coloração de glicogênio deve ser feita sempre sob uma camada protetora de colódio, conforme sugestão de LISON³, LILLIE² e PEARSE⁶, já citados.

Agradecimentos

Agradecemos a Difco Laboratories, Michigan, U.S.A.; Edward Gurr, Ltd., London, England; Carlo Erba, Milano, Itália; British Drug House, London, England; Schiaparelli, Milano, Itália e California Corporation for Biochemical Research, Cal., E.U.A., por nos terem enviado graciosamente amostras de fucsinas básicas.

RIAL-A/425

CAMPOS, E.P.; BRANDI A.J.; MASSIGNANI, A.M. & BAPTISTA, N. — Use of various brands of basic fuchsin in the preparation of the Schiff's reagent for staining of aldehydes in tissue sections. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 127-130, 1975/76.

SUMMARY: Any brand of basic fuchsin can be used in the preparation of Schiff's reagent for staining of aldehydes rather than only those indicated in the histologic techniques literature, provided the following guidelines are observed: a) oxygen in the water is to be eliminated to the maximum extent possible by boiling the water for 15 minutes; b) addition of fuchsin to the water is to be made only after heating is discontinued; c) metabissulfite must be added at the bottom of the acidified reagent; d) no trace of coal is to be left in the solution; e) reagent is not to have contact with air during storage.

DESCRIPTORS: leucofuchsin, preparation; staining, aldehyde in tissue; aldehyde, staining in tissue.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DAVENPORT, A.H. — *Histological and histochemical techniques*. Philadelphia, Saunders [c1960]. p. 187.
2. LILLIE, R.D. — *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3th ed. New York, McGraw-Hill [c1965]. p. 496.
3. LISON, L. — *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. 3ème ed. Paris, Gauthier-Villars, 1960. v.2, p. 433.
4. PEARSE, A.G.E. — *Histoquímica teorica y aplicada*. Versión española de Tomas Palomo Salas. Madrid, Aguilar, 1960. p. 473.
5. Ibid p. 175.
6. Ibid p. 472.

Recebido para publicação em 25 de setembro de 1975.