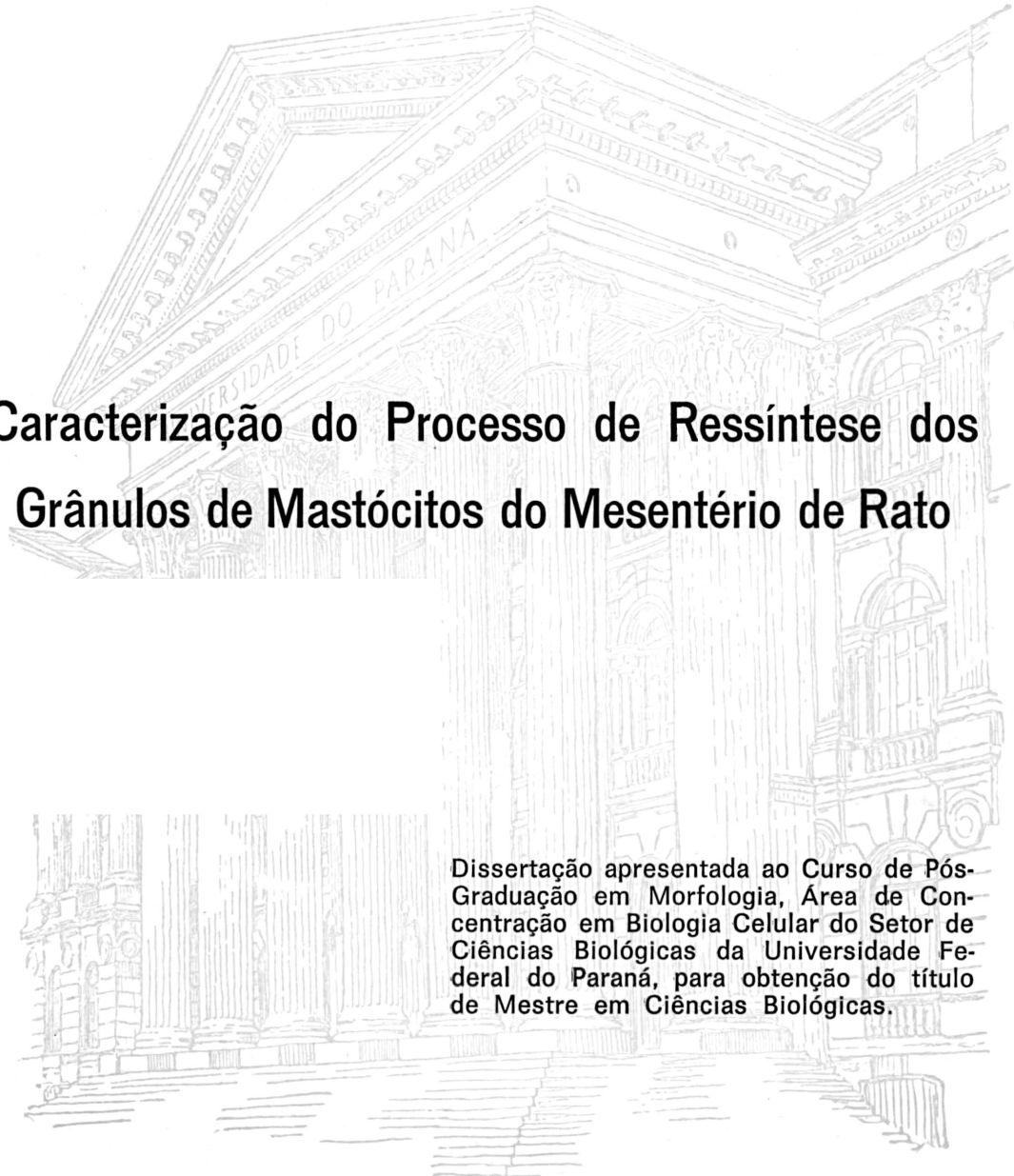


MARIA CECILIA DALOSSI GARBELINI



**Caracterização do Processo de Ressíntese dos
Grânulos de Mastócitos do Mesentério de Rato**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA
1992

MARIA CECILIA DALOSI GARBELINI

Caracterização do Processo de Ressíntese dos Grânulos de Mastócitos do Mesentério de Rato

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Morfologia, Área de Concentração em Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

CURITIBA
1992

À Profa. Dra. Maria Célia
Jamur, pela orientação segura,
amizade, estímulo e, principal-
mente, por propiciar a ver-
dadeira formação científica.

Aos meus pais, Ivone e Narciso, exemplos de dignidade e dedicação, por me ensinarem a ter um grande respeito pela vida, o meu eterno agradecimento.

Ao meu esposo, Reynaldo, pela compreensão e incentivo no decorrer deste trabalho, o meu sincero amor.

Aos meus filhos, Gisele e Guilherme, aos quais dedico com muito carinho este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Waldemiro Gremski, pelo incentivo, apoio e confiança que muito contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ithamar Vugman, pelas valiosas sugestões que tanto ajudaram na elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. Célia Maria Dalossi Lopes, minha irmã e amiga, pelo apoio e incentivo constante em toda minha vida.

À Profa. Dra. Vânia Beatriz Vieira de Souza, pela contribuição prestada.

À Profa Cloris D. Faracó pela amizade e colaboração concedida.

Aos Profs. do Departamento de Biologia Celular, pelo estímulo e compreensão.

À colega Cecilia Beatriz Helm Niederheitmann, pela valiosa ajuda na realização dos experimentos.

Aos demais colegas do curso de Pós-Graduação, pelo convívio amigo.

Ao Sr. Reynaldo Penteado Garbelini, pela contribuição nos serviços datilográficos.

Ao Sr. Marcelo da Costa Gonçalves do Depto de Medicina da FMRP-USP, pela colaboração na execução das fotomicrografias.

Ao CNPq-Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- pelo auxílio concedido.

À todos aqueles que colaboraram na confecção deste trabalho.

SUMÁRIO

	PÁGINAS
LISTA DE FIGURAS.....	vii
RÊSUMO	viii
I INTRODUÇÃO	1
II REVISÃO DA LITERATURA	3
III MATERIAL E MÉTODOS	11
IV RESULTADOS	16
V DISCUSSÃO	33
VI CONCLUSÕES	41
VII SUMMARY	42
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1 Mastócitos de animais controle.....	26
2 Mastócitos corados com azul de alcian.....	27
3 Mastócitos corados com azul de astra.....	28
4 Mastócitos corados com safranina O.....	29
5 Mastócitos corados com azul de astra e safranina O...	30
6 Mastócitos corados com azul de alcian e safranina O..	31
7 Mastócitos submetidos à colorações sequenciais	32

RESUMO

O processo de ressíntese dos grânulos de mastócitos foi investigado no mesentério de rato, 24 e 48 horas após injeção intraperitoneal do agente desgranulante 48/80. Cada fragmento do mesentério foi submetido a diferentes fixadores e técnicas de coloração, com o objetivo de caracterizar e diferenciar grânulos recém sintetizados, bem como sua maturação.

Usamos os corantes catiônicos azul de alcian, azul de astra e safranina, em diferentes pHs, os quais se ligam seletivamente aos locais aniônicos da heparina, glicosaminoglicana sulfatada, presente nos grânulos de mastócitos. Com os corantes azul de astra e safranina, obtivemos diferenciação entre os grânulos imaturos, recém sintetizados corados em azul, e os grânulos maduros, corados em vermelho. Na maioria dos casos não houve interferência dos fixadores na coloração dos grânulos, mesmo quando alteramos o pH dos diversos fixadores empregados. Entretanto, utilizando azul de alcian e safranina O juntos, obtivemos situações em que a diferenciação dos grânulos quanto aos níveis de maturação não foi possível pela interferência de alguns dos fixadores utilizados.

Vinte e quatro horas após a desgranulação, os grânulos recém sintetizados (imaturos) eram menores, muitas vezes estavam polarizados ou localizados na região perinuclear. Por terem afinidade pelos corantes tetracatiônicos (azul de astra e azul de

alcian). se coravam em azul. Os grânulos maduros eram maiores, distribuídos por todo o citoplasma e apresentavam afinidade pela safranina, corando-se em vermelho.

Quarenta e oito horas após a injeção do 48/80, as células já se encontravam repletas de grânulos maduros assemelhando-se aos mastócitos dos animais controle.

Nossos resultados sugerem que a mudança de cor de azul (grânulo imaturo) para vermelho no grânulo maduro, seja mais resultante do acúmulo de radicais sulfato provenientes da agregação de glicosaminoglicanas sulfatadas durante o processo de maturação dos grânulos.

I-INTRODUÇÃO

O tecido conjuntivo caracteriza-se por apresentar uma grande variedade de células, que se diferenciam morfo e fisiologicamente. Entre estas células, estão presentes os mastócitos, cuja característica diferencial é a presença de numerosos grânulos citoplasmáticos basófilos, que se coram metacromaticamente (EHRlich, 1877). Esta basofilia se justifica pelo fato que os grânulos dos mastócitos são formados por uma matriz, que contém glicosaminoglicana sulfatada.

Os mastócitos têm uma ampla distribuição, situando-se muitas vezes de forma adjacente aos vasos sanguíneos e linfáticos. Embora sejam células residentes no tecido conjuntivo, têm sua origem em tecidos hematopoiéticos, como progênie da "stem cell" (KITAMURA et al., 1979; GALLI et al., 1984; GALLI, 1990). As células precursoras dos mastócitos, deixam os tecidos hematopoiéticos através da corrente sanguínea e atingem o tecido conjuntivo onde sofrem diferenciação e maturação, tornando-se células típicas destes locais.

Os mastócitos de diferentes espécies e diferentes tecidos dentro de um mesmo organismo, podem constituir populações heterogêneas (PEARCE, 1982), as quais apresentam propriedades diversas quanto as características morfológicas e quanto ao

conteúdo intracelular dos mediadores químicos. A heterogeneidade na população dos mastócitos, é baseada principalmente no estudo em roedores (ENNIS et al. 1980). Estudos histológicos a respeito da heterogeneidade dos mastócitos de rato, presentes em locais diversos no tecido conjuntivo, foram feitos por TAINSH et al.(1992), mediante fixação com formol e coloração com azul de alcian e safranina O.

Quando os mastócitos são submetidos a polímeros básicos como o composto 48/80, sofrem uma desgranulação seletiva (JOHNSON et al. 1969), podendo em seguida ressintetizar seu conteúdo granular (JAMUR ; VUGMAN. 1988).

A ressíntese dos mastócitos, confere aos pesquisadores um amplo campo para a investigação, visto que muitas dúvidas ainda precisam ser esclarecidas.

Assim sendo, abordaremos o processo da ressíntese em mastócitos do mesentério de rato, no qual faremos um estudo da interferência dos fixadores e dos métodos histoquímico, para caracterizar grânulos imaturos e maduros mediante coloração especial, buscando assim, melhor compreensão destas células.

II-REVISÃO DA LITERATURA

Os mastócitos foram descritos inicialmente por EHRLICH em 1877, como células do tecido conjuntivo que possuem proeminentes grânulos citoplasmáticos, que se coram metacromaticamente. A metacromasia é devida à presença da heparina, glicosaminoglicana sulfatada, presente nos grânulos de mastócitos de tecido conjuntivo (JORPES, 1937).

Além da heparina, outras substâncias também podem ser encontradas nos mastócitos de rato, como a histamina (RILEY, 1952) e a serotonina (BENDITT et al. 1955). Proteases neutras como quimases (rat mast cell protease I), carboxipepdase A, hidrolases, tais como: beta hexosaminidase, beta glicuronidase, beta-delta galactosidase e aril sulfatase A, também estão presentes nos grânulos, juntamente com fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos. Alguns destes componentes encontrados nos grânulos de mastócitos, conferem importante papel para estas células nas reações inflamatórias e nos processos imunológicos (GALLI et al. 1984; SIRAGANIAN, 1988).

Os mastócitos possuem na sua membrana, receptores para IgE, de alta afinidade, que se ligam às porções Fc desta imunoglobulina. Os mastócitos quando fixam IgE em seus receptores tornam-se sensibilizados. A ligação de mastócitos sensibilizados à antígenos específicos, desencadeia uma série de alterações

bioquímicas e ultraestruturais não citolíticas, que levam a uma desgranulação ou exocitose, resultando na liberação do conteúdo dos grânulos. A liberação da histamina, fatores quimiotáticos pré-formados assim como mediadores químicos neo-formados derivados do ácido araquidônico, levam aos processos alérgicos (SCHWARTZ; AUSTEN, 1984). Além da desgranulação pelo complexo antígeno-anticorpo, outros agentes não citotóxicos como os compostos policatiônicos 48/80, polimixina B, polilisina e poliarginina causam a desgranulação dos mastócitos, de forma não citotóxica (SIRAGANIAN, 1988).

Indicações de que a desgranulação dos mastócitos, pelo composto 48/80, não causa ruptura da membrana celular, a qual permanece funcionalmente intacta, foram feitas por JOHNSON e MORAN (1969). Estes autores estudaram a liberação seletiva de histamina dos grânulos de mastócitos de rato, uma vez que outras substâncias foram retidas como certas proteínas, desidrogenase láctica, ATP e K.

ROHLICH et al. (1971) analisaram as mudanças ultraestruturais bem como a liberação de histamina, com o uso do composto 48/80 em mastócitos de rato. As observações foram feitas em intervalos de 10 a 60 segundos após a aplicação do desgranulante. As organelas citoplasmáticas não mostraram alterações observáveis e a desgranulação foi descrita como uma exocitose sequencial, sendo um processo similar ao descrito para algumas glândulas exócrinas. Todas as cavidades intracelulares, formadas pela desgranulação, se comunicavam com o meio

extracelular. Consequentemente, os grânulos presentes nestas cavidades, embora estivessem no " domínio celular", poderiam ser considerados como extracelulares, e por consequência, poderiam liberar amina através de troca iônica com o meio extracelular.

O processo de ressíntese dos grânulos de mastócitos foi estudado após o estímulo com o composto 48/80 por JAMUR; VUGMAN (1988) em mastócitos de mesentério de rato e no lavado peritoneal. Com 24 horas após a injeção intraperitoneal do agente desgranulante, os mastócitos se apresentaram sem a maioria de seus grânulos, porém com sinais de regranulação dos mesmos. Estas células apresentam complexo de Golgi e RER bem desenvolvidos, bem como polissomos e mitocôndrias em abundância. Com 48 horas, estas células se encontraram em intenso processo de síntese, assemelhando-se a mastócitos imaturos, ou seja, com grânulos pequenos localizados na região do Golgi. Após 72 horas, a regranulação pareceu estar completa, visto que o citoplasma estava repleto de grânulos. A heparina foi detectada nos grânulos maiores (maduros) 48 horas após estímulo, pela coloração com o azul de toluidina e pela fluorescência com sulfato de berberina.

Desde a sua introdução por MOWRY (1960), o azul de alcian 8GX tem sido amplamente usado para detecção de glicosaminoglicanas livres e proteoglicanas. A molécula do azul de alcian é formada por um anel de ftalocianina de cobre, ligado a quatro grupos catiónicos que não fazem parte do cromóforo, mas servem para carregar o pimento azul (núcleo de ftalocianina). Os grupos catiónicos são colocados no término da cadeia

hidrocarbônica, sendo capazes de reagir com polímeros ácidos como a heparina, em solução aquosa. Ligações químicas não estão presentes em tais complexos, sendo que os dois reagentes se ligam eletrostaticamente (SCOTT et al. 1964). Pela atração entre cargas opostas, ocorre interação entre o azul de alcian e a heparina levando a formação de um precipitado. A combinação deste corante básico polivalente, com muitos poliânions biológicos, mostra que não há especificidade nesta combinação. Entretanto quando se usa o corante em pH 2.5, ocorre uma seleção dos poliânions de maneira que os grupos sulfatados e carboxilados possam estar ionizados e com isso ter afinidade pelo azul de alcian. Portanto, somente a heparina apresenta-se corada nesta faixa de pH do corante.

SPICER (1960) utilizou a técnica de coloração sequencial azul de alcian-safranina, como método diferencial entre mucopolissacarídeo fortemente e fracamente sulfatado. Os grânulos com mucopolissacarídeos fracamente sulfatados, foram corados em azul e os fortemente sulfatados, corados em vermelho. SPICER (1963), após os estudos histoquímicos dos mucopolissacarídeos e proteínas dos mastócitos, concluiu que a coloração dos grânulos pode variar de espécie para espécie, bem como dentro de uma mesma espécie

COMBS et al. (1965) utilizando a mesma técnica descrita por SPICER (1960), associada à incorporação de sulfato radioativo, classificaram em 4 os estádios de maturação dos mastócitos em embriões e ratos recém nascidos. No estágio I, houve predominância de grânulos que se coraram em azul, o que atribuiu

ao baixo nível de sulfatação da heparina. No estágio II, apareceram grânulos vermelhos em menor número do que os azuis. No estágio III, houve uma inversão, onde a maioria dos grânulos se corou em vermelho. No estágio IV, todos os grânulos eram vermelhos e seriam portanto, altamente sulfatados. Os grânulos azul de alcian positivos continham heparina pouco sulfatada que gradativamente sofreria uma sulfatação posterior, tornando-se safranina positivos. Utilizando a marcação com sulfato radioativo, sugeriu que a maturação do grânulo, seria consequência da incorporação de sulfato, que ocorreria em grânulos já sintetizados, ou seja, haveria uma sulfatação pós Golgi.

CHI et al (1978) estudaram a maturação de mastócitos na língua de camundongo na fase fetal, pós parto e algumas semanas após o nascimento. Obtiveram resultados semelhantes aos descritos por COMBS et al. (1965) quanto à coloração sequencial azul de alcian-safranina.

TAS (1977) demonstrou que o método histoquímico diferencial entre glicosaminoglicanas forte e fracamente sulfatadas proposto por SPICER (1960), é influenciado pelo fixador usado, não sendo portanto um método adequado para avaliação do grau de sulfatação das glicosaminoglicanas. TAS mostrou ainda, que a coloração dos grânulos dos mastócitos pelo azul de alcian, pode sofrer interferência quando corados sequencialmente pela safranina, mesmo quando fracamente sulfatados. Estes resultados estariam na dependência das ligações do azul de alcian e glicosaminoglicanas

em uma primeira etapa. Para chegar a este resultado, utilizou filmes de poliacrilamida que incorporam glicosaminoglicanas de mastócitos peritoneais e de mesentério de rato bem como de hamster.

MENDONÇA (1979), estudou o processo de maturação dos mastócitos do mesentério e da língua de rato, usando a coloração sequencial azul de alcian-safranina. Demonstrou que esta coloração pode ser influenciada pelos fixadores, pelo tempo de coloração pelo azul de alcian e pela sequência da utilização destes corantes. Concluiu que o método é inespecífico para relacionar o grau de sulfatação da glicosaminoglicana, não podendo ser utilizado para determinar o grau de maturação dos mastócitos de rato.

Realizando estudos "in vitro" sobre o desenvolvimento de mastócitos peritoneais de rato, CZARNETZKI et al. (1979), observaram mudanças nas propriedades de coloração destas células. A maioria dos grânulos levemente metacromáticos, observados nas células nos primeiros dias de cultivo, era azul de alcian positiva. Com 14 dias de cultura a maioria dos mastócitos já era madura e apresentava grânulos safranina positivos.

MENDONÇA et al. (1986), realizaram estudos sobre a repovoamento e maturação dos mastócitos de lavado e de mesentério de rato, após lise dos mesmos pela água destilada. Mastócitos imaturos contendo poucos grânulos ortocromáticos, foram identificados 5 dias após a lise. Durante a maturação, os grânulos aumentaram em número e tamanho e tornaram-se metacromáticos.

A heparina foi demonstrada pelo sulfato de berberina, ainda em grânulos ortocromáticos.

Estudando a maturação dos grânulos de mastócitos de rato em tecido conjuntivo embrionário e adulto, BURTON (1964), utilizou coloração de azul de astra-safranina O para caracterizar os polissacarídeos presentes nestas células. Os mastócitos de ratos adultos foram classificados em 3 grupos, após esta coloração: 1) azul de astra positivos, 2) safranina positivos e 3) mistos ou seja com afinidade para os dois corantes. Em embriões, os mastócitos surgiram no 15^o e 16^o dia de desenvolvimento, como células arredondadas e com grânulos azul de astra positivos. No 21^o dia de desenvolvimento havia uma grande população de mastócitos sendo todos azul de astra positivos. Oito a 15 dias após o nascimento, mastócitos mistos também foram vistos. Estes mastócitos tornaram-se progressivamente maduros, sendo todos vermelhos ou seja, safranina positivos. O autor concluiu que esta mudança de coloração, está relacionada a um aumento progressivo de fortes grupos acídicos do polissacarídeo.

SASAKI (1980), usando também os corantes azul de astra e safranina O, analisou o desenvolvimento, distribuição e características histoquímicas dos mastócitos em língua de camundongo. Com aumento da idade, estas células aumentam em número e alteram a morfologia. Em camundongos recém-nascidos, os grânulos eram azul de astra positivos. Uma semana após o nascimento, apareceram mastócitos totalmente azuis, outros totalmente vermelhos e ainda houve a presença dos dois tipos de

grânulos em um mesmo mastócito. Com 3 semanas de vida, a maioria apresentou-se vermelha. As células coradas em azul foram denominadas imaturas, pouco sulfatadas, e as vermelhas maduras, mais sulfatadas.

O azul de astra tem um grau considerável de especificidade para mucopolissacarídeos ácidos. É similar ao azul de alcian, sendo também do grupo das ftalocianinas. (GEDIGK, 1956; FASSKE, 1957; PIOCH, 1957). BLOOM e KELLY (1960) realizaram um estudo comparativo das propriedades de coloração deste corante, e concluíram que é mais específico quando comparado com o azul de alcian, por não promover coloração do núcleo, manter boas propriedades de coloração em baixo pH e requerer um tempo menos crítico para atuação. Este corante foi usado por BURTON (1964) e por SASAKI (1980), associado com a safranina O para diferenciar mastócitos maduros (safranina positivos) e imaturos (azul de astra positivos).

No presente trabalho, investigaremos a interferência dos fixadores sobre alguns métodos histoquímicos, utilizados na caracterização de grânulos imaturos (recém-sintetizados) e maduros, durante o processo de ressíntese dos grânulos de mastócitos do mesentério de rato, após estímulo secretor com 48/80.

III-MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados ratos albinos Wistar, do sexo masculino, pesando em média 250 gramas, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais receberam intraperitonealmente 200 g do composto 48/80 (p-metoxi-N-metilfenetilamina), em solução Tyrode-Tris 0.02M, pH 7.2.

Os animais foram sacrificados por decapitação 24 e 48 horas após a injeção, sendo colhido o mesentério. Também procedeu-se a retirada do mesentério dos animais controle (intactos), os quais não receberam a injeção intraperitoneal do desgranulante.

OBTENÇÃO DO MATERIAL

O mesentério foi cuidadosamente retirado, colocado em uma placa de Petri contendo solução salina e dividido em fragmentos, os quais foram fixados em:

1) Carnoy:

clorofórmio a 30% e ácido acético a 10% em álcool absoluto
pH 2.8.

2) Alfac:

formol a 10% e ácido acético a 5% em álcool 80%
pH 3.5.

3) subacetato de chumbo:

subacetato de chumbo a 1% e ácido acético a 1% em álcool absoluto
pH 4.5.

4) formol acetato de cálcio

acetato de cálcio a 10% em formol a 10%

pH 6.9.

5) formol 10%

pH 3.3.

Os fragmentos de mesentério foram fixados por 10 minutos em Carnoy, 15 minutos em subacetato de chumbo; 20 minutos em Alfac e formol acetato de cálcio e 30 minutos em formol 10%.

A seguir foram lavados em água destilada e submetidos às técnicas de coloração, a temperatura ambiente, reunidas em 3 grupos:

Grupo I -Colorações utilizando um só corante

1) azul de alcian 8GX a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 30 minutos.

2) azul de alcian 8GX a 0.05% em tampão acetato 0.025M pH 5.8 contendo $MgCl_2$ 0.3M . As lâminas foram incubadas durante 16 horas.

3) azul de astra a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 15 minutos.

4) safranina O a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 5 minutos.

**Grupo II - Colorações utilizando dois corante
simultaneamente**

1) azul de astra a 0.5%, safranina O a 0.5% e ácido acético a 20% pH 2.3, por 15 minutos (SASAKI, 1980).

2) azul de alcian 8GX a 0.5%, safranina O a 0.5% e ácido acético a 20% pH 2.3, por 15 minutos (SASAKI, 1980 modificado).

Após as colorações citadas, os fragmentos de mesentério foram lavados em água destilada e contracorados com hematoxilina de Harris.

GRUPO III-Colorações sequenciais

A) Azul de alcian-safranina O (SPICER, 1960)_

1) azul de alcian 8GX a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 30 minutos, seguido de safranina a O 0.1% em ácido acético a 1% pH 2.6, por 5 minutos.

2) azul de alcian 8GX a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 30 minutos, seguido de safranina O a 0.5% em tampão fosfato 0.1M pH 2.0, por 1 minuto.

3) azul de alcian 8GX a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3, por 30 minutos, seguido de safranina O a 0.5% em HCl a 0.4% pH 2.4, por 2 minutos.

B) Azul de alcian-safranina O e safranina O-azul de alcian (MENDONÇA, 1979):

4) azul de alcian 8GX a 1% em ácido acético a 3% pH 2.4. por 30 minutos, seguido de safranina O a 0.3% em HCl 0.125N pH 0.9. por 5 minutos.

5) safranina O a 0.3% em HCl 0.125N pH 0.9. por 5 minutos, seguido de azul de alcian 8GX a 1% em ácido acético a 3% pH 2.4. por 30 minutos.

C) Azul de astra-safranina O e safranina O-azul de astra.

6) safranina O a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3. por 5 minutos, seguido de azul de astra a 0.5% em ácido acético pH 2.3. por 15 minutos.

7) azul de astra a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3. por 15 minutos, seguido de safranina O a 0.5% em ácido acético a 3% pH 2.3. por 5 minutos.

Os fragmentos de mesentério foram lavados em água destilada, durante 10 minutos, sempre que se procedeu troca de soluções corantes.

Após o término das colorações de todos os grupos citados, os fragmentos de mesentério foram lavados em água destilada, distendidos sobre lâminas histológicas e secos em platina aquecida a 45° C. Em seguida, procedeu-se a remoção das faixas de

gordura, desidratação, diafanização e a montagem das lâminas com meio sintético

IV-RESULTADOS

Animais controle

Mesentério dos animais controle fixado em Carnoy (pH 2.8), Alfac (pH 3.5), subacetato de chumbo (pH 4.5), formol acetato de cálcio (pH 6.9) e formol (pH 3.3), foi corado como se segue:

Grupo I- Colorações utilizando um só corante:

-safranina O a 0.5% pH 2.3

Grupo II- Colorações utilizando dois corantes

simultaneamente:

-em todas as colorações

Grupo III- Colorações sequenciais:

-em todas as colorações

Os mastócitos observados nestes fragmentos de mesentério, apresentaram-se repletos de grânulos corados em vermelho, que preenchiam todo o citoplasma (Fig. 1 A).

Grupo I- Colorações utilizando um só corante:

-azul de alcian a 0.5% pH 2.3

-azul de astra a 0.5% pH 2.3

Poucos grânulos citoplasmáticos fracamente corados em azul foram observados, pois na maior parte do citoplasma não foi possível visualizar grânulos (Fig. 1 B e C).

-azul de alcian a 0.05% com $MgCl_2$ 0.3M pH 5.8.

Muitos grânulos corados intensamente de azul e distribuídos por todo o citoplasma, foram observados nos mastócitos controle quando submetidos à este método.

ANIMAIS TRATADOS

GRUPO I

Colorações utilizando um só corante

Fragmentos do mesentério colhidos 24 e 48 horas após a injeção intraperitoneal do composto 48/80, fixados em Carnoy (pH 2.8), subacetato de chumbo (pH 4.5), formol acetato de cálcio (pH 6.9), Alfac (pH 3.5) e formol (pH 3.3), apresentaram os seguintes resultados quando submetidos às colorações abaixo relacionadas:

Com azul de alcian a 0.5% pH 2.3 foram observados nos mastócitos grânulos azuis, pequenos, os quais muitas vezes estavam polarizados. Em algumas células, grande parte do citoplasma se mostrava desprovida de grânulos (Fig. 2 A). No entanto, no período de 48 horas, quando utilizamos azul de alcian a 0.05% com $MgCl_2$ 0.3M pH 5.8, os mastócitos apresentaram muitos grânulos azuis, maiores, sendo que apenas a região perinuclear mostrou-se mais clara (Fig. 2 B).

Utilizando azul de astra a 0.5% pH 2.3 grânulos azuis, pequenos, intensamente corados, foram observados na região

perinuclear, sendo algumas vezes polarizados. Em muitas células, a maior parte do citoplasma não apresentava grânulos corados. Os mastócitos fixados com formol acetato de cálcio foram bem preservados e apresentaram os melhores resultados para esta coloração, em relação aos demais fixadores utilizados (Fig. 3 A e B). Não foram observadas diferenças na coloração dos grânulos, entre os períodos de 24 e 48 horas de ressíntese.

Usando safranina O a 0.5% pH 2.3, após 24 horas, os mastócitos pequenos apresentaram poucos grânulos com uma coloração vermelha menos intensa. Com 48 horas, os grânulos dos mastócitos distribuídos por todo o citoplasma, apresentaram-se corados em vermelho. Em algumas células a região perinuclear apresentou-se mais clara (Fig. 4 A e B).

GRUPO II

Colorações utilizando dois corante simultaneamente

Mesentérico colhido com 24 e 48 horas, fixado com Carnoy (pH 2.8), subacetato de chumbo (pH 4.5), formol acetato de cálcio (pHs 6.9 e 3.3), Alfac (pH 3.5) e formol (pHs 3.3 e 6.9) apresentou os seguintes resultados quando submetido à coloração:

Com azul de astra a 0.5% e safranina O a 0.5% pH 2.3 foram observados mastócitos com duas populações de grânulos: azuis e vermelhos. Na maioria das células, os grânulos azuis eram menores, localizados ao redor do núcleo. Em algumas células, estes grânulos podiam ser observados polarizados. Os grânulos maiores eram frequentemente corados em vermelho e estavam

amplamente distribuídos pelo citoplasma (Fig. 5 A e B). Não houve alteração nos resultados quando modificamos o pH dos fixadores (formol acetato de cálcio pHs 6.9 e 3.3 ; formol pHs 3.3 e 6.9).

Quando foi utilizado azul de alcian a 0.5% e safranina a O a 0.5% pH 2.3 após fixação apenas com Alfac (pH 3.5) e formol (pH 3.3), foram observados mastócitos com duas populações de grânulos, sendo que os grânulos azuis pareciam estar em menor quantidade em relação aos vermelhos. Houve entretanto predomínio de células que continham apenas grânulos vermelhos. Entretanto com os demais fixadores Carnoy (pH 2.8), subacetato de chumbo (pH 4.5) e formol acetato de cálcio (pH 6.9), utilizando ainda estas mesmas colorações, os mastócitos apresentaram somente grânulos vermelhos, maiores, distribuídos pelo citoplasma. Algumas células apresentaram menor número de grânulos, mostrando uma coloração vermelha menos intensa. Não foram encontrados grânulos azuis (Fig. 6).

GRUPO III

Colorações sequenciais

A) Azul de alcian-safranina O (SPICER, 1960)

Mesentério fixado com Carnoy (pH 2.8), subacetato de chumbo (pH 4.5), formol acetato de cálcio (pH 6.9), Alfac (pH 3.5) e formol (pH 3.3) quando corado de acordo com as seguintes condições:

-azul de alcian a 0,5% pH 2.3 seguido de safranina O a 0,1% pH 2.6

-azul de alcian a 0,5% pH 2.3 seguido de safranina O a 0,5% pH 2.0

-azul de alcian a 0,5% pH 2.3 seguido de safranina O a 0,5% pH 2.4

Apresentou mastócitos que continham numerosos grânulos vermelhos, grandes, espalhados pelo citoplasma. Não foram encontrados grânulos azuis.

**B) Azul de alcian-safranina O e safranina O-azul de alcian
(MENDONÇA, 1979).**

Mesentério fixado com Carnoy (pH 2.8) submetido às colorações: azul de alcian a 1% pH 2.4 seguido de safranina O a 0,3% pH 0.9 e safranina O a 0,3% pH 0.9 seguido de azul de alcian a 1% pH 2.4 apresentou somente mastócitos com grânulos vermelhos, distribuídos por todo o citoplasma. Grânulos corados em azul não foram visualizados.

Empregando os fixadores subacetato de chumbo (pH 4.5), formol acetato de cálcio (pH 6.9) e formol (pH 3.3), utilizando as mesmas colorações, a maioria dos mastócitos apresentou apenas grânulos vermelhos, grandes, localizados por todo o citoplasma. No entanto, puderam ser observadas poucas células apresentando grânulos azuis, além dos vermelhos. Os grânulos corados em azul, eram menores, dispostos na região citoplasmática próxima ao núcleo. Mesentério fixado com Alfac (pH 3.5) corado inicialmente

com o azul de alcian seguido de safranina O, apresentou somente mastócitos com grânulos vermelhos que ocupavam todo o citoplasma. Entretanto quando corado com safranina O e posteriormente com azul de alcian, poucos mastócitos com grânulos azuis foram observados, sendo estes menores, quando comparados com os grânulos vermelhos. A maioria dos mastócitos observados apresentou o citoplasma repleto de grânulos vermelhos.

C) Azul de astra-safranina O e safranina O-azul de astra.

Mesentério fixado com Carnoy (pH 2,8), subacetato de chumbo (pH 4,5), formol acetato de cálcio (pH 6,9), Alfac (pH 3,5) e formol (pH 3,3) corado com azul de astra a 0,5% pH 2,3 seguido de safranina O a 0,5% pH 2,3 e safranina O a 0,5% pH 2,3 seguido de azul de astra a 0,5% pH 2,3 apresentou mastócitos que continham poucos grânulos, sendo a maioria corada em azul. Foram também observadas células com um número maior de grânulos, predominando os de coloração vermelha (Fig. 7 A, B e C).

Os resultados dos Grupos I, II e III estão sumarizados respectivamente nas Tabelas I, II e III.

ANIMAIS TRATADOS

GRUPO I

Colorações utilizando um só corante

FIXADORES	CORANTES			
	Azul de alcian	Azul de alcian com $MgCl_2$	Azul de astra	Safranina
Carnoy	A	A	A	V
Sub-acetato de chumbo	A	A	A	V
Formol acetato de cálcio	A	A	A	V
Alfac	A	A	A	V
Formol	A	A	A	V

Legenda-->A -grânulos azuis

V grânulos vermelhos

ANIMAIS TRATADOS

GRUPO II

Colorações utilizando dois corantes simultaneamente

FIXADORES	CORANTES	
	Azul de astra-safraninaO	Azul de alcian-safraninaO
Carnoy	A V	V
Sub-acetato chumbo	A V	V
Formol acetato de cálcio	A V	V
Alfac	A V	A V
Formol	A V	A V

Legenda--> V -grânulos vermelhos

AV-grânulos azuis e vermelhos

ANIMAIS TRATADOS

GRUPO III

COLORAÇÕES SEQUENCIAIS

FIXADORES	CORANTES			
	A.de alcian safranina O (SPICER)	A.de alcian safranina O (MENDONÇA)	Safranina O a.de alcian (MENDONÇA)	A.de astra safranina O Safranina O a.de astra
Carnoy	V	V	V	A V
Sub-acetato de chumbo	V	A V	A V	A V
Formol acetato de cálcio	V	A V	A V	A V
Alfac	V	V	A V	A V
Formol	V	A V	A V	A V

Legenda--> V-grânulos vermelhos

AV-grânulos azuis e vermelhos

FIGURAS

FIG. 1- Mastócitos do mesentério de animais controle submetidos à diferentes colorações.

A-Mastócitos corados com safranina O a 0.5% pH 2.3. repletos de grânulos vermelhos. Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 680x

B-Mastócitos corados com azul de astra a 0.5% pH 2.3. Observar poucos grânulos corados. Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 680x

C-Mastócitos corados com azul de alcian a 0.5% pH 2.3. Notar poucos grânulos azuis nos mastócitos. Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 625x

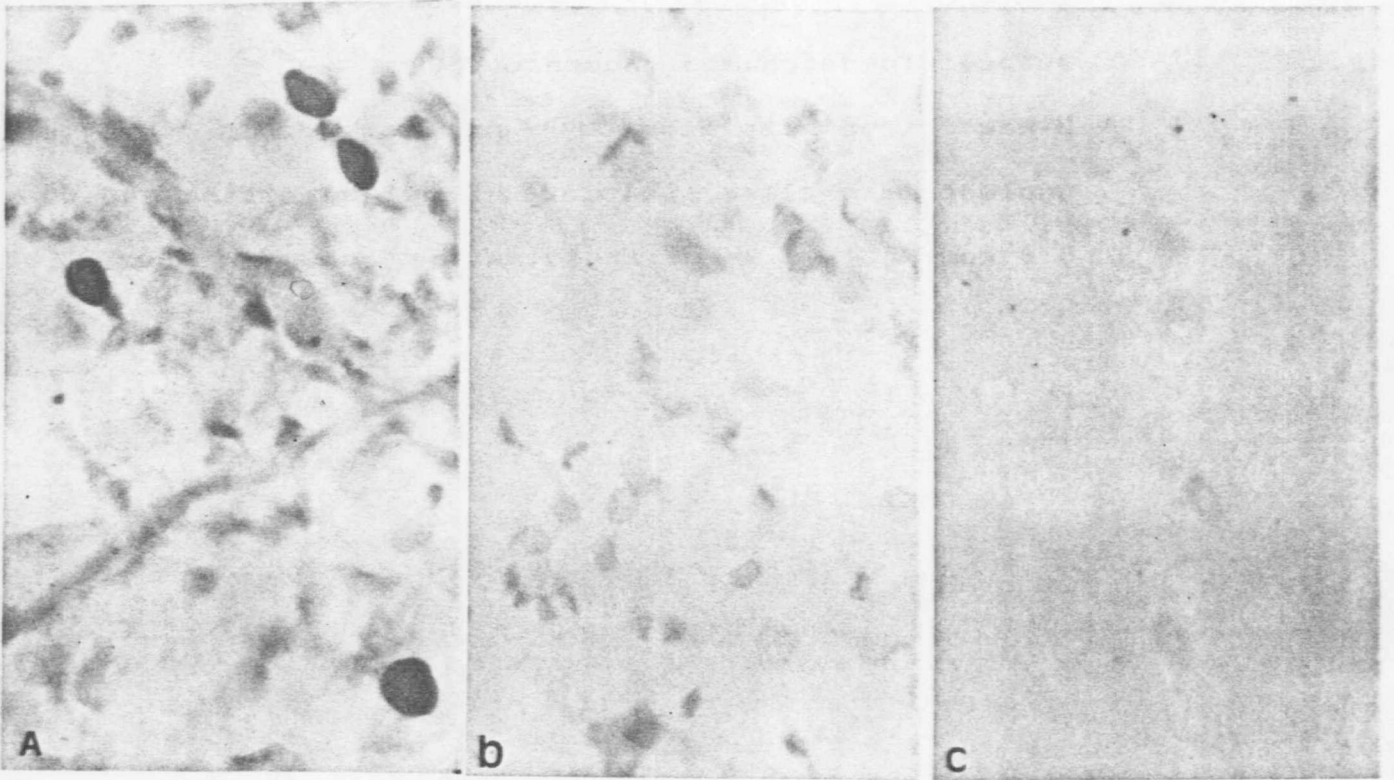


FIG.2- Mastócitos em ressíntese corados com azul de alcian.

A-Mastócitos corados com azul de alcian a 0.5% pH 2.3 contendo grânulos polarizados (setas). Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 500x

B-Mastócitos repletos de grânulos azuis com região nuclear mais clara. Coloração: azul de alcian a 0.05% pH 5.8 com $MgCl_2$ 0.3M. Fixação: Alfac. Aumento: 680x

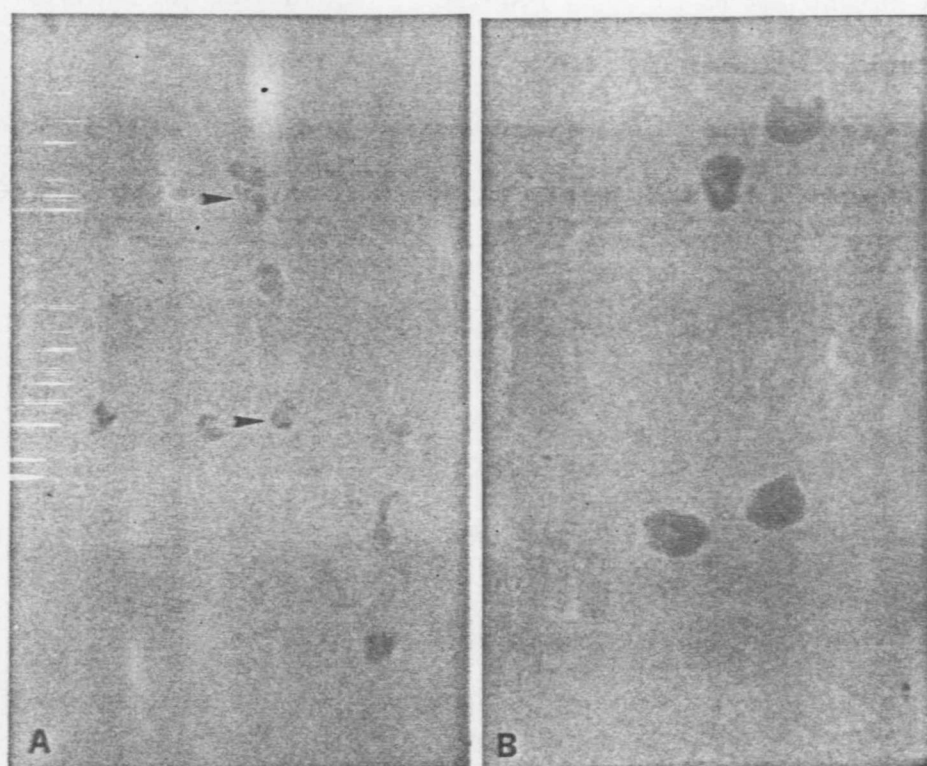


FIG.3- Mastócitos em ressíntese corados com azul de astra a 0.5%
pH 2.3.

A-Mastócitos com grânulos azuis polarizados. Fixação:
Carnoy. Aumento: 500x

B-Mastócitos apresentando poucos grânulos corados.
Fixação: formol acetato de cálcio. Aumento: 1.260x

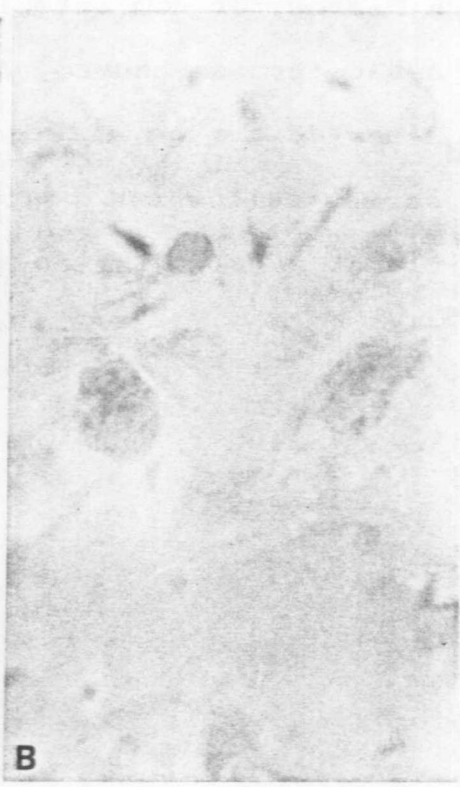
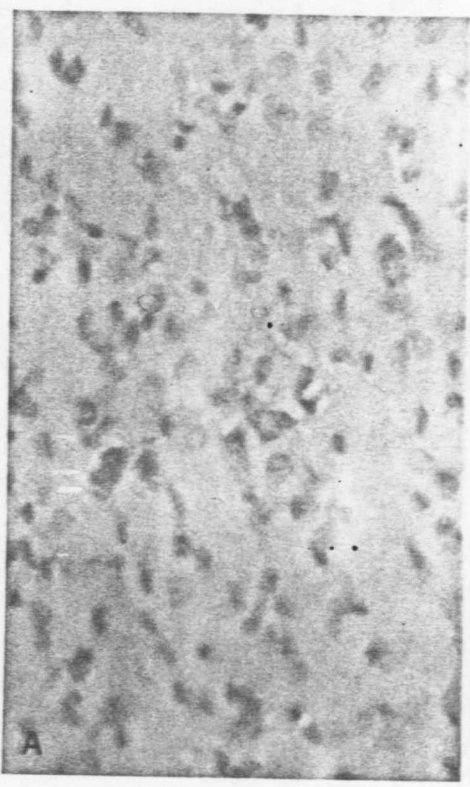


FIG.4- Mastócitos em ressíntese corados com safranina O a 0.5% pH 2.3.

A-Mastócitos com citoplasma repleto de grânulos. Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 1.134x

B-Mastócitos em diferentes fases de ressíntese. Observa-se mastócitos com poucos grânulos apresentando coloração clara (seta). Fixação: formol. Aumento: 500x

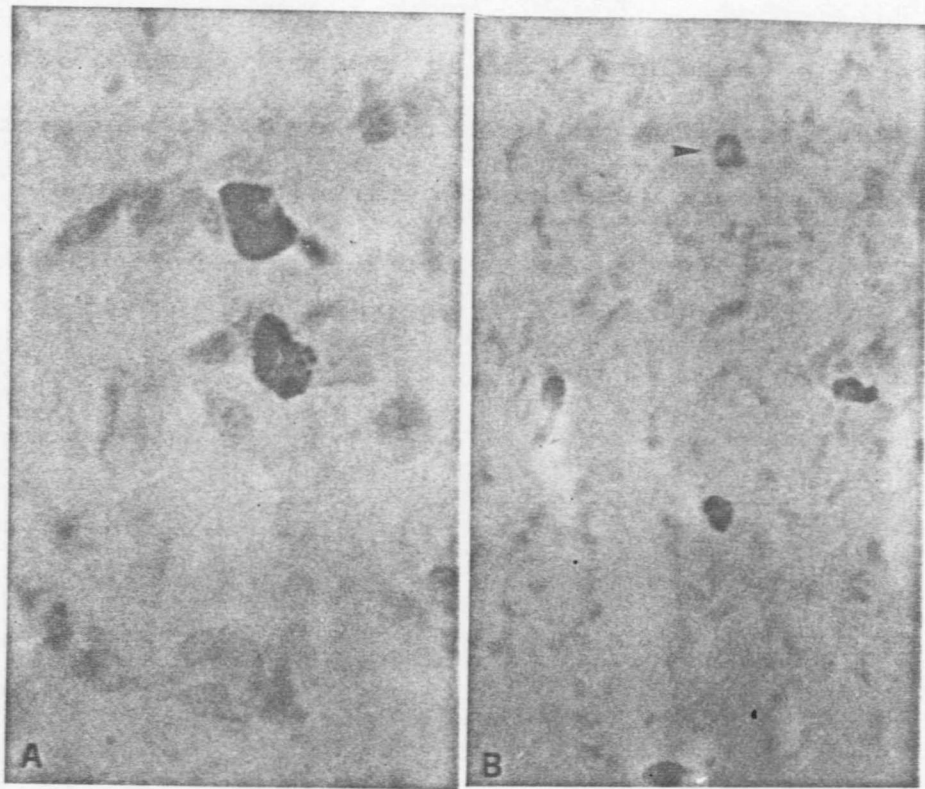


FIG. 5- Mastócitos em ressíntese corados com solução contendo azul de astra a 0.5% e safranina O a 0.5% pH 2.3.

A-Mastócitos apresentando grânulos azuis polarizados (seta) e vermelhos. Fixação: formol. Aumento: 500x

B-Mastócitos em diferentes fases de ressíntese com grânulos azuis (imatuross) e vermelhos (maduros). Fixação: formol acetato de cálcio. Aumento: 1.260x

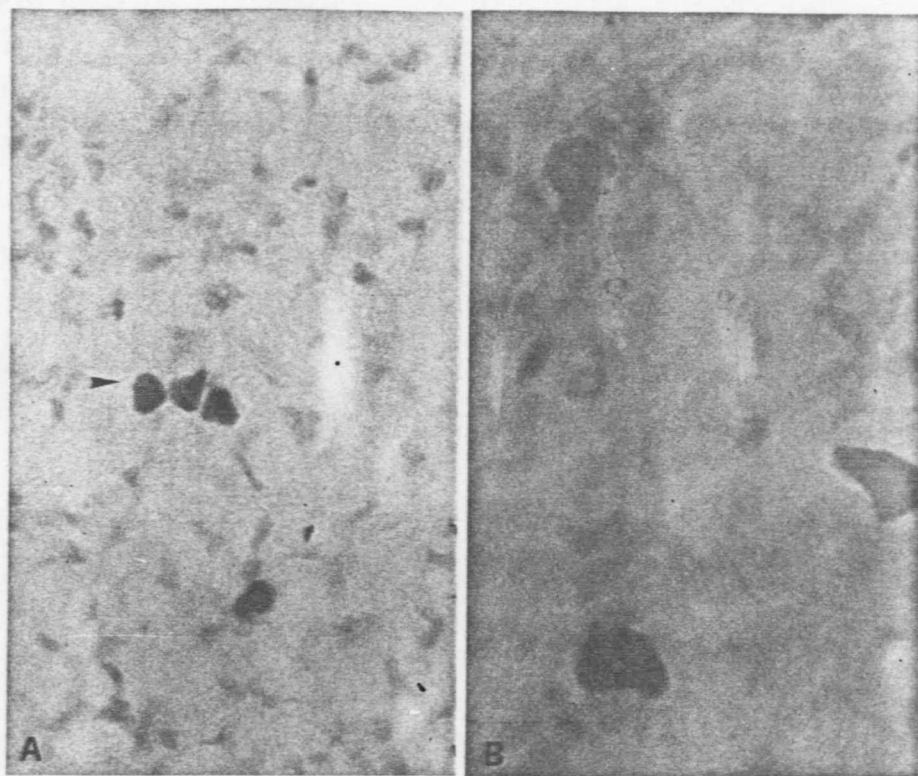


FIG. 6- Mastócitos em ressíntese corados com solução contendo azul de alcian a 0.5% e safranina O a 0.5% pH 2.3. Notar os mastócitos em início de ressíntese apresentando poucos grânulos fracamente corados em vermelho (seta). Fixação: formol acetato de cálcio. Aumento: 500x

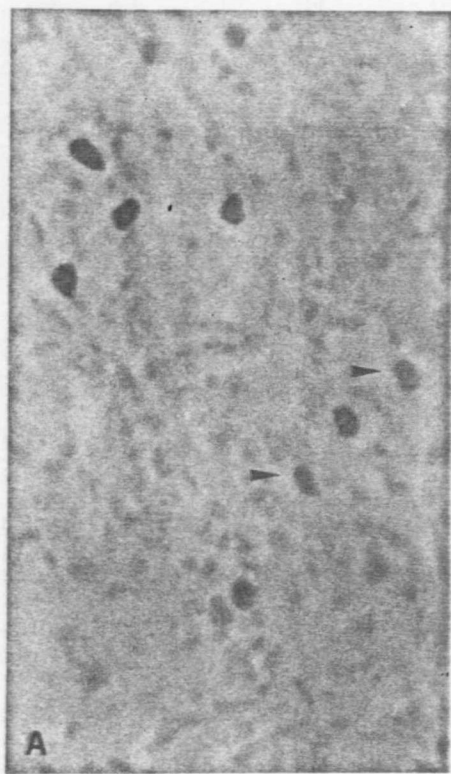
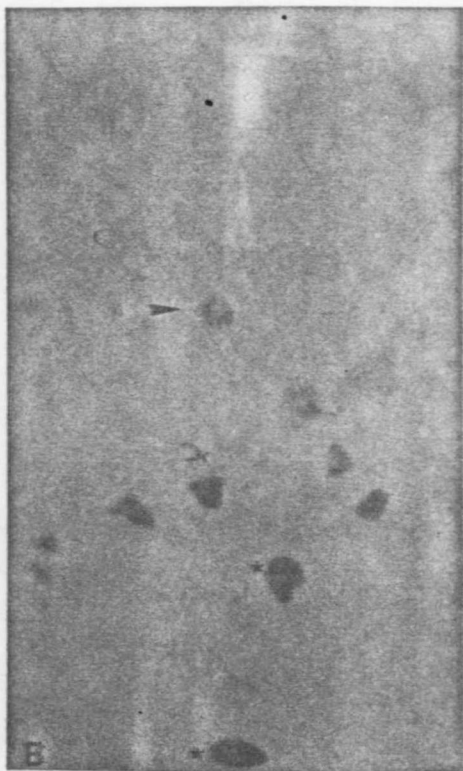
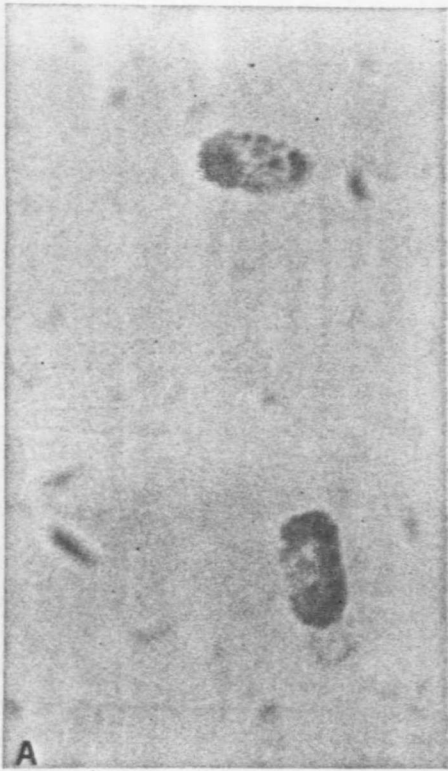


FIG.7- Mastócitos em ressíntese submetidos as colorações sequenciais: azul de astra a 0.5% pH 2.3 seguido de safranina O a 0.5% pH 2.3 ; safranina O a 0.5% pH 2.3 seguido de azul de astra a 0.5% pH 2.3.

A-Mastócitos corados com safranina O-azul de astra. Observar que há predomínio de grânulos azuis nos mastócitos em diferentes fases de ressíntese. Fixação: subacetato de chumbo. Aumento: 1.260x

B-Mastócitos corados com safranina O-azul de astra. Os mastócitos em fase inicial de ressíntese com poucos grânulos, quase todos azuis (seta). Mastócitos repletos de grânulos vermelhos (*). Fixação: formol. Aumento: 500x

C-Mastócitos corados com azul de astra-safranina O com duas populações de grânulos: imaturos (azuis) e maduros (vermelhos). Fixação: formol. Aumento : 1.400x



V-DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram boa preservação dos grânulos dos mastócitos com todos os fixadores utilizados. Não observamos diferenças entre fixadores aquosos como o formol e o formol acetato de cálcio, ou alcoólicos como os demais fixadores utilizados. Na grande maioria das espécies, os grânulos de mastócitos são mal preservados em fixadores aquosos, os quais facilitam a dissolução da matriz granular. No rato, os grânulos são bem preservados com estes fixadores, talvez pelo fato de que a proteoglicana presente nos grânulos de mastócitos, possua peso molecular pelo menos 10 vezes maior do que a encontrada em outras espécies. Porém, o teor de proteínas da proteoglicana é inferior ao encontrado frequentemente em outras espécies (HORNER, 1977). Essas características devem ser as responsáveis pela preservação das proteoglicanas mesmo em fixadores aquosos. A fixação tem como objetivo preservar a estrutura da proteoglicana granular, tornando os grupos aniônicos da glicosaminoglicana, disponíveis para a ligação com os corantes catiônicos (ENERBACK et al, 1986).

Vários métodos de coloração podem ser utilizados para visualizar as glicosaminoglicanas, presentes nos grânulos dos mastócitos, mediante a ligação de seus grupos aniônicos aos corantes catiônicos. A especificidade do método de coloração é aumentada pelo uso de corantes metacromáticos ou pelo uso da

solução corante em pH baixo , a fim de que a coloração de outros locais aniônicos possa ser suprimida (ENERBACK et al. 1986). O azul de alcian (em pH baixo) pode ser usado isoladamente ou em coloração sequencial com a safranina O, diferenciando mastócitos de tecido conjuntivo (corados em vermelho) de mastócitos de mucosa (corados em azul), em rato e camundongo. A diferença histoquímica da coloração, reflete a diferença de glicosaminoglicanas existentes nestes dois tipos de células, ou seja, heparina nos mastócitos de tecido conjuntivo e sulfato de condroitina nos mastócitos de mucosa (ENERBACK et al. 1985). Além do azul de alcian, outro corante com propriedades semelhantes como o azul de astra, pode ser empregado para caracterizar mastócitos.

BLOOM e KELLY (1960) realizando um estudo comparativo das propriedades de coloração do azul de astra com o azul de alcian, constataram que o azul de astra é mais específico, pois não cora o núcleo, também apresenta boas propriedades de coloração em pH baixo, não necessitando um tempo longo para coloração. BURTON (1964) e SASAKI (1980) usaram azul de astra associado com a safranina O em solução, para diferenciar mastócitos maduros (safranina O positivos) e imaturos (azul de astra positivos). Segundo estes autores estes dois corantes foram usados à 0.5% na solução final, mas em volumes diferentes, pois o azul de astra foi usado em um volume 50 vezes maior que a safranina O. Considerando que o azul de astra é tetracatiônico, tem portanto

maior dificuldade para se ligar às proteoglicanas, dos grânulos de mastócitos, em relação a safranina O que é monocatiônica. A utilização destes corantes nestas proporções, deve ter sido a responsável pela afinidade seletiva dos grânulos imaturos ao azul de astra.

Os fixadores não interferiram nos resultados, quando usamos os corantes catiónicos azul de astra e safranina O na mesma solução ou em colorações sequenciais. Os resultados permaneceram inalterados mesmo quando variamos o pH dos fixadores. Foi possível diferenciar os grânulos imaturos, corados em azul, dos maduros, corados em vermelho. Entretanto, os grânulos foram melhor identificados no seu processo de maturação, quando usamos estes corantes numa mesma solução. Pois segundo BURTON (1964) esta técnica diminui a incidência de variações que possam ocorrer, tais como tempo de coloração, temperatura e pH dos corantes, as quais podem interferir nos resultados finais.

Nossos achados demonstraram que os mastócitos do mesentério corados com azul de astra e safranina O apresentaram duas populações de grânulos durante o processo de ressíntese. Uma população constituída de grânulos azuis menores, localizados ao redor do núcleo, polarizados, e outra com grânulos maiores corados em vermelho e distribuídos pelo citoplasma, quando as células se encontravam em estádios mais avançados de ressíntese dos seus grânulos.

Os fragmentos de mesentério fixados com Alfac ou Formol e corados com azul de alcian-safranina O. apresentaram poucos mastócitos com grânulos azuis e vermelhos. porém, a maioria apresentou somente grânulos vermelhos. Quando utilizamos o azul de alcian e a safranina O em colorações sequenciais segundo SPICER (1960). todos os mastócitos apresentaram grânulos vermelhos. independente do fixador empregado. Isto indica que este método de coloração não é aconselhável para diferenciar grânulos imaturos de maduros. pois os mastócitos em ressíntese apresentam grânulos imaturos (JAMUR ; VUGMAN 1988). Mastócitos fixados com Carnoy e corados segundo MENDONÇA (1979). apresentaram grânulos corados apenas pela safranina O. Porém utilizando subacetato de chumbo, formol acetato de cálcio e formol. algumas células apresentaram grânulos azuis. além dos vermelhos. embora estes fossem predominantes. Nos mastócitos fixados com Alfac. foram observados grânulos azuis somente quando o azul de alcian foi usado após a safranina O. Estas evidências sugerem que o método utilizado é fortemente influenciado pelo fixador empregado. SPICER (1963) também discute a interferência dos fixadores nas colorações demonstrando que mastócitos de rato fixados com Carnoy. apresentam grânulos com maior afinidade pelo azul de alcian do que quando fixados com Formol. MENDONÇA (1979) demonstrou falta de afinidade dos mastócitos pelo azul de alcian. sempre que usou Carnoy como fixador. TAS (1977) observou que a coloração final dos mastócitos. após o uso dos corantes azul de

alcian e safranina O. parece ser influenciada pela fixação empregada.

Comparando os resultados obtidos após o uso dos corantes tetracatiônicos azul de astra e azul de alcian, em presença de safranina O, pode-se notar maior afinidade dos grânulos imaturos pelo azul de astra, o que permite a identificação destes grânulos em estadios iniciais de formação tanto em colorações mistas como em sequenciais. Não houve interferência dos fixadores, mesmo que o azul de astra fosse utilizado antes ou após a safranina O, nas colorações sequenciais. Assim sendo, não se observou alteração dos resultados quanto à caracterização dos grânulos imaturos.

Para testar a afinidade seletiva dos grânulos imaturos ao corante tetracatiônico (azul de alcian), e dos maduros a um corante monocatiônico, utilizamos o azul de alcian na presença de eletrólitos ($MgCl_2$ 0.3M). Este procedimento torna o corante monocatiônico, ficando relativamente específico para poliânions sulfatados, onde os grupos carboxilados e fosfatados permanecem descoloridos (SCOTT, 1980). Desta forma, observou-se um maior número de grânulos nos mastócitos e mais intensamente corados, quando comparados com os resultados obtidos na ausência deste sal. Este resultado indica que os grânulos mais maduros, presentes neste estadio, puderam ser evidenciados pelo corante, quando este tornou-se monocatiônico. Estes grânulos maduros não eram detectados pelo corante tetracatiônico. Em presença de íons difusíveis (Cl^-), três dos quatros grupos catiônicos do corante

podem ser neutralizados. Portanto a molécula de azul de alcian com um único grupo catiónico disponível, pode combinar-se somente com um grupo aniônico. Conseqüentemente, o corante comporta-se como monocatiônico, proporcionando uma coloração mais intensa, pelo melhor acesso. Portanto, a concentração eletrocritica pode ser usada para estimar afinidades entre o complexo substrato-corante. Isto sugere que o número de cargas catiónicas, seja mais importante do que o peso molecular do corante o que justifica sua maior penetração nas células quando na presença de sais.

Usando o corante monocatiônico safranina O, 24 horas após a ação do desgranulante, observamos grânulos fracamente corados (imaturos) ao lado de grânulos intensamente corados (maduros). Isto indica que neste tempo, já se identifica grânulos maduros nos mastócitos em ressíntese. Com 48 horas, os mastócitos eram semelhantes às células não estimuladas, apresentando grânulos safranina O positivos. De acordo com JAMUR (1986), com 72 horas após o estímulo secretor, o processo da ressíntese já se encontra completo.

A mudança de coloração nos grânulos de azul (imaturos) para vermelho (maduros) observada durante a maturação dos mastócitos foi descrita por SPICER (1960) após a coloração sequencial com azul de alcian e safranina O. O autor sugere que esta coloração é capaz de diferenciar os mucopolissacarídeos altamente sulfatados (corados em vermelho) e fracamente sulfatados (corados em azul). TAS (1977) contestou a coloração sequencial descrita por SPICER

(1960). no sentido de que ela não possui especificidade histoquímica para indicar o grau de sulfatação das glicosaminoglicanas, por sofrer influência da fixação. Os achados de MENDONÇA (1979) corroboraram com os resultados de TAS (1977) indicando que além da influência dos fixadores, o tempo de coloração pelo azul de alcian também influenciou decisivamente na coloração dos mastócitos. Nossos resultados também indicaram que os fixadores alteram a coloração dos grânulos mastócitos em ressecamento, quando usamos azul de alcian e safranina O, em solução e em coloração sequencial. BURTON (1964), descreveu esta mudança de cor nos mastócitos em maturação, como sendo relacionada a um progressivo aumento do número de grupos acídicos no polissacarídeo. De acordo com COMBS et al. (1965), esta mudança de coloração era devido a um processo de ativa sulfatação que estaria ocorrendo nas moléculas de heparina, no interior dos grânulos dos mastócitos. No entanto, FARQUHARD e PALADE (1981) demonstraram que a proteoglicana sofre uma sulfatação precoce, ou seja, ainda no complexo de Golgi. Desta forma, a maturação não poderia implicar em um aumento de radicais sulfato por molécula de heparina, a qual se constituiria em uma glicosaminoglicana fortemente sulfatada como proposto por COMBS (1965). A alteração da cor nos grânulos dos mastócitos, não está ligada ao grau de sulfatação da proteoglicana, mas pode ser devido ao número total de radicais sulfato livres, presentes em quantidades diferentes nos grânulos imaturos e maduros (SASAKI, 1980). Assim, os métodos de coloração utilizados por BURTON (1964) e por SASAKI (1980),

para caracterizar grânulos imaturos de mastócitos durante o processo de maturação, também se mostraram eficientes, confirmando os resultados obtidos, possibilitando a identificação de grânulos imaturos no início do processo de ressíntese, após a desgranulação. De forma semelhante a dos mastócitos em maturação, a célula em ressíntese também possui grânulos imaturos pequenos, onde provavelmente existam poucos radicais sulfato livres, os quais só podem ser detectados por corantes tetracatiônicos (azul de astra). Como estes grânulos amadurecem por fusão (COMBS, 1966), conseqüentemente haverá um aumento destes radicais sulfato, os quais passam a ser detectados por um corante monocatiônico como a safranina O. Isto explicaria o fato dos grânulos recém sintetizados apresentarem cor azul e os maduros cor vermelha.

VI-CONCLUSÕES

1)As técnicas de colorações utilizando azul de alcian e safranina O são susceptíveis à ação de alguns fixadores.

2)As colorações utilizando azul de astra e safranina O não foram afetadas pelo fixador. Os mastócitos em ressintese sempre apresentaram grânulos azuis e vermelhos.

3)A variação do pH de um mesmo fixador não interfere na coloração utilizada.

4)O corante azul de astra mostrou-se mais específico do que o azul de alcian.

5)O azul de astra e a safranina O quando utilizados na mesma solução, diferenciam melhor grânulos imaturos (azuis) de maduros (vermelhos) de mastócitos em ressintese, do que quando usados em coloração sequencial.

VII-SUMMARY

Resynthesis of mast cell granules was analysed in rat mesentery, 24 and 48 hours after intraperitoneal injection of degranulating agent 48/80.

In order to characterize the newly formed granules and describe their maturation steps, fragments of mesentery were treated with several different fixatives and stains. Cationic dyes Alcian blue, Astra blue and Safranin O were used alone or in combinations and under different pH conditions. These dyes react specifically with the anionic sites of heparin, a sulfated glycosaminoglycan present in mast cell granules.

The use of Astra blue and Safranin O together revealed that immature granules stain blue and mature granules stain red, independent of fixative and pH conditions, in most of the cases. However when Alcian blue and Safranin O were used together the differentiation of the degrees of maturation was dependent upon the fixative employed.

Twenty four hours after the degranulating, the newly formed granules were small and often concentrated around the nucleus or polarized in the cell; because of their affinity for tetracationic dyes (Astra blue and Alcian blue) they stained blue.

The mature granules, on the other hand, were bigger and usually spread out, due to their affinity for Safranin O, they stained red.

Forty-eight hours after injection of agent 48/80, it was seen that the test mast cells were full of mature granules, like the control mast cells.

The results of this investigation suggest that the changing of colors of granules is a consequence of accumulation of sulfate groups after aggregation of sulfated glycosaminoglycans that happens during granule maturation.

VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDITT, E.P.; WONG, R.L.; ARASE, M.; ROEPER, E. 5-hydroxytryptamine in mast cells. *Proc. Soc. Biol. Med.*, v. 90, p. 303-304, 1955.
- BLOOM, G.D.; KELLY, J. W. The copper phthalocyanine dye Astrablau and its staining properties specially the staining of mast cell. *Histochem.* v. 2, p. 48-57, 1960.
- BURTON, A.L. Histochemical studies on developing mast cells. *Anat. Rec.* v. 150, p. 265-269, 1964.
- CHI, E.Y.; IGNÁCIO, E.; LAGUNOFF, D. Mast cell granule formation in the beige mouse. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 26, p. 131-137, 1978.
- COMBS, J.W. Maturation of rat mast cells. An electron microscope study. *J. Cell Biol.*, v. 31, p. 563-575, 1966.
- COMBS, J.W.; LAGUNOFF, D.; BENDITT, E. P. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J. Cell Biol.*, v. 25, p. 577-592, 1965.
- CZARNETZKI, B.M.; HANNICH, D.; NIEDORF, H. In vitro studies on the development of rat peritoneal mast cell. *Imunobiol.*, v. 156, p. 470-476, 1979.
- EHRlich, P. Beitrage zur Kenntnis der granulierten Ndegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten. *Arch. Anat. Physiol.*, v. 3, p. 166-169, 1879.

- ENERBACK, L. Berberine sulphate binding to mast cell polyanions. A cytofluorometric method for the quantitation of heparin. *Histochemistry*, v. 42, p. 301-313, 1974.
- ENERBACK, L.; KOLSET, S.O.; KUSCHKE, M.; HJERPE, A.; LINDAHL, U. Glycosaminoglycans in rat mucosal mast cells. *Biochem.*, v. 227 p. 661, 1985.
- ENERBACK, L.; MILLER, H.R.P.; MAYRHOFER, G. Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy. In: BEFUS, A.D.; BIENENSTOCK, J.; DENBURG, J.A. *Mast Cell Differentiation and Heterogeneity*. New York, Raven Press, 1986, p. 405-417.
- ENNIS, M.; PEARCE, F.L. Differential reactivity of isolated mast cell from the rat and guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 66, p. 339-345, 1980.
- FARQUHARD, M.G.; PALADE, G.E. The Golgi apparatus (complex) (1954-1981)-from artifact to center stage. *J. Cell Biol.*, v. 123, p. 26-52, 1981.
- FASSKE, E. Zur Darstellung der sauren Mucopolysaccharide im Bereich der Zwischensubstanz mesenchymaler Gewebe. *Zbl allg Path. path. Anat.*, v. 97, p. 174-179, 1957.
- FAWCETT, D.W. An experimental study of mast cell desgranulation and regeneration. *Anat. Rec.*, v. 121, p. 29-43, 1955.
- GALLI, S.J.; DVORAK, H.F. Basophils and mast cells: Morphologic insights into their biology, secretory patterns, and function. In: ISHIZAKA, K. *Mast cell activation and mediator release*. *Prog. Allergy*, v. 34, p. 1, 1984.

- GALLI, S.J. New insights into "The riddle of the mast cell": microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab. Inv.*, v. 62, p. 5-33, 1990.
- GEDICK, P. Uber neue Farbeverfahren fur Mukopolysaccharide und Phospholipide. *Zbl. allg. Path. path. Anat.*, v. 95, p. 486, 1956.
- HORNER, A.A. The concept of macromolecular heparin and its physiological significance. *Fed. Proc.*, v. 36, p. 35-39, 1977.
- JAMUR, M.C. **Estudo ultraestrutural e citoquímico de mastócitos peritoneais de rato durante a maturação e a regranulação após estímulo secretor.** Tese de doutorado, em Ciências, USP, 1986.
- JAMUR, M.C.; VUGMAN, I. Rat peritoneal mast cell regranulation and acid phosphatase and trimetaphosphatase activity induced after stimulation by 48/80. *Cell. Mol. Biol.*, v. 34, p.231-237, 1988.
- JOHNSON, A.R., MORAN, N.C. Seletive release of histamine from rat mast cell by compound 48/80 and antigen. *J. Physiol.* p. 453-459, 1969.
- JORPES, E; HOLMGREN, H.; WILANDER, D. Uber das Vorkommen von Heparin in den Gefaswader und in den Augen. *Z. Mikrosk Anat. Forsch.*, v. 42, p. 279-301, 1937.
- KITAMURA, Y.; MATSUDA, H.; HATANAKA, K. Clonal nature of the mast cell clusters formed in W/W mice after bone marrow transplantation. *Nature*, v. 281, p. 154-155, 1979.

- MENDONÇA, V.O. **Estudo histoquímico da coloração sequencial azul de alcian-safranina em mastócitos de rato**. Tese de Mestrado da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, 1979.
- MENDONÇA, V.O.; VUGMAN, I.; JAMUR, M.C. Maturation of adult rat peritoneal and mesenteric mast cell. A morphological and histofluorescence study. *Cell Tiss Res.*, v. 243, p. 635-639, 1986.
- MOWRY, R.W.; WINKLER, Ch.H. The coloration of acidic carbohydrates of bacteria and fungi in tissue sections with special reference to capsules of cryptococcus neoformans and staphylococci. *Am. J. Path.*, v. 32, p. 638, 1956.
- MOWRY, R.W. Revised method producing improved coloration of acidic polysaccharides with Alcian blue 8GX supplied currently. *J. Histochem. Cytochem.*, v. 8, p. 323-234, 1960.
- PEARCE, F.L.; Funcionan heterogeneity of mast cell from different species and tissues. *Klin. Wochenschr.*, v. 60, p. 954, 1982.
- PIOCH, W. Uber die Darstellung saurer Mucopolysaccharide mit dem Kupferphthalocyaninfarbstoff Astrabau. *Virchows Arch. path. Anat.*, v. 330, p. 337-346, 1957.
- RILEY, J.F. Histamine in tissue mast cells. *J. Physiol.*, v. 177, p. 72, 1952
- ROHLICH, P.; ANDERSON, P.; UVNAS, B. Electron microecope observation on compound 48/80 induced desgranulation in rat mast cells. Evidence for sequential exocytosis of storage granules. *J. Cell Biol.*, v. 51, p. 456-483, 1971.
- ROTHENBERG, M.E.; AUSTEN, K.F. Influence of the fibroblast

- environment on the structure of mast cell proteoglycans. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 556, p. 233-244, 1989.
- SASAKI, T. Light and electron microscopic studies on tissue mast cells in the tongue. *Okagimas Polin Anat. Jpn.*, v. 57, p. 129-44, 1980.
- SCHWARTZ, L.B.; AUSTEN, K.F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. In: Ishizaha K. *Mast cell activation and mediator release*. Basel, Karger, 1984, p.257-268.
- SCOTT, J.E.; QUINTARELLI, G.; DELLOVO, M.C. The chemical and histochemical properties of alcian blue. *Histochemic.* v. 4 p. 73-85, 1964.
- SIRAGANIAN, R.P. Mast cells and basophils. In: GALLIN, J.I.; GOLDSTEIN, I.M.; SNYRDERMAN, R. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York, Raven Press, p. 513-542, 1988.
- SPICER, S.S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. *J. Histochem.Cytochem.*,v. 8, p. 8-33, 1960.
- SPICER, S.S. Histochemical properties of mucopolysaccharide and basic protein in mast cell. *Ann. N.Y.Acad.Sci.*, v. 103, p. 322-333, 1963.
- TAINSH, K.R.; PEARCE, F.L. Mast cell heterogeneity: evidence that mast cell isolated from various connective tissue locations in the rat display markedly graded phenotypes. *Int. Arch. Allergy Immunol.*,v. 98, p. 26-34, 1992.

TAS. J. The alcian blue and combined alcian blue-safranina O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. *Histochem.*, v. 9, p. 205-230, 1977.