

2. 1. 2. 1. 6. 10/10/68
OSMAR JOSÉ BENEDICTO HADLER DE LUCCA

ESTUDO DO MECANISMO
DAS "TÉCNICAS RÁPIDAS" DE
IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

Tese apresentada ao Instituto
Central de Biologia, da Univer
sidade de Campinas, à obtenção
do grau de Doutor em Ciências

CAMPINAS - 1968

UNIVERSIDADE DE CAMPINAS
Biblioteca Central

A realização de trabalhos científicos é, em nosso meio, tarefa ingrata e, muitas vezes, até impossível. Sòmente aquêles que labutam na pesquisa são capazes de avaliá-la. Necessitamos recorrer da ajuda e da boa vontade de inúmeras pessoas que, pelo entusiasmo, dedicação e estímulo constante nos tornam seus eternos devedores. Neste particular desejamos agradecer ao caro PROF. DR. WALTER AUGUST HADLER que não só nos orientou neste trabalho, trazendo sua longa experiência, como também nos guiou na nossa formação científica acompanhando nosso aprendizado e tudo nos facilitando.

Agradecemos sinceramente, também, aos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração do presente trabalho.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
PARTE I - Estudo da correlação entre a intensidade da argentofilia e o grau de reatividade química dos tecidos.....	7
Introdução	7
Material e métodos.....	9
Resultados.....	13
Gráficos.....	16
Tabelas.....	26
Discussão.....	30
PARTE II - Importância da presença do íon férrico na impregnação argêntica pelas técnicas rápidas.....	35
Introdução.....	35
Material e métodos.....	38
Resultados.....	42
Gráficos.....	45
Tabelas.....	48
Discussão.....	49
CONCLUSÃO.....	52
BIBLIOGRAFIA	54

ESTUDO DO MECANISMO DAS "TÉCNICAS RÁPIDAS" DE IMPREGNAÇÃO PELA PRATA

Os sais simples e os complexos de prata são largamente usados, tanto em histoquímica, onde atuam como reativos de grupos redutores, quanto em histologia, devido à propriedade de impregnarem, seletivamente, algumas estruturas. Os métodos de impregnação argêntica, embora diferentes entre si, têm como característica comum a formação de precipitado de prata metálica. Dentre esses métodos podem ser distinguidos, segundo CORDIER (1927), dois grandes grupos:

a) Métodos diretos, nos quais o tratamento pelos íons Ag^+ , ou $\text{Ag}(\text{NH}_3)_2^+$, sem o uso posterior de qualquer agente redutor, determina a formação de precipitado de prata metálica. Estes métodos revelam a argentafinidade e o mecanismo da reação consiste de redução do composto de prata por um grupo redutor, presente nas estruturas correspondentes.

b) Métodos indiretos, nos quais há necessidade de tratamento sucessivo por agente redutor, para ocorrer a precipitação de prata metálica. A impregnação argêntica, determinada por estes métodos, caracteriza a argentofilia. Esta propriedade, não obstante apresentar grande interesse prático, não é bem conhecida quanto ao seu significado e quanto ao mecanismo responsável pela sua ocorrência.

Os métodos indiretos são mais conhecidos com o nome de "técnicas de impregnação argêntica". São numerosos e apresentam diferenças relacionadas com a finalidade a que se destinam. Dentre estas diferenças salientam-se as seguintes: 1) tempo de tratamento pelo complexo solúvel de prata; 2) necessidade de pré tratamento de natureza diversa; 3) natureza química do complexo solúvel de prata empregado.

No que diz respeito ao tempo de tratamento pelo complexo solúvel de prata, as técnicas de impregnação argêntica foram divididas, por RIO HORTEGA (1943), em dois grandes grupos: 1) técnicas rápidas, nas quais o tempo de tratamento varia, geralmente, entre 5 e 15 segundos, podendo atintir até 2 ou 3 minutos; 2) técnicas lentas, nas quais o tratamento pelo complexo de prata é geralmente superior a 15 minutos.

As técnicas rápidas de impregnação argêntica são usadas com a finalidade de impregnarem células do S.R.E. (especialmente macrófagos e células da microglia), além de alguns elementos celulares que ocorrem nos processos inflamatórios. As técnicas lentas de impregnação argêntica são usadas com finalidades diversas, dentre as quais se destaca a impregnação de fibras conjuntivas e nervosas, de neurônios e de células da macroglia.

Dentre as técnicas rápidas de impregnação argêntica, as usadas com a finalidade de impregnar, seletivamente, macrófagos de tecidos normais, ou atingidos por inflamação, são efetuadas mediante breve tratamento por solução de complexo de prata (RIO HORTEGA, 1919, 1943; MARSHALL, 1948; POLAK, 1956; HADLER, 1962). Estas técnicas serão consideradas em conjunto, no presente trabalho, sob a denominação de "técnicas rápidas" de impregnação argêntica.

Em geral, admite-se, para explicar o mecanismo da impregnação argêntica, que o complexo solúvel de prata seria adsorvido, seletivamente, pelas estruturas tissurais dotadas de argentofilia, formando "complexos argênticos facilmente redutíveis" (CAJAL, 1903; BOLSI, 1927).

LIESEGANG (1911) sugeriu que haveria semelhança entre a impregnação argêntica e o processo fotográfico. Segundo este autor haveria, primeiramente, formação de um núcleo de prata, análogo ao que se forma na chapa fotográfica excitada pela luz. O núcleo primário seria formado pela redução de pequena quantidade de prata, decorrente da presença de agentes redutores, contidos nos tecidos, atuaria como um verdadeiro núcleo, em torno do qual haveria deposição de prata, posteriormente reduzida pelo agente revelador.

A deposição de prata reduzida, ao redor do núcleo primário, sugerida por LIESEGANG (1911) para explicar o processo de impregnação argêntica, foi também admitida por CAJAL (1921), VISINTINI (1931), ZON (1936), SILVER (1942), HOLMES (1943), PALMGREN (1948), ROMANES (1950), SAMUEL (1953a, 1953b) PETERS (1955a, 1955b, 1955c), WOLMAN (1955a) e DAVID (1960).

Por analogia com o mecanismo da revelação fotográfica, foi sugerido que o núcleo primário de prata tivesse carga elétrica negativa (PALMGREN, 1948), agindo como grupo polar (JAMES & HIGGINS, 1948), ao qual o íon prata poderia ligar-se eletrostáticamente.

A formação dos núcleos primários de prata reduzi-

da, nas estruturas argentófilas, tem sido relacionada com a presença de grupos redutores contidos por estas estruturas. PALMGREN (1948) supôs que a formação desses núcleos dependia, sobretudo, do potencial de oxi-redução das estruturas tissurais, estando relacionada, especialmente, com a presença e quantidade de grupos redutores, dentre os quais salientou o grupo carbonila e o sulfidrila. ROMANES (1950) e WOLMAN (1955a) consideraram o grupamento carbonila como o mais importante; todavia, ao grupo S-H (sulfidrila) também foi atribuída ação eficaz na formação dos núcleos primários, por ter sido verificado paralelismo entre a impregnação argêntica das fibras nervosas e suas propriedades redutoras, demonstráveis através da reação do ferricianeto férrico (WOLMAN, 1955b). Na fibra nervosa, presumiu-se que os grupamentos sulfidrila e carbonila fossem responsáveis pela impregnação argêntica do axoplasma; entretanto, a impregnação do axolema dependeria da presença de grupo não identificado (WOLMAN, 1955b). Apoiando-se nestes resultados, BRYAN & col. (1964) apresentaram método de impregnação argêntica para demonstração de DNA, aplicável à microscopia eletrônica.

PETERS (1955a) sugeriu que a prata poderia ser convertida em núcleo primário de prata reduzida por um processo de "redução física", o que excluiria a necessidade da presença de grupos químicos com atividade redutora, para que ocorresse a formação de núcleos primários de prata.

Tem sido verificado que nos tecidos submetidos à impregnação argêntica, além dos núcleos de prata reduzida, existe, também, prata não reduzida, que se apresenta combinada com proteínas tissurais. PETERS (1955a, 1955c) admitiu duas formas diferentes de combinação entre os íons Ag^+ e as estruturas tissurais; a maior parte da prata (cerca de 85%) combinar-se-ia com os tecidos sob a forma não reduzida; apenas aproximadamente 15% da prata combinada com os tecidos se apresentaria sob a forma reduzida. Esta última representaria os núcleos primários de prata, sobre os quais haveria deposição de metal reduzido, proveniente da ação do revelador (PETERS 1955a, 1955c). WOLMAN (1955a), baseado em evidências obtidas através da experimentação, também admitiu que parte da prata combinada com os tecidos se apresentaria sob forma reduzida e parte sob forma de proteinato de prata. A forma reduzida resultaria da ação direta de grupos redutores sobre o composto solúvel de prata e constituiria os núcleos primários. O proteinato de prata, que

contém íon Ag^+ , quando reduzido pela ação da solução redutora, se depositaria em torno dos núcleos primários. No entanto, DAVID, MELLION & BROWN (1960) consideram que, nas impregnações argênticas, a prata combinada, provavelmente com aminoácidos terminais das cadeias peptídicas, também atuaria como núcleo primário.

Admite-se que a prata combinada com os tecidos, sob a forma não reduzida, poderia estar ligada à proteínas básicas (WILLIS, 1945), dotadas de aminoácidos contendo grupos polares. Dentre os aminoácidos com esta característica, a histidina tem sido considerada como o mais importante, em virtude do seu grupo imidazol (PETERS, 1955a, 1955b).

A importância do grupo imidazol na ligação de metais com proteínas, constituindo complexo metalo-proteico, foi assinalada por diversos autores (WORMSER, 1951; GRASSMANN & KUSH, 1952; GURD & col., 1952; TANFORD, 1952; SAROFF & col. 1953; RAO & col. 1958a, 1958b). WORMSER (1951), trabalhando com sêro-albumina, verificou haver correlação entre o teor de histidina e a quantidade de prata ligada à proteína, sob forma de complexo metalo-proteico. GRASSMAN & KUSH (1952) encontraram correlação entre a prata combinada com proteína do colágeno e a quantidade de histidina presente nessas proteínas. PETERS (1955a), através do emprêgo de agentes bloqueadores de grupos laterais ativos de proteínas, verificou que a intensidade da impregnação argêntica apresenta correlação com a quantidade de histidina; admitiu que o grupo imidazol fôsse o principal responsável pela ligação da prata com as proteínas.

Além do grupo imidazol, admite-se que também o grupo carboxila deva participar da ligação da prata com as proteínas, ou seja, da formação de complexos metalo-proteicos. A participação do grupo carboxila, na formação desses complexos é considerada desprezível entre pH 4,8 e 6,4 (URIEL, 1961). No entanto, KLOTZ & col. (1948; 1950; 1951) e RIESS & KLOTZ (1952) observaram que o grupo $COOH$, não obstante ser mais ativo em pH superior a 6,4, ainda é ativo em pH 4,8. Estes resultados devem ser destacados uma vez que os complexos, solúveis de prata, usados nas impregnações metálicas, inclusive nas técnicas rápidas, apresentam pH elevado (acima de pH 10,5). Por outro lado, KLOTZ & col. (1948, 1950, 1951) verificaram que a acetilação, que bloqueia o grupo $COOH$, inibe a união entre o metal e a proteína. Este resultado concorda com a hipótese que admite a participação do grupo $COOH$ na união entre o metal e a po

teína. No entanto, não pode ser esquecido que a acetilação produz modificação da carga elétrica livre das proteínas; as moléculas proteicas se tornam, após êsse tratamento, intensamente eletropositivas (URIEL, 1961). Essa alteração eletrostática, por si só, poderia ser responsabilizada pelo menor grau de ligação entre o metal e a proteína.

As considerações feitas anteriormente, a respeito do mecanismo da impregnação argêntica, baseiam-se em resultados experimentais obtidos com técnicas lentas de impregnação pela prata, aplicadas, principalmente, ao tecido nervoso. Quanto ao mecanismo de impregnação pelas técnicas rápidas, há tendência em se admitir que seria análogo ao das técnicas lentas. Esta tendência, todavia, não possui base experimental. Ao contrário, há alguns resultados que revelam diferenças entre êsses dois grupos de técnicas de impregnação argêntica. Dentre estas diferenças, destaca-se a ação do tempo sobre a intensidade e a seletividade da impregnação, quando as técnicas lentas são comparadas com as rápidas. Nas técnicas lentas, a intensidade da impregnação aumenta rápida e progressivamente nos primeiros 30 minutos, quando a impregnação é efetuada à temperatura de 19°C (PETERS, 1955a). Ao contrário, nas técnicas rápidas, a permanência dos cortes durante mais de 15 segundos, na solução de complexo de prata, determina, paradoxalmente, diminuição ou ausência de impregnação seletiva (RIO HORTEGA, 1943). Esta diferença de comportamento dos dois grupos de técnicas sugere diferença quanto ao mecanismo de impregnação em cada um deles.

Por outro lado, a ligação do íon Ag^+ com o grupo imidazol se efetua em, aproximadamente, 15 minutos, quando se usa temperatura de 37°C e pH 9,0 (PETERS, 1955a). O tempo de impregnação usado nas técnicas rápidas é, portanto, insuficiente para permitir a ligação de quantidade apreciável de prata à histidina, considerada como um dos mecanismos responsáveis pela impregnação argêntica.

O tempo de impregnação, usado nas técnicas rápidas, é, também, insuficiente para permitir a formação de núcleos primários de prata reduzida, através da ação de grupos redutores contidos nos tecidos. A formação dos núcleos primários de prata reduzida ocorre com lentidão, exigindo aproximadamente duas horas para se efetuar (PETERS, 1955a).

Estas ressalvas constituem argumentos contrários à transposição, por analogia, dos resultados obtidos com as

técnicas lentas, na tentativa de explicar o mecanismo de impregnação das técnicas rápidas.

Diante dos argumentos anteriormente citados e de outros que serão oportunamente mencionados, aventou-se a hipótese de que o mecanismo da impregnação argêntica, nas técnicas rápidas, seria diferente do verificado nas técnicas lentas. Uma das finalidades do presente trabalho é a de verificar esta hipótese. Com êsse objetivo, usou-se como material de estudo, cortes de tecidos e modelos de papel de filtro. Nos cortes histológicos tentou-se estabelecer eventual correlação entre a intensidade da impregnação argêntica seletiva (argentofilia) e o grau de reatividade de alguns grupos químicos presentes nos tecidos. Este estudo constitui a primeira parte do presente trabalho. Os modelos de papel de filtro tiveram por finalidade reduzir o número de variáveis e permitir o emprego de substâncias quimicamente puras e isoladas, constituindo técnica através da qual é mais fácil a interpretação dos resultados. Com o emprego destes modelos, na segunda parte do trabalho, foi estudado o mecanismo de impregnação argêntica pelas técnicas rápidas.

PARTE I

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DA ARGENTOFILIA E O GRAU DE REATIVIDADE QUÍMICA DOS TECIDOS.

De acôrdo com o que foi anteriormente exposto, a impregnação argêntica pelas técnicas lentas está relacionada tanto com a presença, nos tecidos, de grupos redutores (PALMGREN, 1948; ROMANES, 1950; WOLMAN, 1955a, 1955b) quanto com a ocorrência de alguns grupos reativos de proteínas, dentre os quais salientam-se o grupo imidazol e o carboxila (WILLIS, 1945; PETERS, 1955a, 1955b, 1955c; WOLMAN, 1955b). Desta forma, uma das maneiras de testar a hipótese que considera o mecanismo da impregnação argêntica, nas técnicas rápidas, diferente do verificado nas técnicas lentas, seria através do estudo comparativo entre a intensidade da impregnação argêntica, obtida com o emprego de uma técnica rápida, e a reatividade histoquímica dos tecidos, no que diz respeito a grupos redutores e alguns grupos reativos de proteínas. Este será o plano usado nesta parte do trabalho.

Os grupos redutores foram evidenciados, histoquimicamente, através da reação do ferricianeto férrico e pelo tratamento com o reativo de Schiff. Alguns grupos reativos de proteínas foram evidenciados através da basofilia, da acidofilia "total" e da reação para o grupo fenol.

Por outro lado, foi verificado que a intensidade da impregnação argêntica dos tecidos, quando são usadas técnicas

cas rápidas de impregnação, apresenta relação com o ferro, demonstrável histoquimicamente. HADLER & col. (1964) mostraram haver relação entre o íon Fe^{+++} e a intensidade da argentofilia. Este resultado sugeriu que a presença do íon férrico poderia ser responsável pela impregnação argêntica. Usando modelos de papel de filtro, êsses autores demonstraram que algumas proteínas, quando ligadas ao íon férrico, adquiriam ■ argentofilia.

A correlação entre a presença do íon Fe^{+++} e a argentofilia foi reestudada por HADLER & col. (1967), através do emprêgo de técnicas histofotométricas. Os resultados obtidos, em cortes de baço, fígado e adrenal, de ratos e cobaios, revelaram estreita correlação entre a intensidade da reação do azul da Prússia e a da argentofilia. Essa correlação foi evidenciada através da remoção parcial do material azul da Prússia positivo. HADLER & col. (1967) demonstraram que o tratamento de cortes de tecidos, por solução de tioglicolato, em concentrações crescentes, provocava remoção progressiva do material azul da Prússia positivo; paralelamente, havia redução de argentofilia. A redução da argentofilia era proporcional à diminuição da intensidade da reação do azul da Prússia.

Nesses trabalhos, todavia, não se cogitou verificar a existência de eventual correlação entre a argentofilia e a atividade redutora dos tecidos; também não se procurou analisar a eventual relação entre a intensidade da argentofilia e o grau de reatividade de grupos polares de proteínas.

Cortes histológicos tratados por soluções de tioglicolato, com concentração crescente, constituem material adequado para a verificação da eventual correlação entre argentofilia e ■ reatividade, tanto de grupos redutores, quanto de alguns grupos reativos de proteínas. No entanto, o tratamento pelo tioglicolato poderia, através de um efeito próprio dêsse íon, introduzir uma causa de êrro, capaz de interferir na interpretação dos resultados. Com o escôpo de reduzir ~~essa~~ eventual interferência, foi também empregado o tratamento por solução de oxalato, com a finalidade de remover o ferro, demonstrável histoquimicamente.

MATERIAL E MÉTODOS

A- MATERIAL

Foram utilizados, fragmentos de baço e fígado de ratos adultos (Rattus norvegicus, variedade Wistar) e porcos (Sus scrofa domesticus).

O material procedente dos ratos foi retirado após anestesia com éter. O proveniente dos porcos foi colhido logo após o sacrifício e sangria do animal, em matadouro. Tomou-se precaução de modo a evitar que o contato do instrumental cirúrgico pudesse influir na quantidade de ferro, contida nos órgãos retirados; com essa finalidade, usou-se instrumental de vidro, sempre que possível.

Utilizou-se, como fixador, solução de formalina a 15%, adicionada de 3g% de cloreto de cálcio anidro, com pH ajustado a 4,0, através da adição de solução de NaOH 0,1M. Este fixador foi escolhido porque é bom preservador do ferro tissular (HADLER & col., 1966). O tempo de fixação variou entre 24 e 48 horas.

Com a finalidade de se obter uma solução de formalina isenta de ferro, para salvaguardar a introdução deste íon nas estruturas tissurais, durante a fixação (HADLER & col. 1964) o formol usado foi previamente destilado, recolhido em água destilada livre de ferro (deionizada) e titulado.

As peças assim fixadas foram lavadas em água destilada, desidratadas e incluídas em parafina, conforme técnica de rotina, tendo-se o cuidado, entretanto, de proceder-se à inclusão em temperatura próxima a 60°C, pois temperaturas mais altas prejudicam a preservação do ferro nos tecidos (HADLER & col., 1966). Foram usados cortes com 12 µ de espessura.

B- MÉTODO

Técnicas histoquímicas-

1) Demonstração do íon Fe^{+++} : Com a finalidade de evidenciar o íon Fe^{+++} , usou-se a reação do azul de Prússia; foi utilizada, para o desenvolvimento da reação, a técnica preconizada por HADLER & col. (1965b).

2) Evidenciação de grupos redutores: Para a demonstração da presença de grupos redutores usou-se:

a) Reação do ferricianeto férrico, segundo ADAMS (1956),

b) Tratamento pelo reativo de Schiff, durante 10 minutos, seguido de 3 banhos em solução de bissulfito de sódio a 0,5%, com 3 minutos de duração cada banho.

3) Reação do P.A.S. : Efetuada segundo MCMANNUS (1946), modificada por HOTCHKISS (1948).

4) Basofilia: Verificada através da coloração por solução de azul de toluidina a 1%, em tampão de citrato QLM, pH 4,5. O tempo de coloração foi de 20 minutos.

5) Coloração pelo amarelo de naftol S, conforme DEITCH (1955).

6) Reação de Millon, modificada por Baker, segundo PEARSE (1961).

7) Remoção do ferro histoquimicamente demonstrável: Com a finalidade de remover o material azul da Prússia, positivo, cortes de fígado e baço foram tratados da seguinte maneira:

a) por solução de tioglicolato de sódio, em pH 8,0 (ajustado pela adição de solução 0,1 M de OHNa), na temperatura de 60°C, durante 1 hora; foram usadas soluções com as seguintes concentrações finais: 0,48 M; 0,24 M; 0,12 M; 0,06 M; 0,03 M; 0,015 M. Após o tratamento, os cortes foram cuidadosamente lavados em água destilada deionizada.

b) por solução de oxalato de sódio, cujo pH foi ajustado a 4,0, através da adição de ácido oxálico; foram preparadas soluções com concentração final de 0,96 M; 0,48 M; 0,24 M; 0,12 M; 0,06 M; os cortes foram tratados, pelas soluções citadas, à temperatura de 60°C, durante 1 hora. Após o tratamento, os cortes foram cuidadosamente lavados em água destilada deionizada.

O pH utilizado, tanto para as soluções de tioglicolato quanto para as soluções de oxalato, foram estabelecidos através de experiências preliminares, considerando-se a eficiência da remoção do ferro, histoquimicamente demonstrável.

8) Bloqueio de grupos redutores: com o escopo de bloquear o grupo S-H (sulfidrila), os cortes histológicos foram previamente tratados por solução saturada de bicloreto de mercúrio, a 60°C, durante 6 horas.

O bloqueio do grupo carbonila foi efetuado atra

vés do pré tratamento dos cortes por solução de cloridrato de anilina a 10%, à temperatura ambiente, durante 1 hora.

C- IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA

A impregnação argêntica foi realizada com solução de "argento-diamina", pela técnica de RIO HORTEGA (1919), modificada por HADLER (1962). Esta técnica consiste em mergulhar os cortes em solução de composto de "argento-diamina", durante 28 segundos e, em seguida, reduzir em solução de formalina a 3%.

D- ESTIMAÇÃO HISTOFOTOMÉTRICA DA INTENSIDADE DA ARGENTOFILIA E DO GRAU DE REATIVIDADE HISTOQUÍMICA

A intensidade das reações histoquímicas efetuadas, bem como da argentofilia, foi determinada histofotometricamente, conforme técnica descrita por HADLER & col. (1965a). A imagem dos cortes histológicos foi projetada com aumento de oito vezes, sobre o diafragma do histofotômetro. O diafragma usado apresentava 2,37mm de diâmetro.

A estimacão histofotométrica foi feita com luz monocromática, obtida pela interposicão de filtros de interferência. Os comprimentos de onda escolhidos para as diversas reações foram os seguintes:

a) 790 mu para basofilia pelo azul de toluidina e reacção do azul da Prússia;

b) 543 mu para a reacção do ferricianeto férrico, para a reatividade ao reativo de Schiff, reacção do P.A.S., impregnação argêntica e reacção de Millon.

Estes dois comprimentos de onda foram escolhidos após ter sido verificada sua conveniência para a leitura histofotométrica, uma vez que demonstraram ser os mais adequados para a verificacão de variações quantitativas.

Tôdas as reações histoquímicas, assim como a impregnação argêntica, foram efetuadas em cortes de baço e fígado, de 5 animais diferentes para cada espécie animal estudada.

As leituras histofotométricas foram feitas em dois cortes diferentes de cada órgão estudado, para cada reacção histoquímica realizada, assim como para a impregnação argêntica. Em cada corte foram efetuadas 20 leituras, em pontos diferentes. No caso particular dos cortes de baço, as leituras foram feitas, apenas, na polpa vermelha. A leitura histofotométrica dos 40 pontos diferentes (20 em cada corte) permitiu estimar o valor médio da densidade óptica, para cada órgão. Os conjuntos

de 5 médias, assim obtidas, foram comparadas através de análise estatística.

E- ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

A análise dos resultados consistiu da comparação entre as linhas de regressão, obtidas para as reações histoquímicas e para a argentofilia. Foi calculado o valor do coeficiente de regressão, para cada linha de regressão. Os coeficientes de regressão, correspondentes às diversas linhas de regressão, foram comparados entre si, através do teste "t". Desta forma, foi possível estimar, com probabilidade de 0,05, se as diferentes linhas de regressão apresentavam, ou não, paralelismo. Para o cálculo do coeficiente de regressão foi considerado apenas o segmento retilíneo das linhas de regressão.

Para a representação gráfica dos resultados, além da linha de regressão, foram projetados valores médios obtidos e seus respectivos intervalos de confiança.

RESULTADOS

Os cortes de fígado e baço, das duas espécies de animais estudadas, quando tratados por soluções com concentração diferente de tioglicolato de sódio, apresentam redução da argentofilia, tanto das células reticulares do baço, quanto das células hepáticas e de Kupffer. A intensidade da argentofilia, medida histofotomètricamente, através da densidade óptica de cortes histológicos impregnados pela prata, apresenta correlação com a concentração da solução de tioglicolato usada no tratamento dos cortes (gráficos 1-2-3-4). A intensidade da redução da argentofilia é proporcional à concentração da solução de tioglicolato usada. Fazem excessão os cortes de baço, nos quais, soluções de tioglicolato com concentração 0,015 M e 0,030 M, não determinam redução da argentofilia, nas condições técnicas empregadas. A regressão da intensidade da argentofilia dos cortes histológicos, em função da concentração de tioglicolato, é expressa por uma linha retilínea, ao menos dentro de determinadas concentrações (gráficos 1-2-3-4). O coeficiente de regresão da intensidade da argentofilia, sôbre a concentração da solução de tioglicolato empregada foi tomada, como parâmetro dessa regressão.

O tratamento dos cortes histológicos, por solução de oxalato, apresenta efeito comparável ao do tratamento por solução de tioglicolato, no que diz respeito à redução da intensidade da argentofilia (gráficos 5-6-7-8). No entanto, há algumas diferenças, no que se refere aos cortes de baço; nêste orgão, o coeficiente de regressão da intensidade da argentofilia, sôbre a concentração das soluções de oxalato, apresenta valor significativamente menor que o referente à regressão determinada pelo tratamento com solução de tioglicolato (tabela I).

Analisando-se, comparativamente, o efeito do tratamento pelo tioglicolato e pelo oxalato, nos dois órgãos, das duas espécies animais estudadas, verifica-se que em uma espécie animal, há diferença significativa entre os coeficientes de regressão da intensidade da argentofilia, quando cortes de fígado são comparados com cortes de baço, independentemente do

tratamento efetuado. No entanto, para um mesmo órgão, submetido a um mesmo tratamento, os coeficiente de regressão são semelhantes em ambas as espécies animais (tabela I).

Os gráficos 1-2-3-4-5-6-7-8 e a tabela II revelam que a linha de regressão da redução da intensidade da argentofilia, em cortes histológicos tratados tanto pelo tioglicolato como pelo oxalato, não apresenta paralelismo com as linhas de regressão obtidas com as seguintes reações: 1) Reação do ferricianoeto férrico; 2) Tratamento pelo reativo de Schiff; 3) Reação do PAS; 4) Reação de Millon; 5) Coloração pelo azul de toluidina; 6) Coloração pelo amarelo de Naftol S. Esta ausência de paralelismo ocorre nos cortes de baço e fígado, de rato e de porco.

Conforme mostram os gráficos 17-18-19-20 e a tabela IV, o tratamento pelo bicloreto de mercúrio ou pelo cloridrato de anilina, não interfere na intensidade da argentofilia de cortes de baço e fígado, tratados por solução de tioglicolato. A comparação entre os coeficientes de regressão da intensidade da argentofilia, nestas duas condições, mostra que a diferença entre os valores de b não é significativa.

O bloqueio dos grupos S-H e carbonila, efetuado em cortes de baço e fígado, de rato e porco, previamente tratados por tioglicolato, revela o seguinte (gráficos 17-18-19-20): 1) o tratamento pelo bicloreto de mercúrio inibe a intensificação da reação do ferricianoeto férrico, decorrente do pré tratamento por solução de tioglicolato; 2) o tratamento pelo bicloreto de mercúrio não modifica o coeficiente de regressão da intensidade da coloração desenvolvida pelo tratamento com o reativo de Schiff, em função da concentração das soluções de tioglicolato; 3) o tratamento pelo cloridrato de anilina, modifica apenas o coeficiente de regressão da coloração desenvolvida pelo tratamento com o reativo de Schiff.

A comparação entre as linhas de regressão da intensidade da argentofilia e da intensidade da reação do azul de Prússia, em cortes de fígado e baço, tratados pelo tioglicolato, revela paralelismo entre ambas (gráficos 9-10-11-12 e tabela III), uma vez que a diferença entre os valores dos respectivos coeficientes de regressão não é significativa; este paralelismo ocorre nos cortes histológicos dos dois órgãos empregados, em ambas as espécies animais estudadas.

O referido paralelismo é estreito; o tratamento por solução de tioglicolato, nas concentrações 0,015 M e 0,030 M,

é ineficiente para reduzir tanto a argentofilia quanto a intensidade da reação do azul da Prússia, em cortes de baço de ambas as espécies animais. De maneira semelhante, há também paralelismo entre as linhas de regressão da intensidade da argentofilia e da reação do azul da Prússia, em cortes tratados por solução de oxalato (gráficos 13-14-15-16 e tabela III).

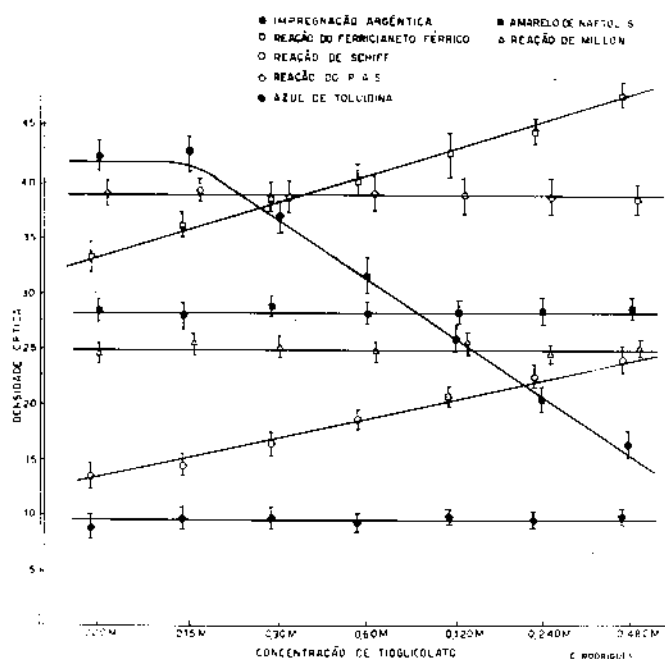


Gráfico 1- Cortes de baço de rato tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argen- tofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprêgo de di- versas reações histoquímicas.

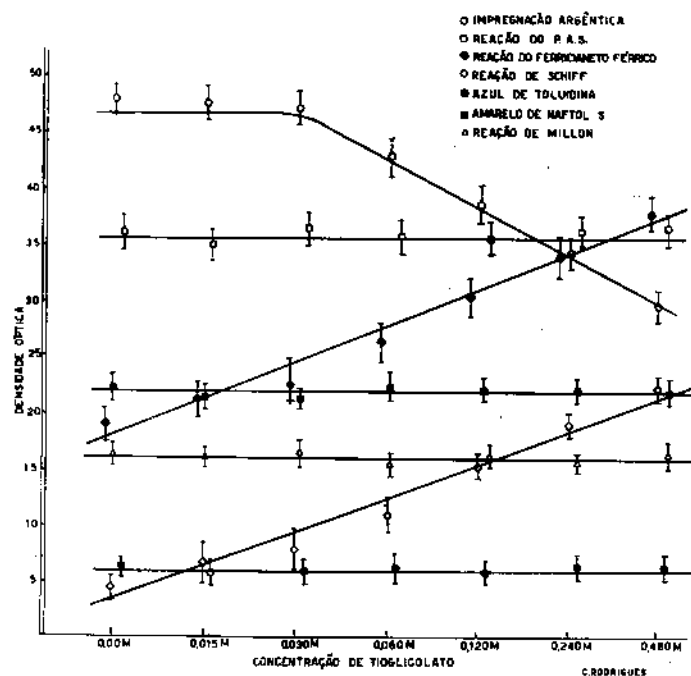


Gráfico 2- Cortes de baço de porco tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argen- tofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprêgo de di- versas reações histoquímicas.

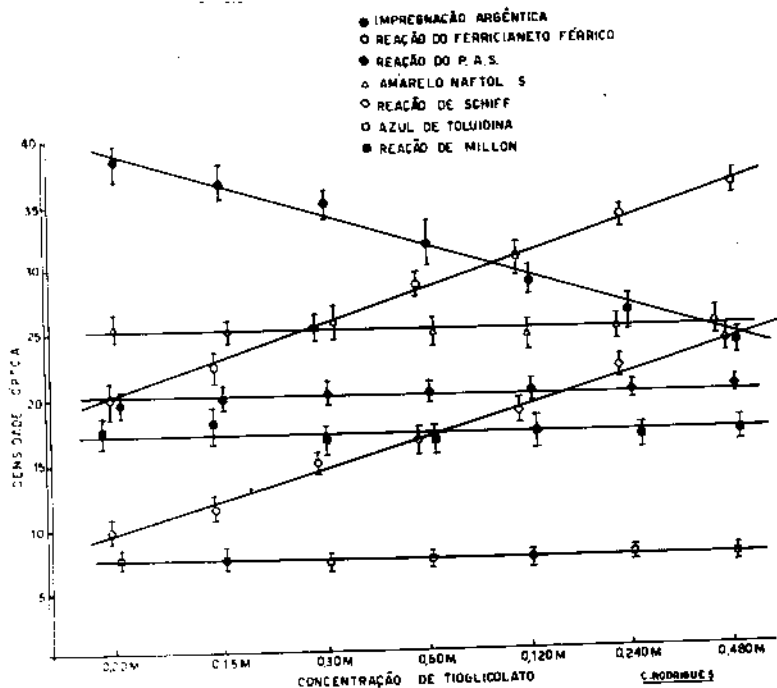


Gráfico 3- Cortes de fígado de rato tratados por solução de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argento-filia e as linhas de regressão obtidas através do emprego de diversas reações histoquímicas.

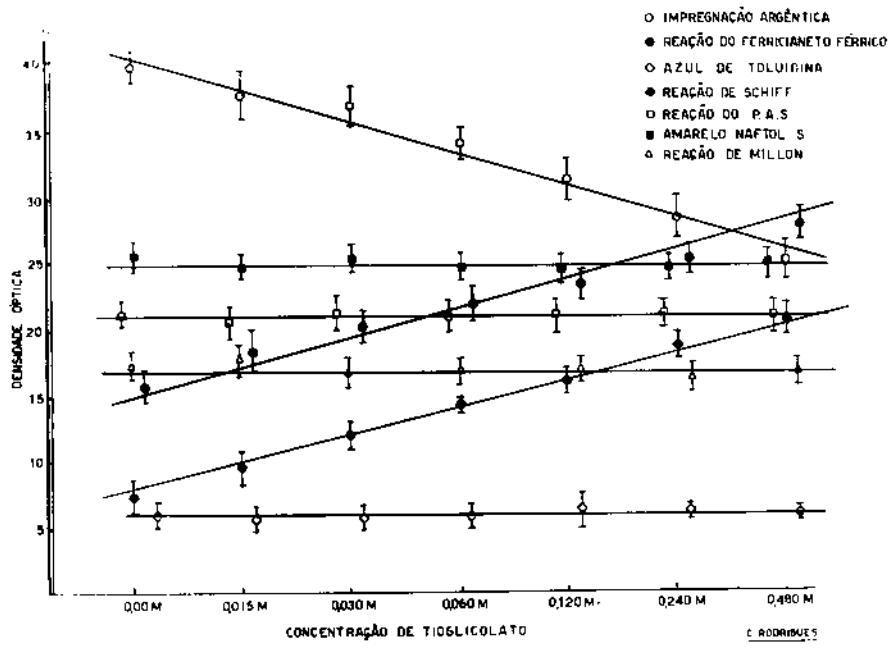


Gráfico 4- Cortes de fígado de porco tratados por solução de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argento-filia e as linhas de regressão obtidas através do emprego de diversas reações histoquímicas.

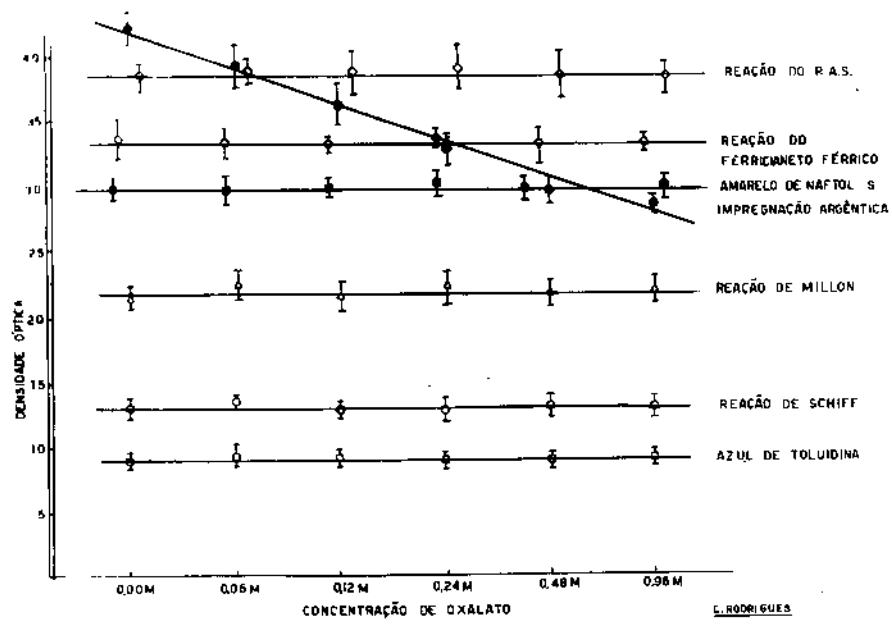


Gráfico 5- Cortes de baço de rato tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotomêtricamente. Comparação entre a linha de regressão da argentofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprego de diversas reações histológicas.

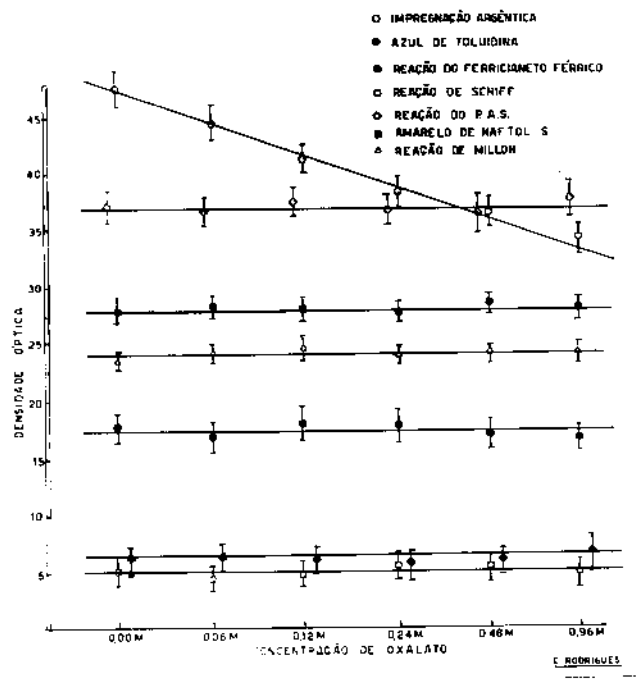


Gráfico 6- Cortes de porco tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotomêtricamente. Comparação entre a linha de regressão da argentofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprego de diversas reações histológicas.

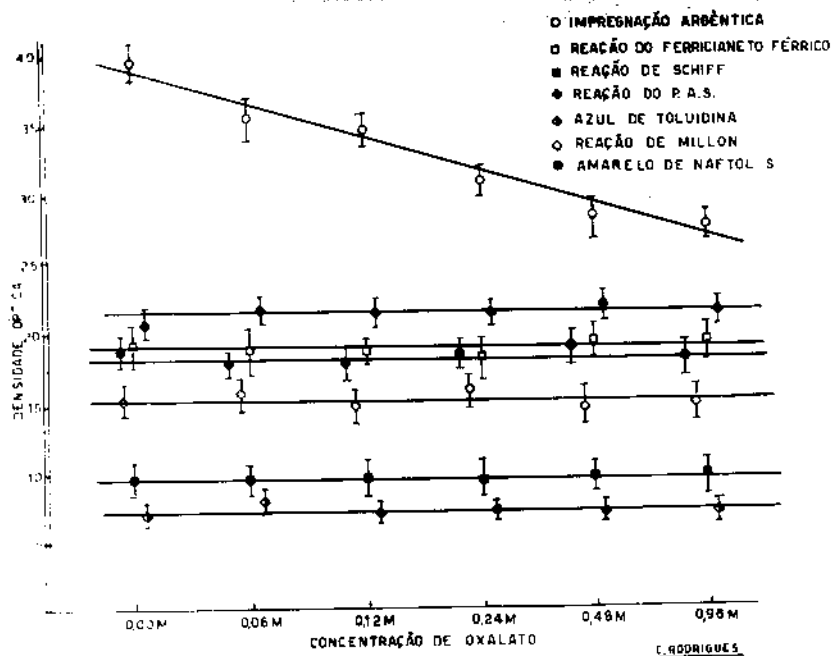


Gráfico 7- Cortes de fígado de rato tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argentofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprêgo de diversas reações histoquímicas.

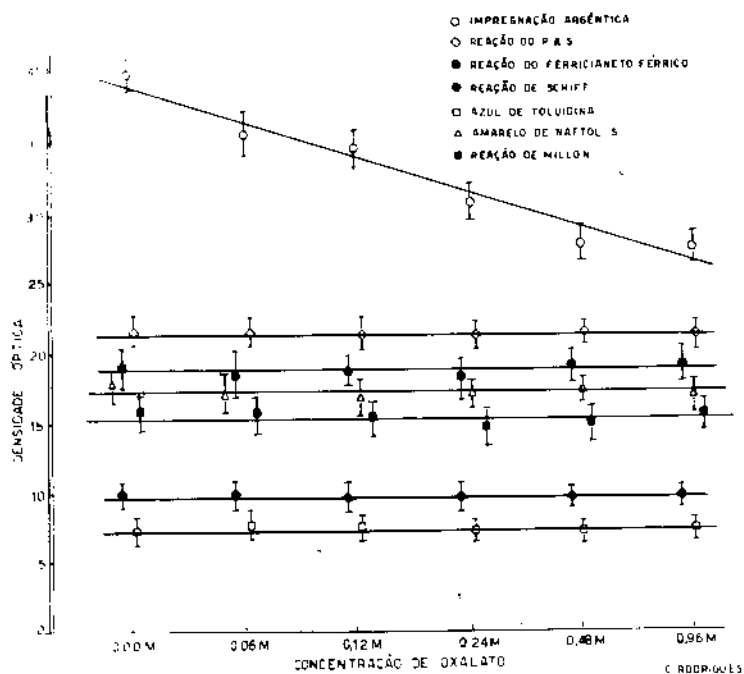


Gráfico 8- Cortes de fígado de porco tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre a linha de regressão da argentofilia e as linhas de regressão obtidas através do emprêgo de diversas reações histoquímicas.

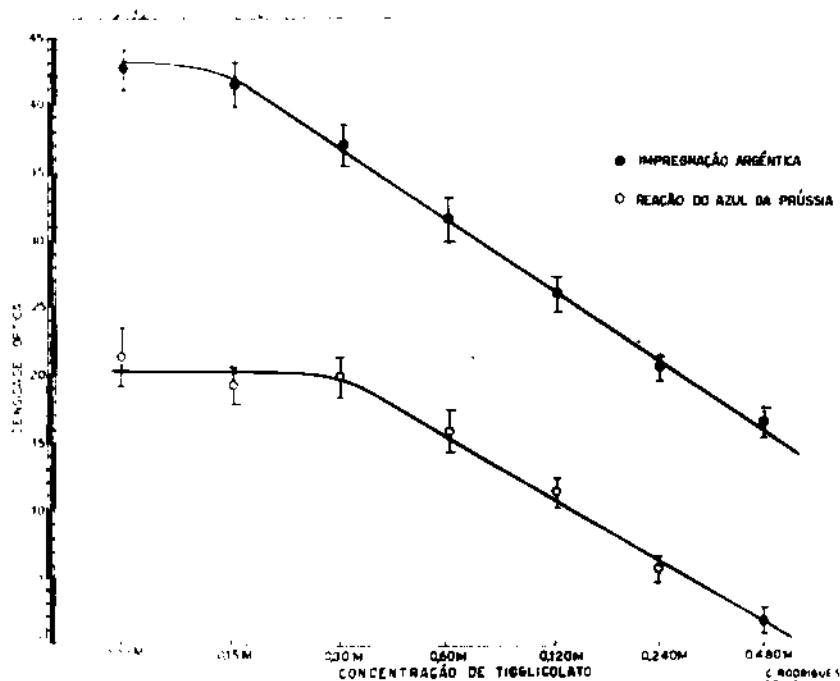


Gráfico 9- Cortes de baço de rato tratados por solução de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argêntofilia e da reação do azul da Prússia.

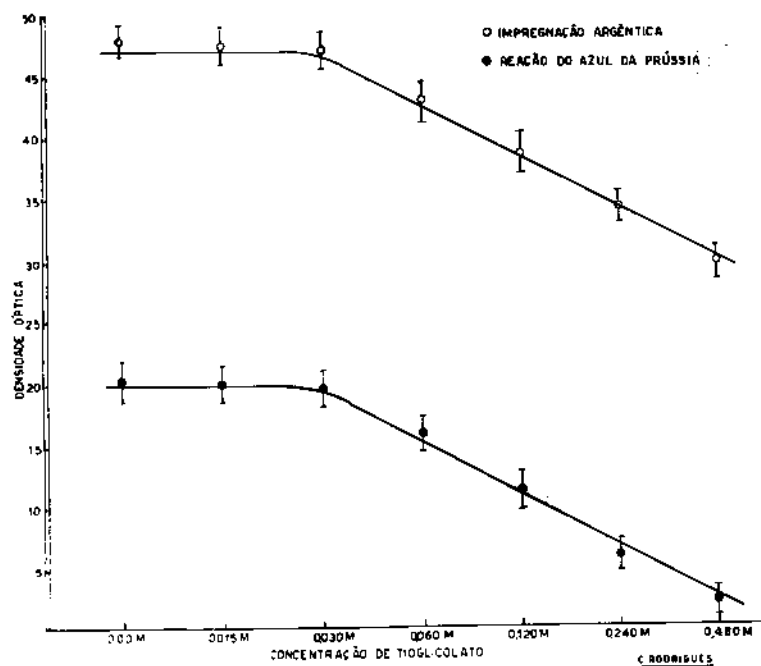


Gráfico 10- Cortes de baço de porco tratados por solução de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argêntofilia e da reação do azul da Prússia.

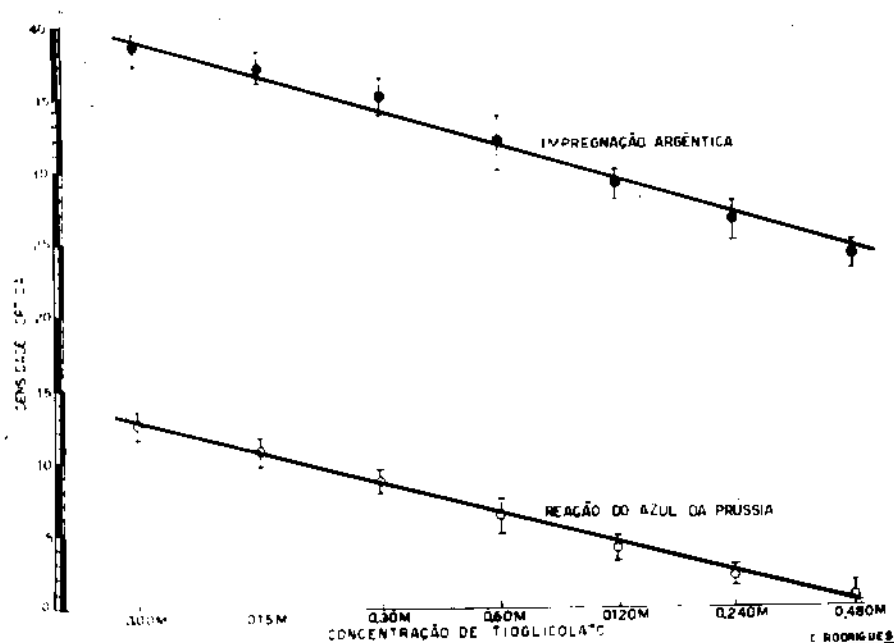


Gráfico 11- Cortes de fígado de rato tratados por soluções de tio-glicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tio-glicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotomêtricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

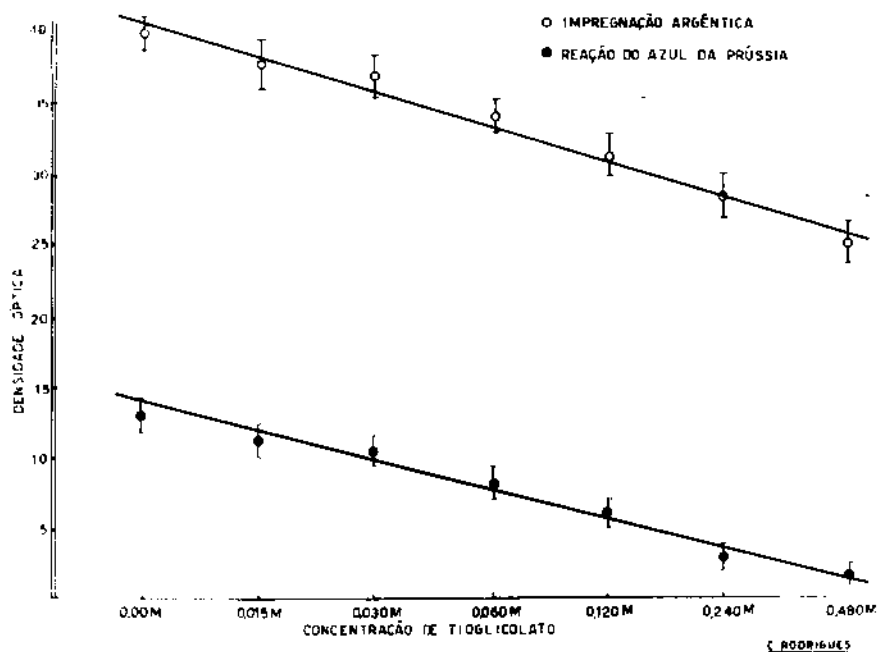


Gráfico 12- Cortes de fígado de porco tratados por soluções de tio-glicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tio-glicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotomêtricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

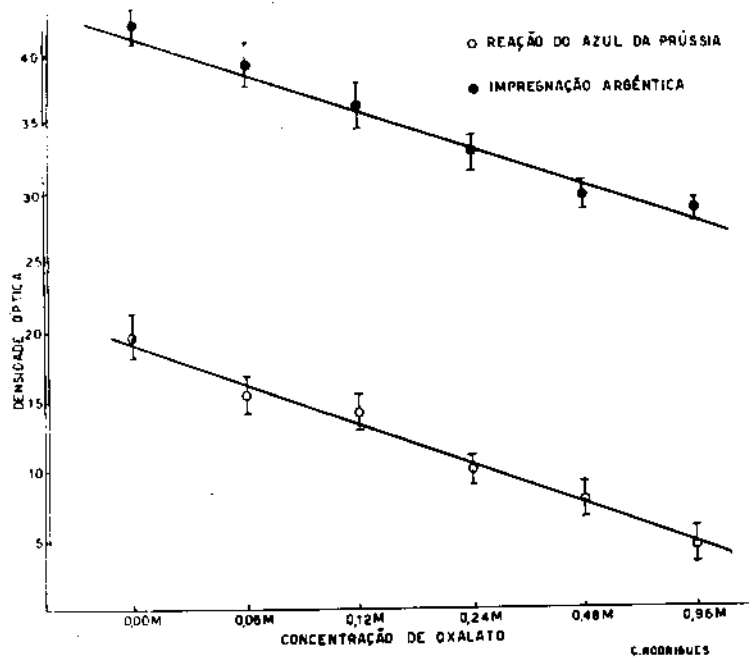


Gráfico 13- Cortes de baço de rato tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

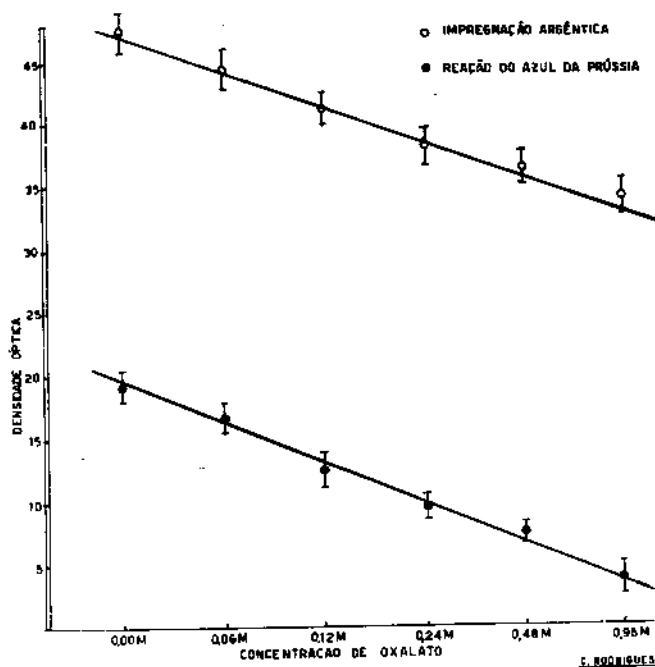


Gráfico 14- Cortes de baço de porco tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

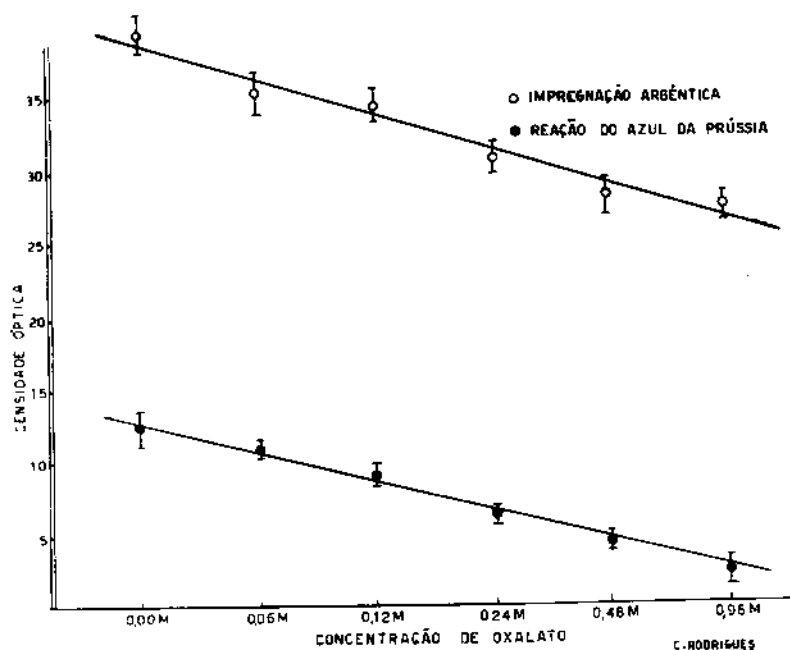


Gráfico 15- Cortes de fígado de rato tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

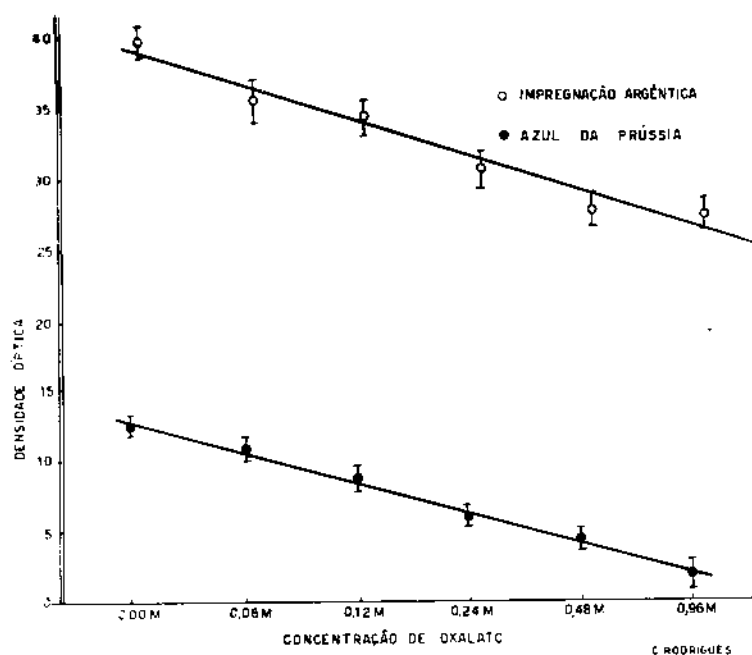


Gráfico 16- Cortes de fígado de porco tratados por soluções de oxalato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo oxalato sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do azul da Prússia.

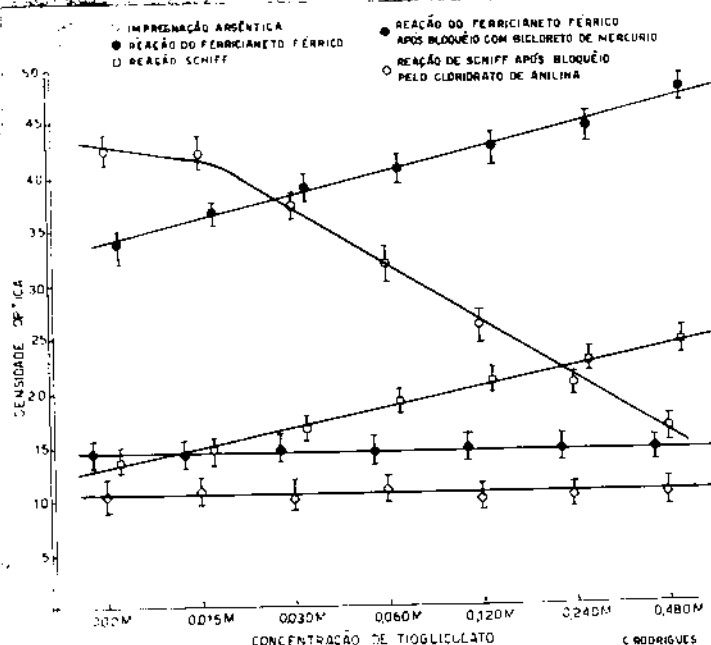


Gráfico 17- Cortes de baço de rato tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, da reação do ferricianeto férrico, e da cor desenvolvida com o reativo de Schiff. Ação do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e o cloridrato de anilina.

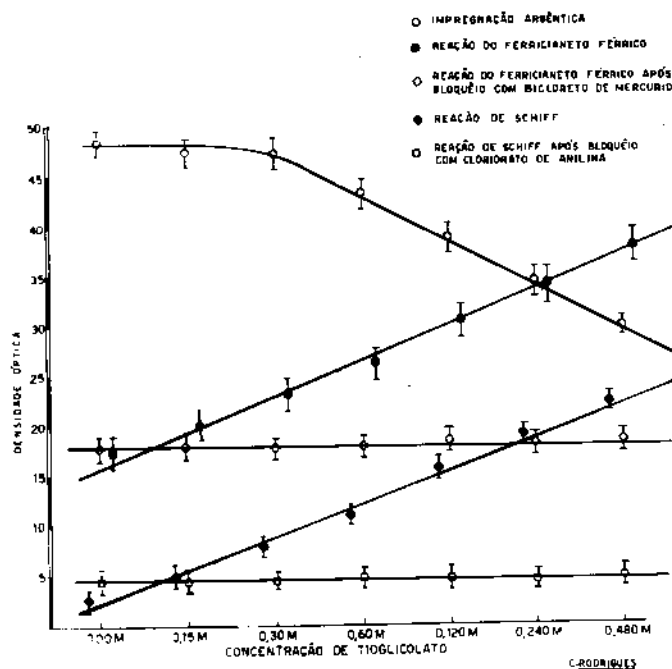


Gráfico 18- Cortes de baço de porco tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, da reação do ferricianeto férrico, e da cor desenvolvida com o reativo de Schiff. Ação do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e o cloridrato de anilina.

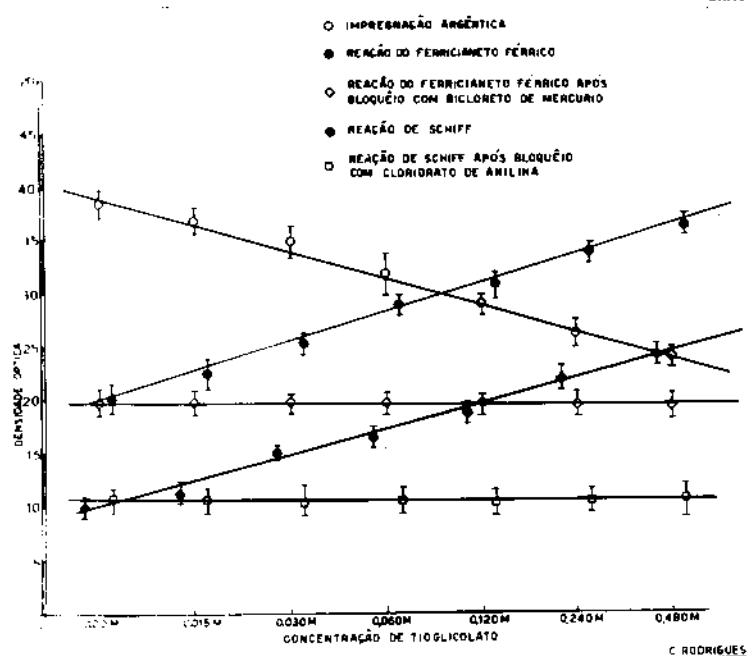


Gráfico 19- Cortes de fígado de rato tratados por soluções de tio-glicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tio glicolato, sobre a intensidade da impregnação argêntica, na reação do ferricianeto férrico, e da cor desenvolvida com o reativo de Schiff. Ação do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e o cloridrato de anilina.

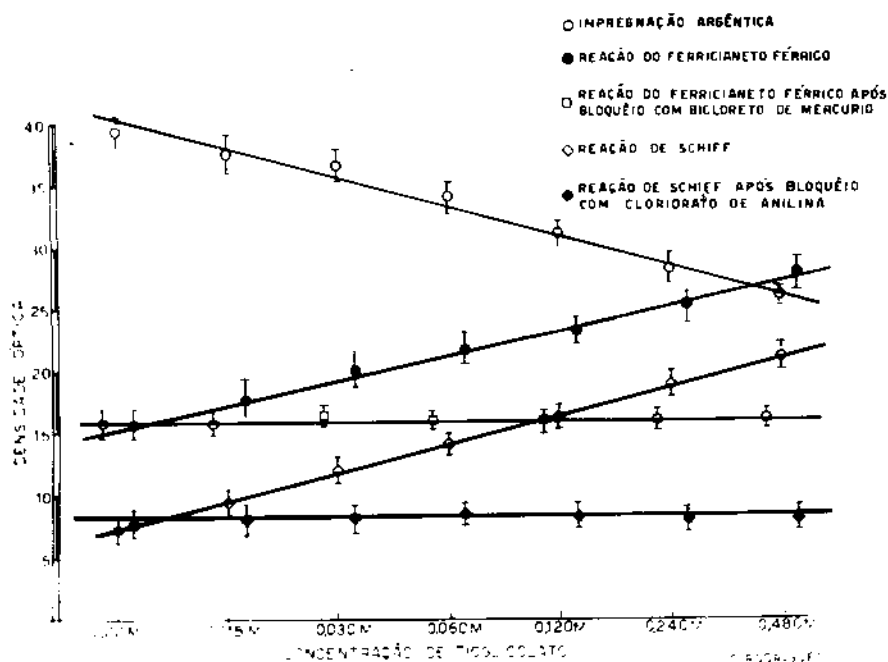


Gráfico 20- Cortes de fígado de porco tratados por soluções de tio-glicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tio glicolato, sobre a intensidade da impregnação argêntica, na reação do ferricianeto férrico, e da cor desenvolvida com o reativo de Schiff. Ação do bloqueio pelo bicloreto de mercúrio e o cloridrato de anilina.

TABELA I

Comparação entre os coeficientes de regressão (b) da intensidade da argentofilia (argent.) sobre a concentração da solução de tioglicolato (tioglic.) e oxalato (oxal.), em baço e fígado de rato e porco.

R A T O			
TIOGLICOLATO		OXALATO	
BAÇO	FÍGADO	BAÇO	FÍGADO
$-4,790 \pm 0,162$	$-2,371 \pm 0,155$	$-2,857 \pm 0,167$	$-2,191 \pm 0,110$
P O R C O			
TIOGLICOLATO		OXALATO	
BAÇO	FÍGADO	BAÇO	FÍGADO
$-4,350 \pm 0,175$	$-2,214 \pm 0,237$	$-2,691 \pm 0,123$	$-2,269 \pm 0,220$
TESTE DA DIFERENÇA ENTRE B		SIGNIFICÂNCIA (0,05)	
Baço rato tioglic.	x Baço porco tioglic.	N.S.	
Baço rato tioglic.	x Baço rato oxal.	S.	
Baço rato tioglic.	x Fígado rato tioglic.	S.	
Baço rato oxal.	x Baço porco oxal.	N.S.	
Baço rato oxal.	x Fígado rato oxal.	S.	
Baço porco tioglic.	x Baço porco oxal.	S.	
Baço porco tioglic.	x Fígado porco tioglic.	S.	
Baço porco oxal.	x Fígado porco oxal.	S.	
Fígado rato tioglic.	x Fígado rato oxal.	N.S.	
Fígado rato tioglic.	x Fígado porco tioglic.	N.S.	
Fígado rato oxal.	x Fígado porco oxal.	N.S.	
Fígado porco tioglic.	x Fígado porco oxal.	N.S.	

Observação: N.S. = não significativo

S. = significativo

TABELA II

Comparação entre os coeficientes de regressão (b) da intensidade da argentofilia e da intensidade das reações histoquímicas usadas em cortes de fígado e baço de rato e de porco.

REAÇÃO OU COLORAÇÃO	TIOGLICOLATO			
	R A T O		P O R C O	
	FÍGADO	BAÇO	FÍGADO	BAÇO
Argentofilia	-2,371 $\pm$ 0,186	-4,790 $\pm$ 0,162	-2,214 $\pm$ 0,237	-4,350 $\pm$ 0,175
Ferricianeto ferrico	2,736 $\pm$ 0,074	2,246 $\pm$ 0,094	1,864 $\pm$ 0,069	3,680 $\pm$ 0,105
P.A.S.	0,057 $\pm$ 0,021	-0,082 $\pm$ 0,042	0,010 $\pm$ 0,055	0,020 $\pm$ 0,114
Schiff	2,396 $\pm$ 0,077	1,811 $\pm$ 0,067	2,229 $\pm$ 0,019	3,650 $\pm$ 0,100
Azul de Toluidina	-0,039 $\pm$ 0,075	0,005 $\pm$ 0,055	0,050 $\pm$ 0,181	0,100 $\pm$ 0,045
Amarelo de naftol s	0,036 $\pm$ 0,068	0,086 $\pm$ 0,089	0,042 $\pm$ 0,060	0,067 $\pm$ 0,055
Reação de Millon	0,027 $\pm$ 0,080	0,106 $\pm$ 0,057	0,038 $\pm$ 0,073	0,113 $\pm$ 0,043
REAÇÃO OU COLORAÇÃO	FOXALATO			
	R A T O		P O R C O	
	FÍGADO	BAÇO	FÍGADO	BAÇO
Argentofilia	-2,191 $\pm$ 0,213	-2,357 $\pm$ 0,167	-2,269 $\pm$ 0,220	-2,691 $\pm$ 0,123
Ferricianeto ferrico	0,003 $\pm$ 0,032	-0,029 $\pm$ 0,251	-0,120 $\pm$ 0,156	-0,057 $\pm$ 0,153
P.A.S.	0,091 $\pm$ 0,074	0,171 $\pm$ 0,061	0,029 $\pm$ 0,081	0,023 $\pm$ 0,118
Schiff	0,011 $\pm$ 0,010	0,020 $\pm$ 0,003	0,040 $\pm$ 0,081	0,074 $\pm$ 0,101
Azul de Toluidina	-0,040 $\pm$ 0,048	0,029 $\pm$ 0,043	0,040 $\pm$ 0,096	0,057 $\pm$ 0,024
Amarelo de naftol s	0,091 $\pm$ 0,073	0,090 $\pm$ 0,091	0,045 $\pm$ 0,080	0,094 $\pm$ 0,038
Reação de Millon	0,082 $\pm$ 0,080	0,058 $\pm$ 0,075	0,030 $\pm$ 0,065	0,057 $\pm$ 0,059

Através do teste da diferença entre os valores de b, verificou-se que o coeficiente de regressão da argentofilia é significativamente diferente do coeficiente de regressão apresentado por todos os outros tratamentos.

T A B E L A I I I

Comparação entre os coeficientes de regressão da intensidade da argentófilia (argent.) e da intensidade da reação do azul da Prússia (A. Prús.), em cortes de fígado e baço de rato e porco, previamente tratados por solução de tioglicolato, ou de oxalato.

T I O G L I C O L A T O							
B A Ç O				F Í G A D O			
R A T O		P O R C O		R A T O		P O R C O	
Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.
-4,790	-4,620	-4,350	-4,470	-2,371	-2,064	-2,214	-1,918
+	+	+	+	+	+	+	+
0,162	0,158	0,175	0,129	0,155	0,058	0,137	0,083
TESTE DA DIFERENÇA ENTRE B				SIGNIFICÂNCIA (0,05)			
Baço rato		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Baço porco		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Fígado rato		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Fígado porco		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
O X A L A T O							
B A Ç O				F Í G A D O			
R A T O		P O R C O		R A T O		P O R C O	
Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.	Argent.	A. Prús.
-2,857	-2,946	-2,691	-3,086	-2,191	-2,154	-2,269	-2,323
+	+	+	+	+	+	+	+
0,167	0,088	0,123	0,117	0,110	0,120	0,220	0,133
TESTE DA DIFERENÇA ENTRE B				SIGNIFICÂNCIA (0,05)			
Baço rato		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Baço porco		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Fígado rato		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			
Fígado porco		- Argent. x R. A. Prús.		N.S.			

Observação: N.S. = não significativo

TABELA IV

Comparação entre os coeficientes de regressão da intensidade da argentofilia e das reações histoquímicas destinadas a revelar grupos redutores, efetuados em cortes de baço e fígado de rato e de porco, tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do bloqueio sobre a intensidade da argentofilia, da reação do ferricianeto férrico e da coloração desenvolvida pelo tratamento com o reativo de Schiff.

	BAÇO		FÍGADO	
	RATO	PORCO	RATO	PORCO
Argentofilia	-4,790 + 0,162	-4,350 + 0,175	-2,371 + 0,155	-2,214 + 0,137
Argentofilia após bloqueio c/ bicloreto de mercúrio	-4,610 + 0,138	-4,760 + 0,142	-2,693 + 0,104	-2,318 + 0,144
Argentofilia após bloqueio c/ cloridrato de anilina	-4,830 + 0,163	-4,690 + 0,177	-2,518 + 0,119	-2,511 + 0,171

A diferença entre os valores dos coeficientes de regressão da argentofilia efetuada antes e depois do bloqueio de grupos redutores pelo bicloreto de mercúrio e cloridrato de anilina, não é significativa.

Reação do ferricianeto férrico	2,246 + 0,094	3,680 + 0,105	2,436 + 0,074	1,864 + 0,069
Reação do ferricianeto férrico após bloqueio c/ bicloreto de mercúrio	0,035 + 0,169	-0,094 + 0,073	-0,135 + 0,051	0,112 + 0,063
Reação do ferricianeto férrico após bloqueio com cloridrato de anilina	2,352 + 0,102	3,248 + 0,203	2,514 + 0,109	2,254 + 0,073

A diferença entre os valores dos coeficientes de regressão da reação do ferricianeto férrico efetuada antes e depois do bloqueio de grupos redutores pelo bicloreto de mercúrio e cloridrato de anilina, é significativa quando o bloqueio é efetuado pelo bicloreto de mercúrio, porém, não tem significado quando o bloqueio é efetuado pelo cloridrato de anilina.

Schiff	1,811 + 0,067	3,650 + 0,100	2,396 + 0,077	2,229 + 0,019
Schiff após bloqueio c/ bicloreto de mercúrio	-1,902 + 0,075	3,380 + 0,063	2,519 + 0,094	2,458 + 0,101
Schiff após bloqueio c/ cloridrato de anilina	-0,040 + 0,056	-0,035 + 0,044	0,038 + 0,072	0,055 + 0,092

A diferença entre os valores dos coeficientes de regressão da coloração desenvolvida pelo tratamento com o reativo de Schiff efetuada antes e após o bloqueio de grupos redutores pelo bicloreto de mercúrio e cloridrato de anilina, é significativa quando o bloqueio é efetuado pelo cloridrato de anilina, porém, não é significativa quando o bloqueio é feito pelo bicloreto de mercúrio.

DISCUSSÃO

Nesta parte do presente trabalho tentou-se verificar eventual correlação entre a redução da argentofilia, experimentalmente provocada, e algumas modificações da reatividade histoquímica dos cortes de fígado e baço, que poderiam ocorrer simultaneamente.

Com o intuito de reduzir a intensidade da argentofilia, foram empregados dois tratamentos diversos, que atuam através de mecanismos provavelmente diferentes; esta hipótese baseia-se na desigualdade, quanto às propriedades químicas, dos íons tioglicolato e oxalato e, principalmente, nos valores do coeficiente de regressão da intensidade da argentofilia, sobre as concentrações das respectivas soluções; os valores de b (coeficiente de regressão) são significativamente diferentes quando cortes de baço, submetidos aos dois tratamentos, são comparados entre si. Agindo dessa forma, procurou-se evitar que uma eventual ação "específica", inerente ao íon empregado no pré tratamento, pudesse inibir a impregnação argêntica, interferindo nos resultados. Por outro lado, com o intuito de evitar interferência direta dos íons tioglicolato e oxalato sobre a argentofilia, após o pré tratamento, por ambos os reativos, os cortes foram cuidadosamente lavados, antes de ser efetuada a impregnação argêntica.

A redução da intensidade da argentofilia, consequente a ambos os tratamentos, foi comparada com a variação, quanto à intensidade, da reatividade histoquímica dos cortes tratados tanto pelo tioglicolato quanto pelo oxalato. Com esse escopo, limitou-se à verificação da reatividade histoquímica referente a grupos reativos que se admite estarem relacionados com a impregnação argêntica, ou seja, com a formação dos núcleos primários de prata reduzida. Nesse particular, merecem atenção os grupos S-H e carbonila (PALMGREN, 1948; ROMANES, 1950; WOLMAN, 1955a, 1955b) e alguns grupos eletropolares das proteínas (WILLIS, 1945; PETERS, 1955a, 1955b), incluindo, sob essa denominação, os grupos imidazol, fenol e carboxila.

Admite-se que a reação de ferricianeto férrico, especialmente quando complementada por agentes bloqueadores (biclureto de mercúrio), revele grupos redutores, notadamente o grupo S-H (ANSON, 1939, 1941, 1942; CHEVREMONT & FREDERICQ, 1943; YAO, 1949; ADAMS, 1956).

A relação entre o grupo S-H e a argentofilia foi verificada através da comparação entre a linha de regressão da argentofilia e a da reação do ferricianeto férrico. O bloqueio pelo biclureto de mercúrio foi empregado com a finalidade de reduzir a causa de erro, devido à falta de especificidade dessa reação. O bloqueio pelo cloridrato de anilina teve por finalidade revelar se o grupo carbonila poderia ser responsabilizado pela positividade da reação do ferricianeto férrico. Convém assinalar que os resultados obtidos com a reação do ferricianeto férrico, tanto em cortes de baço, quanto de fígado, cuja intensidade aumenta proporcionalmente com a concentração da solução de tioglicolato usada (e não aumenta quando o tratamento é efetuado por solução de oxalato, com concentrações crescentes; gráficos 1-2-3-4-5-6-7-8), sugere que a intensidade dessa reação, em parte, decorra da formação de grupos S-H, devido ao tratamento. Foi demonstrado que, como consequência da ação do tioglicolato, há transformação de grupos S-S em S-H (ADAMS, 1956).

A ausência de paralelismo entre as linhas de regressão da argentofilia e da reação do ferricianeto férrico, cujos respectivos coeficientes de regressão são significativamente diferentes, sugere não haver relação entre a presença e a quantidade de grupos S-H e a argentofilia. A ação do bloqueio pelo biclureto de mercúrio, sobre a reação do ferricianeto férrico, concorda com esta interpretação; também concorda com esta interpretação a ausência de modificação da intensidade da argentofilia, quando os cortes histológicos, antes de serem impregnados pela prata, são tratados por biclureto de mercúrio. Os resultados sugerem que a intensidade da reação do ferricianeto férrico, em cortes de fígado e baço, dependa de dois componentes: um deles é bloqueado pelo biclureto de mercúrio e apresenta proporcionalidade com a concentração da solução de tioglicolato, usada para o tratamento dos cortes; esse componente reage como o grupo S-H; o outro componente não é bloqueado pelo tratamento com o biclureto de mercúrio e ocorre mesmo em ausência de tratamento pelo tioglicolato, sugerindo não se tratar do grupo S-H. A intensidade da argentofilia não apresenta correlação com nenhum dos dois componentes. Estes resultados revelam, além disso, que

o mecanismo da impregnação argêntica, pelas técnicas rápidas, difere do mecanismo admitido para as técnicas lentas, de impregnação pela prata. WOLMAN (1955b), estudando a impregnação argêntica de fibras nervosas, através de impregnações lentas, or relacionou a intensidade da impregnação com a reação do ferric-cianeto férrico. Sugeriu que essa reação fôsse proveniente da presença de grupos redutores, especialmente do grupo S-H e do carbonila, responsáveis tanto pela positividade da reação do ferric-cianeto férrico, quanto pela argentofilia. Na técnica de impregnação rápida, usada no presente trabalho, em cortes de flgado e baço, essa correlação não foi verificada.

A eventual correlação entre o grupo carbonila e a intensidade da argentofilia foi analisada, comparando-se a linha de regressão da argentofilia, com a que resulta do tratamento pelo reativo de Schiff. Admite-se que a reação positiva, com o reativo de Schiff, dependa da presença de grupos carbonila, ou de produtos de oxidação de lípides insaturados (LISON, 1932; 1960). O bloqueio pelo cloridrato de anilina confere especificidade à reação, uma vez que se admite que apenas o grupo carbonila é passível de bloqueio (LISON, 1960; PEARSE, 1961). Além disso, foram usados, no presente trabalho, cortes de material incluído em parafina, portanto, pobre em lípides; consequentemente, não parece provável que a positividade dos cortes tratados pelo reativo de Schiff possa, a não ser secundariamente, decorrer da presença de lípides. A êsse respeito, convém assinalar que o tratamento, pelo bicloreto de mercúrio, não interferiu na reatividade dos cortes ao reativo de Schiff. Este resultado sugere que, no material utilizado, também, os α -cetois não devem ser responsabilizados pela reatividade do reativo de Schiff. De acôrdo com DEMPSEY & BASSET (1943) e DEMPSEY & WISLOCKI (1944, 1946), o tratamento pelo bicloreto de mercúrio teria a propriedade de tornar Schiff positivos os α -cetóis.

De conformidade com o que foi discutido, os resultados referentes ao tratamento pelo reativo de Schiff, passíveis de bloqueio pelo cloridrato de anilina, foram interpretados como sendo devidos à presença de grupos carbonila.

A ausência de paralelismo entre a linha de regressão da intensidade da argentofilia e à correspondente a intensidade da côr desenvolvida pelo tratamento com o reativo de Schiff, foi interpretada como devido à ausência de correlação entre o grupo carbonila e a argentofilia.

A linha de regressão da reação do PAS, em função da

concentração da solução de tioglicolato, ou de oxalato, foi interpretada de acordo com o conceito admitido, em histoquímica, para o significado da reação do PAS. Assim sendo, essa linha de regressão constituiria uma estimativa dos grupos α -glicólicos, inclusive amino-substituídos, revelando, além do polissacarídeos, amino ácidos terminais dotados do grupo álcool-amino, tais como a serina, a hidroxilisina e a treonina (NICOLET & SHINN, 1939, 1941). A influência dos lípidos, sobre a reação do PAS, foi considerada em segundo plano, uma vez que os cortes empregados provinham de material incluído em parafina.

A falta de paralelismo entre a linha de regressão da argentofilia e a correspondente à reação do PAS, indica que a intensidade da argentofilia não apresenta relação com a quantidade de grupos α -glicólicos, simples ou substituídos. Aliás, o tratamento dos cortes histológicos tanto pelo tioglicolato, quanto pelo oxalato, não produz modificação da intensidade da reação do PAS.

Com o escopo de estimar a reatividade de grupos eletropolares das proteínas, tais como os grupos imidazol, fenol e carboxila, foram empregadas: a) reação de Millon com a finalidade de evidenciar grupos fenólicos, especialmente da tirosina e do triptofano; b) basofilia pelo azul de toluidina, cujo escopo foi indicar a presença de grupos ácidos livres, inclusive o grupo COOH; c) coloração pelo amarelo de naftol S, cuja finalidade foi evidenciar grupos eletropositivos livres, tais como os grupos amino, guanidil e imidazol (DEITCH, 1955).

A comparação entre as linhas de regressão da intensidade da coloração obtida com as três técnicas referidas e a linha de regressão da intensidade da argentofilia, revela que a argentofilia não apresenta relação com os grupos eletropolares estudados.

Os resultados discutidos, revelam que o mecanismo da impregnação argêntica pelas técnicas rápidas, difere do observado nas técnicas lentas. Por esse motivo, aventou-se a hipótese de que a relação entre a argentofilia e a intensidade da reação do azul da Prússia constituisse fator importante do mecanismo da impregnação argêntica, nas técnicas rápidas.

A estimação histofotométrica do íon férrico, revelada através da reação do azul da Prússia, nos cortes de baço e fígado, de rato e porco, tratados por solução de tioglicolato ou de oxalato, apresenta estreita correlação com a intensidade da argentofilia. A comparação entre o coeficiente de regressão da

intensidade da reação do azul da Prússia, em função das concentrações das soluções de tioglicolato ou de oxalato, e o coeficiente de regressão da argentofilia, revela paralelismo entre ambas as linhas de regressão. Esta correlação sugere que a argentofilia, demonstrada pelas técnicas rápidas de impregnação argêntica, dependa da quantidade de íon férrico, demonstrável histoquimicamente. Este resultado, por outro lado, concorda com os obtidos por HADLER & col. (1964,1967), os quais verificaram correlação entre a quantidade de íon férrico, contido nos tecidos, e a intensidade da argentofilia. Essa correlação foi observada tanto quando o íon Fe^{+++} era parcialmente removido, pelo tratamento de cortes histológicos com o tioglicolato, como quando a variação da quantidade de material azul da Prússia positivo era provocada através do uso de ~~pações~~ contendo quantidades diferentes de ferro.

Os resultados sugerem, portanto, que a argentofilia, resultante das técnicas rápidas de impregnação, seja independente da presença de grupos redutores (tais como S-H e carbonila) e de grupos eletropolares contidos nas proteínas (grupo imidazol; fenol; carboxila); sugere, também, estreita relação entre a intensidade da argentofilia e a quantidade do íon férrico, fazendo supor que, no mecanismo da impregnação argêntica, efetuada pelas técnicas rápidas, o ferro desempenhe papel importante. Esta hipótese será testada na segunda parte deste trabalho.

IMPORTÂNCIA DA PRESENÇA DO ÍON FÉRRICO
CO NA IMPREGNAÇÃO ARGÊNTICA PELAS TÉCNICAS RÁPIDAS

HADLER & col. (1964) mostraram que íons metálicos, tais como o Ca^{++} e o Fe^{+++} , induzem argentofilia, demonstrada através de técnica rápida de impregnação argêntica, quando unidos à substâncias de natureza protéica (gelatina; ovalbumina; α e β globulina), ou lipídica (fosfolípidos). Estes dados foram obtidos em modelos de papel de filtro, nos quais as substâncias a serem estudadas eram depositadas. Através dessa técnica, demonstraram que a gelatina, quando colocada em fixadores contendo cálcio, ou ferro, liga-se a êsses cátions; essa ligação não é rompida pelo tratamento com solução de EDTA a 1%. Por outro lado, a gelatina ligada ao cálcio, ou ao ferro, tornava-se argentófila.

Êsses mesmos autores, em trabalho posterior (1967), verificaram novos fatos em favor da hipótese que correlaciona a impregnação argêntica, pelas técnicas rápidas, e a presença de cátions, especialmente o íon Fe^{+++} ; mostraram que sais simples de ferro e de outros metais (Cu, Ba, Ca, Co, Sn), também são argentófilos, desde que o respectivo metal se apresente ionizável. Observaram que a carga eletrostática do íon férrico é importante, nesse particular, uma vez que a reação do azul da Prússia, efetuada previamente, inibe a argentofilia, provavelmente por "bloquear" o íon férrico. Concluíram que, para confe

rir argentofilia, o ferro deve se apresentar sob forma ionizável.

Por outro lado, HADLER & col. (1967) mostraram que, após a impregnação argêntica, a reação do azul da Prússia da gelatina ligada ao Fe se torna negativa, provavelmente porque a prata metálica se deposita sobre o íon férrico, "bloqueando" sua reatividade. A reatividade do íon Fe^{+++} , no entanto, pode ser revertida se a prata reduzida for removida pelo tratamento com solução iodo-iodurada.

Todos esses resultados revelam estreita relação entre íons metálicos, especialmente o íon férrico, e a argentofilia.

Corroboram, também, com a hipótese que correlaciona íons eletropositivos e a impregnação argêntica, os resultados obtidos por GOLDBLATT & col. (1965). Estes verificaram que tecidos fixados por solução de tetróxido de ósmio, quando tratados por solução contendo o íon "argento-diamina", apresentam deposição de prata metálica, nas estruturas em que havia se depositado o tetróxido de ósmio.

Não obstante haver diversas evidências em favor da hipótese citada, a primeira vista parece paradoxal que um íon eletropositivo possa induzir deposição de outro íon eletropositivo, tal como o íon "argento-diamina". HANKER & col. (1964, 1966) mostraram ser possível a deposição específica de um metal, ^{sobre outro metal,} desde que fosse usado um intermediário entre dois íons metálicos. Esse intermediário, que estabelece a ligação entre os dois elementos dotados de carga positiva, foi denominado "ligante multidentado" e apresenta grande interesse em microscopia eletrônica (SELIGMANN, WASSERKRUG & HANKER, 1966; STERNBERGER & col., 1963)

Atuam como "ligantes multidentados" a tiocarboidrazida, a carboidrazida, o tetraetilenopentamina. HANKER & col., (1966) conseguiram, através desta técnica, deposição de negro de ósmio sobre estruturas ligadas ao ósmio, paládio, mercúrio e uranila, após o tratamento com tiocarboidrazida.

Baseado nesses resultados, HADLER & col. (1967) aventaram a hipótese de que as técnicas rápidas de impregnação argêntica consistiam na ligação do íon Ag^+ à outros íons metálicos (especialmente o íon Fe^{+++}), presentes nos tecidos. Esta hipótese foi testada através do emprêgo de um "ligante multidentado" (hexametilenotetramina), em modelos de papel de filtro. Os resultados obtidos foram favoráveis à hipótese citada.

Como decorrência dos resultados anteriormente citados e do efeito dos "ligantes multidentados", no que se refere à deposição de íons metálicos sobre outros íons metálicos, foi planejada a segunda parte do presente trabalho. No planejamento foram considerados os seguintes itens: 1) HADLER & col.(1964) empregaram produtos complexos e relativamente impuros (gelatina, ovalbumina e globulinas), nos quais introduziram o íon metálico; no presente trabalho empregou-se, além de gelatina, uma proteína mais simples e pura, a insulina, na qual foram introduzidos íons metálicos durante a fixação; 2) HADLER & col.(1967) verificaram que sais inorgânicos de ferro são argentófilos; neste trabalho foram empregados sais orgânicos de ferro, formados durante a fixação, os quais foram estudados quanto à argentofilia; 3) HADLER & col. (1967), para testar a hipótese que admite resultar a argentofilia da presença de um íon metálico sobre o qual se liga o íon Ag^+ , tendo como intermediário um "ligante multidentado", usaram apenas a hexametilenotetramina; julgou-se conveniente, no presente trabalho, empregar outros ligantes pertencentes ao mesmo grupo, com ação previamente comprovada, no que concerne à deposição de ósmio sobre núcleos do mesmo metal. Com essa finalidade usou-se a tiocarboidrazida e a carboidrazida, ligantes eficazes, no que se refere à microscopia eletrônica (HANKER & col., 1966). Foi, também testada a ação da amônia como ligante.

MATERIAL E MÉTODOS

Duas técnicas diferentes foram utilizadas, quais sejam: Técnica em papel de filtro (spot-test); Técnica histológica.

I- TÉCNICA EM PAPEL DE FILTRO

Sobre fragmentos de papel de filtro Whatman 1, com 2,5 x 1,5 cm, previamente tratados, colocou-se 0,05ml de uma solução contendo a substância a ser testada, em área circular com 0,5cm de diâmetro. Esses fragmentos foram, posteriormente, submetidos à fixação, ao tratamento por solução de EDTA e à impregnação argêntica.

A- Pré tratamento do papel de filtro- Antes de ser depositada a solução contendo o produto a ser testado, os fragmentos de papel foram submetidos à metilação (técnica de WIGGLESWORTH, 1952, segundo FISHER & LILLIE, 1954), lavados em água destilada e, em seguida, mergulhados durante 2 horas em solução de peridrol a 40%, em temperatura ambiente. Foram novamente lavados em água destilada e tratados, durante 40 minutos, a 60°C, por solução de EDTA 1%, pH 4,0. Nova lavagem com água destilada, durante 2 horas, foi efetuada. Os papéis assim tratados reagem negativamente à reação do azul da Prússia.

B- Substâncias usada:

1) Gelatina - Gelatina comercial foi purificada da seguinte maneira: 10g. de gelatina foram tratados, durante 24 horas, por 100ml de mistura metanol-clorofórmio (1 : 1); após centrifugação, o resíduo foi seco a 37°C e, em seguida, dissolvido em 500ml de água destilada. O pH dessa solução foi ajustado a 10,0, através da adição de solução 0,1 M de OHN_3 . Após repouso de 24 horas a 4°C, juntou-se 30ml de solução 0,5 M de ácido tricloroacético; o precipitado foi separado por centrifugação (2.000 rpm durante 1 hora) e redissolvido em 500 ml de água bidestilada, deionizada. A solução assim obtida foi dializada contra água bidestilada, deionizada durante 24 horas, a 4°C. Após a diálise, a solução foi mantida em estufa a 50°C e o produto seco foi pulverizado. Esse produto foi empregado, no

presente trabalho, em solução a 2%.

2) Insulina- A insulina comercial, foi purificada da seguinte maneira: 10 mg de insulina "pura" foram dissolvidos em 5ml de água destilada e, em seguida, precipitados através de adição de gotas de solução 0,1 M de HCl (pH aproximadamente 3,5); o precipitado foi separado por centrifugação (2.000 r.p.m., durante 20 minutos) e redissolvido em 10ml de água destilada, sendo o pH elevado a 7,0, pela adição de solução 0,1 M de Na OH; a solução obtida foi dializada contra água destilada deionizada e o volume do solvente foi reduzido, de forma que a concentração final da solução fôsse 2% do peso original.

3) Sais de ferro - Foram utilizados o oleato e o palmitato de ferro, preparados da seguinte maneira: 0,05 ml de solução a 2% de ácido palmítico, ou de ácido olêico, em éter etílico, foram depositados em fragmentos de papel de filtro previamente preparados, em área circular com 5mm de diâmetro. Os sais de ferro respectivos foram obtidos por tratamento dos papéis com solução contendo 1% de cloreto férrico.

C- Tratamento dos modelos de papel de filtro: Os modelos de papel, contendo solução de insulina, gelatina, ou de ácido graxo, foram tratados por solução a 1% de cloreto férrico, durante 12 horas, em temperatura ambiente. Outros modelos de papel contendo gelatina, insulina e ácidos graxos foram tratados por solução de formalina a 15%, contendo 1g% de cloreto férrico.

Os modelos de papel foram lavados em água destilada e tratados por solução a 1% de EDTA, em pH 4,0, durante 20 minutos, a 60°C. Em seguida, foram lavados cuidadosamente, em água bidestilada, deionizada, e secos em temperatura ambiente.

D- Reação do azul da Prússia- Como finalidade de verificar a presença do íon férrico, nos modelos de papel, após o tratamento por solução de cloreto férrico (seguida do tratamento com EDTA), foi usada a reação do azul da Prússia. Essa reação foi efetuada pela técnica preconizada por HADLER & col. (1965b).

E- Impregnação argêntica-

1) "Técnica clássica"- A impregnação argêntica foi efetuada pela técnica do RIO HORTEGA (1919), modificada por HADLER (1962), usando-se, no entanto, solução de formol a 5%, como redutor; a redução foi efetuada sob forte agitação, para diminuir a intensidade de coloração do fundo.

A solução de "argento-diamina", usada na técnica ci-

tada, apresenta pH 11,5; além desse pH, foi usada essa solução com pH ajustado a 8,0, 9,0 e 10,0, através da adição de HNO_3 , em solução 0,1M.

2) Técnica de impregnação argêntica usando sal simples de prata- Nesta técnica, a solução de "argento-diamina" foi substituída por um sal simples de Ag. O sal usado foi o nitrato de prata, em solução 0,1 M. Como redutor usou-se solução de formalina a 5%. A redução foi feita sob forte agitação.

F- "Ligante multidentado"- Como "ligantes multidentados" foram usados: a) hexametilenotetramina, em solução a 1%, pH 11,5, ajustado pela adição de solução 0,1 M de hidróxido de sódio. Além de solução com esse pH, foram usadas, também, soluções de hexametilenotetramina com pH 8,0, 9,0 e 10,0. Para baixar o pH foi usada solução de ácido nítrico 0,1 M; b) Carbo-hidrazida, em solução a 1%; foram usadas soluções com os mesmos pH das soluções de hexametilenotetramina; c) tiocarbo-hidrazida, em solução a 0,1%, em pH 8,0, 9,0, 10,0 e 11,5; d) amônia, em solução a 1%, nos mesmos pH citados; e) semicarbazida, em solução a 1%, pH 11,5.

Os modelos de papel de filtro foram mergulhados na solução do "ligante", onde permaneceram 2 minutos, à temperatura ambiente; modelos de papel de filtro que atuaram como contrôle, foram mergulhados em água bidestilada, cujo pH foi elevado a 11,5 através da adição de solução de hidróxido de sódio. Após esse tratamento os modelos foram lavados cuidadosamente, em água destilada, durante 1 minuto, e mergulhados na solução de nitrato de prata.

II- TÉCNICA HISTOLÓGICA

Cortes de fígado e baço de rato e de porco, obtidos da maneira descrita na primeira parte do presente trabalho, foram utilizados para comparar a intensidade da impregnação argêntica, quando é empregada a técnica de RIO HORTEGA (1919), modificada por HADLER (1962) e a técnica do tratamento por "ligante multidentado", seguida do tratamento por solução de sal simples de prata. As técnicas de impregnação argêntica, usadas com esta finalidade, foram as mesmas descritas anteriormente.

A comparação entre as duas técnicas de impregnação foi realizada em cortes histológicos, prviamente tratados por soluções de tioglicolato, com concentrações diferentes. O método empregado foi o mesmo descrito na primeira parte dêste trabalho.

A comparação entre os resultados obtidos com a "técnica clássica" de impregnação argêntica e a técnica do "ligante" mais nitrato de prata, foi efetuada através da histofotometria dos cortes histológicos correspondentes. O método usado foi o descrito na primeira parte deste trabalho.

III- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi efetuada de maneira semelhante à descrita na primeira parte deste trabalho.

RESULTADOS

1- MODELOS DE PAPEL DE FILTRO

O emprêgo de modelos de papel de filtro permite verificar que tanto a insulina quanto a gelatina ligam-se ao íon Fe^{+++} , quando os modelos de papel são mergulhados em solução de sal férrico, ou em fixador contendo sal de ferro. O mesmo ocorre com os ácidos graxos. Após êste tratamento, passam a reagir positivamente à reação do azul da Prússia, mesmo após tratamento por solução de EDTA; cumpre salientar que a insulina, a gelatina purificada, o ácido oleico e o ácido palmítico, usados como contrôle, não são positivos à reação do azul da Prússia.

Quando submetidos à impregnação argêntica, pelo tratamento com solução de "argento-diamina", as substâncias prêviamente referidas, quando ligadas ao ferro, apresentam argen-tofilia, ao passo que estas mesmas substâncias, quando não ligadas ao Fe e usadas como contrôle, não apresentam a propriedade de se impregnarem pela prata.

A impregnação argêntica, tanto de proteínas ligadas ao ferro, quanto de sais de ferro, sômente se verifica quando se emprega a solução de sal de "argento-diamina". A substitui-ção desta solução por outra de nitrato de prata, impede a im-pregnação argêntica. No ontanto, se antes do tratamento por solução de nitrato de prata, os modelos de papel de filtro, contendo as substâncias assinaladas, são tratados por solução contendo um "ligante multidentado", a impregnação argêntica se verifica. Resultados bastante semelhantes aos obtidos com a im-pregnação argêntica pelo íon "argento-diamina" são conseguidos quando se procede o prê tratamento com solução de hexametileno tetramina, tiocarbo-hidrazida, carbo-hidrazida e amônia, seguido de posterior tratamento por solução de nitrato de prata e redução pelo formol. A eficiência dos "ligantes multidentados" usados, nas concentrações empregadas, é aparentemente semelhante e semelhante, também, à eficácia da amônia. A semicarbazida (ligante monodentado) não apresenta êsse efeito; o tratamento por solução de semicarbazida não determina impregnação argêntica, quando se efetua posterior tratamento por solução de nitrato

de prata.

O pH da solução do "ligante multidentado" influi em sua eficiência, quanto à propriedade de determinar impregnação argêntica, através do emprêgo de solução de nitrato de prata. Quando o pH da solução do "ligante" é 8,0 ou 9,0 não ocorre impregnação; em pH 10,0 a impregnação é parcial; em pH 11,5 a intensidade da impregnação é grande. Efeito semelhante, da influência do pH sobre a impregnação argêntica, se verifica quando são usadas soluções de "argento-diamina". Nesta eventualidade, também não ocorre impregnação em pH 8,0 e 9,0; a impregnação é parcial em pH 10,0 e intensa em pH 11,5.

2- CORTES HISTOLÓGICOS

O tratamento prévio de cortes de fígado e baço, de ambas as espécies animais estudadas, por solução de um "ligante multidentado", ou de amônia, torna êstes cortes passíveis de serem impregnados pela prata, quando tratados por solução de nitrato de prata. Nestas circunstâncias, tanto os hepatocitos e as células de Kupffer, quanto as células reticulares do baço, se impregnam por essa técnica. A impregnação argêntica, assim obtida, é semelhante à que ocorre quando se emprega a "técnica clássica" de impregnação, que usa solução de "argento-diamina".

A estimação histofotométrica da intensidade da impregnação argêntica permite comparar os resultados obtidos com a "técnica clássica" de impregnação, em relação aos conseguidos com o tratamento por "ligante" mais nitrato de prata. Além disso, permite comparar a eficiência dos diversos "ligantes" usados. Estes resultados estão projetados nos gráficos (21-22-23-24); revelam que a "técnica clássica" é a mais eficiente, sendo a ordem de eficiência dos "ligantes" usados a seguinte: amônia, hexametilenotetramina, tiocarbo-hidrazida e carbo-hidrazida.

A estimação histofotométrica da intensidade da argêntofilia, em função do pH da solução do "ligante" usado, confirma os resultados obtidos em modelos de papel de filtro (gráficos 25-26); a intensidade da impregnação argêntica aumenta com a elevação do pH, dentro dos limites usados no presente trabalho.

Os resultados histofotométricos mostram que, a correlação entre a intensidade da reação do azul da Prússia e a intensidade da argêntofilia ocorre tanto quando se usa a "técnica clássica" de impregnação, quanto quando se efetua o tratamento por "ligantes" seguido de solução de nitrato de prata. Por

outro lado, o coeficiente de regressão da intensidade da argentofilia sobre a concentração da solução de tioglicolato, não difere, significativamente, quando resultados obtidos pela técnica clássica de impregnação são comparados com os fornecidos pelo tratamento com "ligante multidentado" mais solução de nitrato de prata (gráficos 21-22-23-24). Além disso, quando os diversos "ligantes" usados são comparados entre si, não se verifica diferença significativa quanto ao valor dos respectivos coeficientes de regressão (Tabela V; gráficos 21-22-23-24).

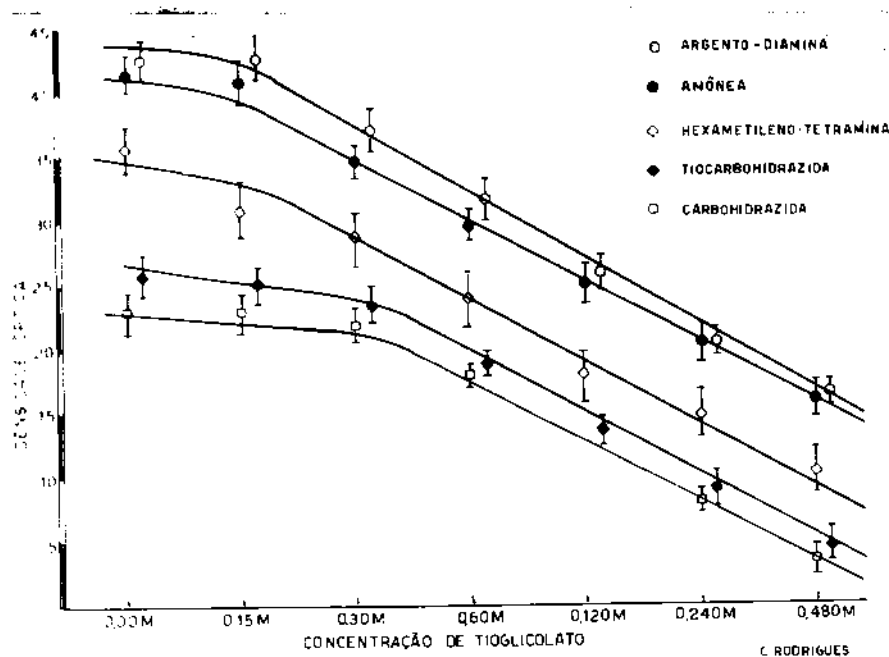


Gráfico 21- Cortes de baço de rato tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, efetuada pela "técnica clássica". Comparação entre a impregnação argêntica, efetuada pela "técnica clássica", e a obtida através do emprêgo de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

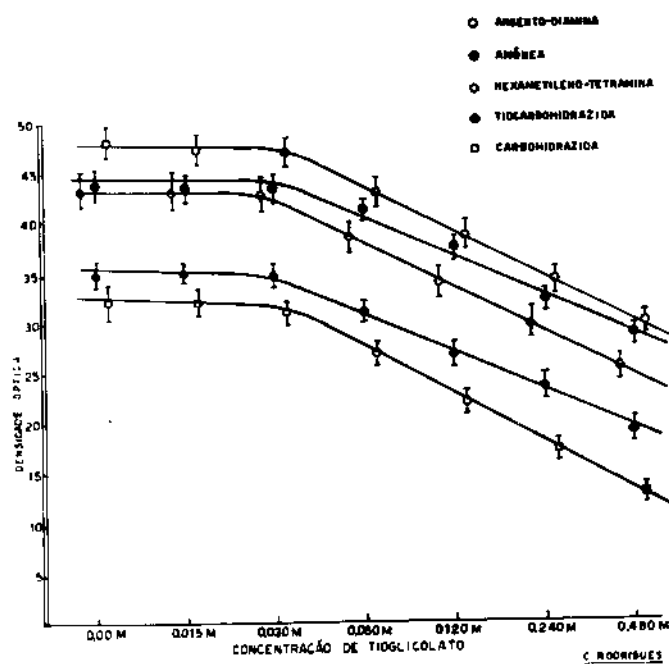


Gráfico 22- Cortes de baço de porco tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, efetuada pela "técnica clássica". Comparação entre a impregnação argêntica efetuada pela "técnica clássica" e a obtida através do emprêgo de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

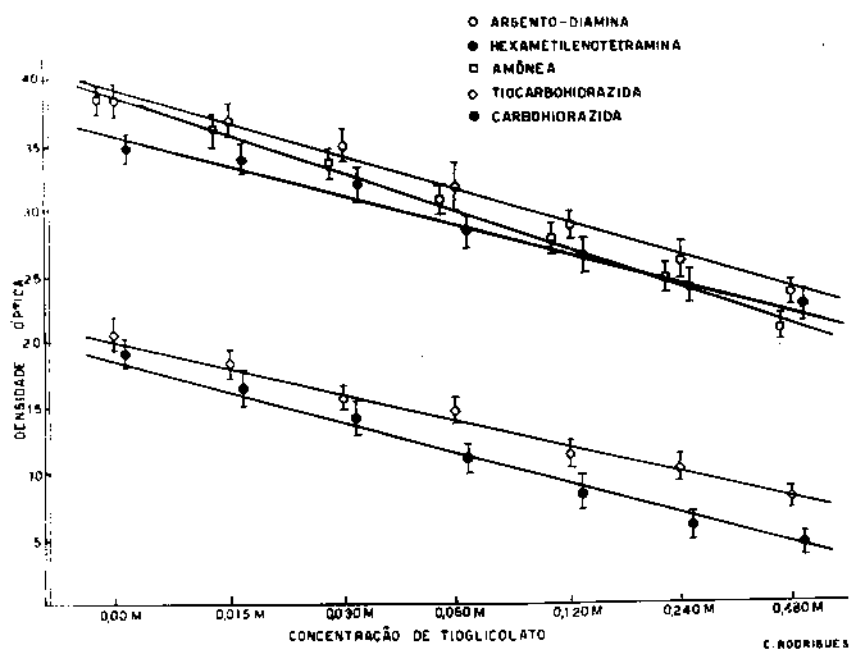


Gráfico 23- Cortes de fígado de rato tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, efetuada pela "técnica clássica". Comparação entre a impregnação argêntica efetuada pela "técnica clássica" e a obtida através do emprêgo de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

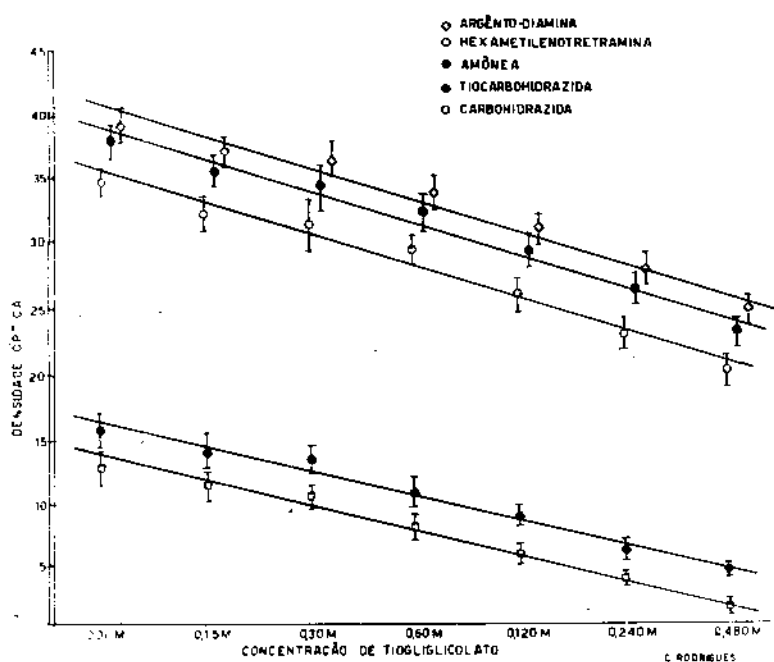


Gráfico 24- Cortes de fígado de porco tratados por soluções de tioglicolato com concentrações crescentes. Ação do tratamento pelo tioglicolato sobre a intensidade da impregnação argêntica, efetuada pela "técnica clássica". Comparação entre a impregnação argêntica efetuada pela "técnica clássica" e a obtida através do emprêgo de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

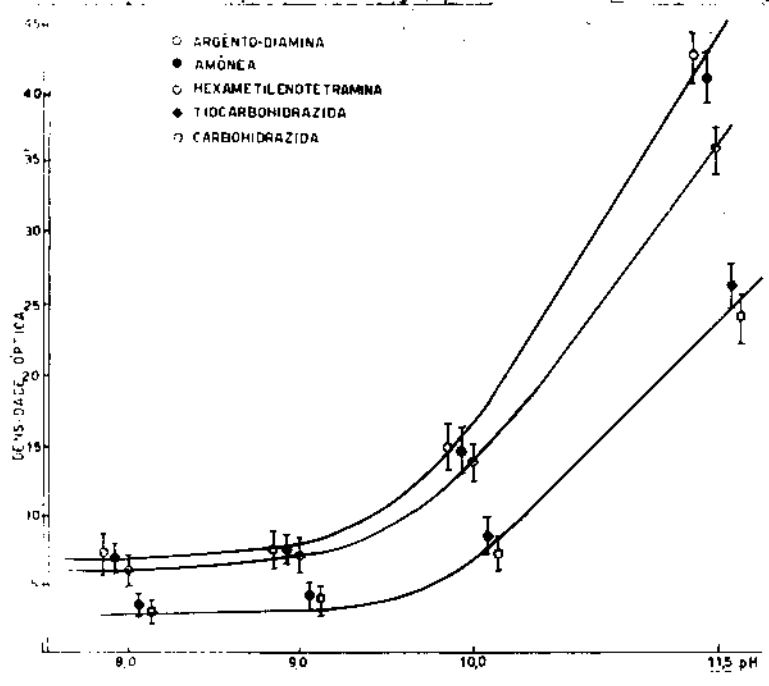


Gráfico 25-Cortes de baço de rato. Ação do pH da solução de "argento diamina" sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação do efeito do pH sobre a impregnação argêntica efetuada pela "técnica clássica" e a obtida através do emprego de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

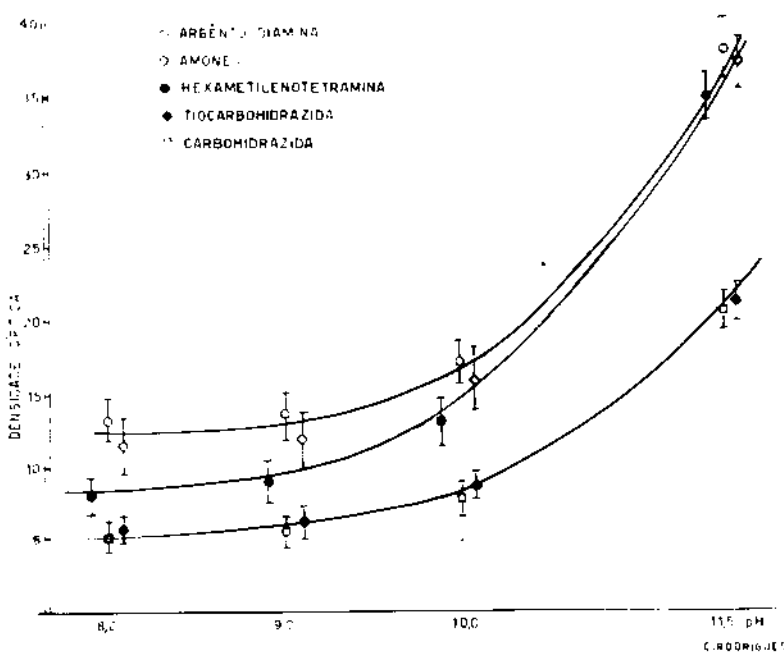


Gráfico 26- Cortes de fígado de rato. Ação do pH da solução de "argento-diamina" sobre a intensidade da impregnação argêntica, estimada histofotometricamente. Comparação do efeito do pH sobre a impregnação argêntica efetuada pela "técnica clássica" e a obtida através do emprego de um "ligante" mais solução de nitrato de prata.

T A B E L A V

Comparação entre a impregnação argéntica efetuada pela técnica clássica (argentodiamina) e a realizada através do emprêgo de um ligante mais solução de nitrato de prata.

Os resultados da tabela correspondem aos valores do coeficiente de regressão (b) da intensidade da argentofilia, obtida em cortes tratados por soluções de tioglicolato de sódio com concentrações crescentes.

LIGANTE	B A Q O		F Í G A D O	
	RATO	PORCO	RATO	PORCO
Argento-diamina	-4,790 $\pm$ 0,162	-4,350 $\pm$ 0,175	-2,371 $\pm$ 0,286	-2,386 $\pm$ 0,190
Amônia	-4,680 $\pm$ 0,215	-3,670 $\pm$ 0,301	-2,886 $\pm$ 0,215	-2,379 $\pm$ 0,201
Hexametileno-tetramina	-4,540 $\pm$ 0,153	-4,390 $\pm$ 0,178	-2,175 $\pm$ 0,197	-2,400 $\pm$ 0,159
Tiocarbo-hidrazida	-4,750 $\pm$ 0,105	-4,000 $\pm$ 0,147	-2,718 $\pm$ 0,189	-1,914 $\pm$ 0,185
Carbohidra-zida	-4,640 $\pm$ 0,143	-4,540 $\pm$ 0,193	-2,443 $\pm$ 0,171	-2,071 $\pm$ 0,168

As diferenças entre os valores do coeficiente de regressão (b), obtidos em um mesmo órgão, de uma mesma espécie animal, não são significativas.

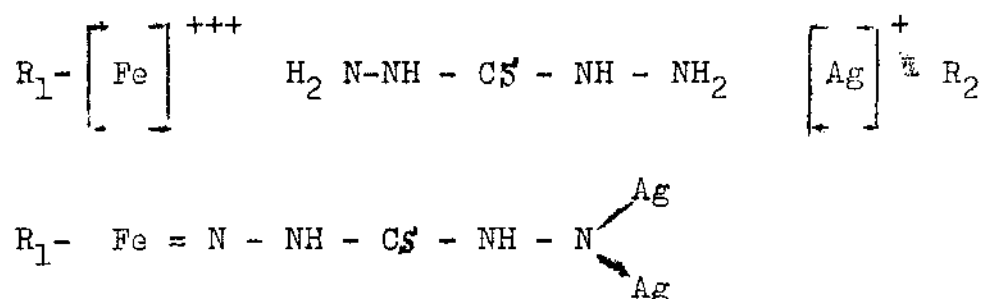
DISCUSSÃO

Os resultados obtidos em modelos de papel de filtro confirmam a correlação entre a presença do íon férrico e a argentofilia; além disso, revelam que é possível induzir argentofilia às proteínas purificadas e ácidos graxos, através da ligação prévia, dessas substâncias, com o íon férrico. A argentofilia, induzida por esta técnica, é revelada quando se emprega a "técnica clássica" de impregnação argêntica, que consiste no tratamento por solução de "argento-diamina" seguido da redução por solução de formalina.

Admite-se que a solução de "argento-diamina" é indispensável, para que se efetue a impregnação argêntica e não pode ser substituída por soluções de sais simples de prata, tal como nitrato de prata (RIO HORTEGA, 1943). O emprêgo de solução de nitrato de prata não revela a argentofilia assim induzida, de acordo com nossos resultados. No entanto, se for efetuado o pré tratamento dos modelos de papel de filtro, ou dos cortes de tecido, por solução de um "ligante multidentado" (hexametileno-tetramina, tiocarbo-hidrazida, carbo-hidrazida), ou por solução de amônia, o emprêgo de solução de nitrato de prata, seguido pelo tratamento com solução de formalina, determina impregnação argêntica. Estes resultados revelam a importância dos "ligantes", no que concerne a união entre o íon Ag^+ e o íon Fe^{+++} .

Foi bem verificado que a tiocarbo-hidrazida e outros "ligantes multidentados", além de serem bons doadores de elétrons, apresentam a propriedade de interligar dois metais (HANKER & col., 1966), atuando como ponte de ligação. Segundo HANKER & col. (1964) e SELIGMAN & col. (1964, 1965) a tiocarbo-hidrazida, da mesma forma que os outros "ligantes multidentados", se uniria, através de um dos seus grupos hidrazida, ao metal fixado ao tecido, permanecendo livre o outro grupo hidrazida, capaz de ligar-se a outro íon metálico. Estes fatos, que foram observados em tecidos fixados pelo tetróxido de ósmio, parecem ocorrer, também, em tecidos fixados pela formalina, assim como em modelos de papel de filtro fixados ou não. Nesses últimos casos, a presença do íon férrico, tanto em tecidos, quanto em mo-

delos de papel de filtro contendo proteínas purificadas, ou sais de ácidos graxos, daria ensejo a união de um dos grupos hidrazida do "ligante multidentado"; o outro grupo hidrazida permaneceria livre e seria capaz de unir-se ao íon Ag^+ , conforme o seguinte esquema:



Esta hipótese foi aventada para explicar o mecanismo da impregnação argêntica pelas técnicas rápidas.

Vários argumentos são favoráveis a esta hipótese; assim, por exemplo, SELIGMAN & col. (1966) verificaram que, enquanto a tiocarbo-hidrazida apresenta a propriedade de interligar dois metais, a tiosemicarbazida, dotada de apenas um grupo hidrazida, não apresenta êsse efeito. Por outro lado, êstes mesmos autores, verificaram que a tiocarbo-hidrazida, além do ósmio, pode ligar-se, também, a outros metais, tais como: chumbo, cobre, urânio e zinco.

No que concerne ao mecanismo da impregnação argêntica pelas técnicas rápidas, nossos resultados revelam que a tiocarbo-hidrazida é eficaz, ao contrário da semicarbazida que é inativa. Esses resultados sugerem semelhança entre a impregnação argêntica, pelas técnicas rápidas, e o aumento de contraste de tecidos fixados pelo tetróxido de ósmio, através do tratamento por "ligante multidentado" seguido do tratamento por solução de tetróxido de ósmio.

Além disso, há outros argumentos favoráveis a esta hipótese. Dentre êstes, destaca-se o efeito do pH sobre a intensidade da impregnação argêntica. Quando se efetua impregnação argêntica pela "técnica clássica", a intensidade da impregnação aumenta com o aumento do pH. Quando a impregnação é efetuada através do emprêgo de uma solução de "ligante", seguida pelo tratamento por solução de nitrato de prata, verifica-se comportamento bastante semelhante, no que diz respeito ao efeito do pH. Estes resultados sugerem semelhança, quanto ao mecanismo de ação, entre a "argento-diamina" e o "ligante" mais sal de prata. Sugere, também, que a "argento-diamina" apresente condição com

parável à apresentada pelo íon Ag^+ mais "ligante". Isto permite supor que o grupo "diamina" funcione como um "ligante". Corrobora com esta interpretação os resultados obtidos quando a amônia é usada como "ligante".

A correlação entre a presença do íon férrico e a argentofilia, e a possibilidade dessa argentofilia ser revelada, tanto pela "técnica clássica" de impregnação argêntica, quanto pelo tratamento por "ligante" mais sal de prata, pôde ser verificada em cortes histológicos e em modelos de papel de filtro. O material histológico permitiu estimação quantitativa, efetuada histofotométricamente. A comparação dos resultados quantitativos revelou semelhança entre a impregnação argêntica, obtida com a "técnica clássica", e a encontrada quando se usa um "ligante multidentado" mais solução de nitrato de prata. A comparação entre as linhas de regressão da intensidade da argentofilia, sobre a quantidade de íon férrico demonstrável histoquimicamente, mostra paralelismo entre a linha de regressão obtida pelo emprêgo da "técnica clássica" e as fornecidas pela técnica do tratamento por "ligante" mais sal de prata. Deve ser salientado, no entanto, que ocorrem variações de grau, quanto a intensidade da impregnação argêntica; esta variação parece depender de propriedades inerentes aos "ligantes" usados, uma vez que a intensidade de impregnação difere para cada "ligante".

De acôrdo com o que foi discutido, o mecanismo de impregnação argêntica, pelas técnicas rápidas, parece consistir na ligação entre o íon férrico, ou outro cation eventualmente presente nos tecidos, e o íon Ag^+ , através da interposição de um "ligante multidentado".

CONCLUSÃO

Através do tratamento por solução de tioglicolato, ou de oxalato, com concentrações crescentes, foi possível provocar diminuição progressiva da intensidade da argentofilia, em ~~cortes~~ cortes de fígado e baço, de rato e porco, passível de ser estimada histoquimicamente. O coeficiente de regressão da intensidade da argentofilia, sobre a concentração das soluções de tioglicolato (ou de oxalato), foi tomada como parâmetro do efeito desse tratamento. Em cortes desses mesmos órgãos, submetidos a esse mesmo tratamento, foram efetuadas diversas reações histoquímicas, tendo sido estabelecidas as respectivas regressões da intensidade das reações, sobre a concentração das soluções de tioglicolato (ou oxalato); os respectivos coeficientes de regressão foram tomados como parâmetro.

A comparação do coeficiente de regressão da argentofilia com os coeficientes obtidos para as reações efetuadas revelou o seguinte:

1- A linha de regressão da intensidade da argentofilia não apresenta paralelismo com as linhas de regressão ~~or~~ respondentes à reação do ferricianeto férrico, ao tratamento pelo reativo de Schiff, à reação do PAS, à reação de Millon, à coloração pelo azul de toluidina e à coloração pelo amarelo de naftol S.

2- Estes resultados sugerem ausência de correlação entre a argentofilia e a presença de grupos redutores (S-H e carbonila), de grupos 1-2-glicólicos, assim como de alguns ~~gru~~ grupos reativos de proteínas (fenol; imidazol; carboxílico).

3- A linha de regressão da intensidade da argentofilia apresenta paralelismo com a da intensidade da reação do azul da Prússia.

4- Este resultado revela correlação entre a argentofilia e o íon férrico presente nos tecidos.

O emprêgo de modelos de papel de filtro, além de confirmar a correlação entre a argentofilia e a presença do íon férrico, mostra que:

5- A argentofilia pode ser revelada tanto através

do emprêgo da solução de "argento-diamina", quanto do tratamento por solução de um "ligante multidentado" seguido de tratamento por solução de nitrato de prata.

6- Este resultado sugere que, na impregnação argêntica, ocorra ligação entre o íon Fe^{+++} e o íon Ag^+ , através da interposição de um "ligante multidentado".

7- Vários argumentos são favoráveis a esta hipótese:

a) A tiocarbo-hidrazida ("ligante multidentado") apresenta a propriedade de interligar o íon Fe^{+++} ao íon Ag^+ , enquanto que a semicarbazida ("ligante monodentado") não apresenta essa propriedade.

b) A intensidade da impregnação argêntica, pela "técnica clássica", aumenta progressivamente, com a elevação do pH, o que também ocorre quando a impregnação é efetuada através do tratamento por "ligante multidentado" mais solução de nitrato de prata.

c) Em cortes histológicos, tratados pelo tioglicolato, as linhas de regressão da intensidade da argentofilia, obtidas através tanto da "técnica clássica" quanto do tratamento por "ligante" mais solução de sal de prata, são paralelas.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS, C.W.M. A stricter interpretation of the ferri ferricyanide reaction with particular reference to the demonstration of protein-bond sulphydril and disulphide groups. *J.Histochem.Cytochem.* 4:23-35, 1956.
- ANSON, M.L. The denaturation of proteins by synthetic detergents and bile salts. *J.Gen.Physiol.* 23:239-246, 1939.
- ANSON, M.L. The sulphydril groups of egg albumin. *J.Gen.Physiol.* 24:399-421, 1941.
- ANSON, M.L. Some factors which influence the oxidation of sulphydril groups. *J.Gen.Physiol.* 25:355-367, 1942.
- BOLSI, D. Considerazione teoriche sulla chimico-fisica della impregnazione dei tessuti con l'argento ridotto. *Riv. Pat. Nerv. Ment.* 32:553-564, 1927.
- BRYAN, J.H.D. & BILL, R.B. A silver-aldehyde reaction for studies of chromosome ultrastructure. *Quart.J.Micr.Sci.* 105:367-374, 1964.
- CAJAL, R. Un sensillo metodo de coloracion selectiva del reticulo protoplasmico. *Trab. del Lab. de Invest. Biol. de Univ. de Madrid* 2:129-135, 1903.
- CAJAL, R. Una formula de impregnacion argantica especialmente aplicable a los cortes del cerebelo y algunas consideraciones sobre la teoria de Liesegang, acerca del principio del metodo del nitrato de plata reducido. *Trab. del Lab. de Invest. Biol. de Univ. de Madrid* 19:71-93, 1921.
- CHEVREMONT, M. & FREDERICQ, J. Une nouvelle méthode histochimique de mise en évidence des substances à fonction sulphydrique. *Arch.Biol.* 54:589-605, 1943.
- CORDIER, R. L'argentaffinité en histologie. *Bull. Histol. Appl. Physiol. et Path.* 4:161-169, 1927.
- DAVID, G.B., MALLION, K.B. & BROWN, A.W. A method of silvering the "golgi apparatus" (Nissl networks) in paraffin sections of the central nervous system of vertebrates. *Quart. J.Micr. Sci.* 101:207-221, 1960.
- DEITCH, A.D. Microspectrophotometric study of the binding of the anionic dye. Naphtol yellow S by tissue sections and by purified proteins. *Lab. Invest.* 4:324-351, 1955.

- DEMPSEY, E.M. & BASSET, D.L. Observations on fluorescence, bi-refringence and histochemistry of rat ovary during reproductive cycle. *Endocrinology* 33:384-401, 1943.
- DEMPSEY, E.M. & WISLOCKI, G.B. Observations on some histochemical reactions in human placenta, with special reference to significance of lipoids, glicogen and iron. *Endocrinology* 35:409-429, 1944.
- DEMPSEY, E.M. & WISLOCKI, G.B. Histochemical contributions to physiology. *Physiol. Rev.* 26:1-27, 1946.
- PIESS, H.A. & KLOTZ, I.M. The termodinamics of metallo-protein combinations. Comparison of Copper complexes with natural proteins. *J.Am.Chem.Soc.* 74:887-891, 1952.
- FISHER, E.R. & LILLIE, R.D. Effect of methylation on basophilia. *J.Histochem.Cytochem.* 2:81-87, 1954.
- GOLDBLATT, P.J. & TRUMP, B.F. The application of Del Rio Hortega's Silver Method to Epon-Embedded Tissue. *Stain Techn.* 40:105-115, 1965.
- GRASSMANN, W. & KUSCH, D. Uber die binding von Ag und Pb-Ionen durch Kollagen. *Hoppe-Seyler Z. Physiol.Chem.* 290:216-222, 1952.
- GURD, F.R.N. & GOODMAN, D.S. Preparation and properties of Serum and Plasma Proteins, Part XXXII. The interaction of Human Serum-Albumin with Zn Ions. *J.Am.Chem.Soc.* 74:670-675, 1952.
- HADLER, W.A. Morfologia e distribuição das células reticulares do baço normal. Estudo efetuado mediante técnica de impregnação argêntica. Tese apresentada ao Concurso de Livre Docência à Cadeira nº2 da Faculdade de Medicina de Ribeirão Prêto do Est. de São Paulo. 1962.
- HADLER, W.A., LUCCA, O. de, VOZZA, J.A., PATELLI, A.S. & ZITI, L.M. Relação entre a presença de cations no fixador e a impregnação argêntica das células reticulares do baço. *Ciência e Cultura* 16:178, 1964.
- HADLER, W.A., LUCCA, O. de, TOLENTINO, M.M., PATELLI, A.S. & ZITI, L.M. Método histofotométrico para estimação do ferro demonstrável histoquímicamente. *Ciência e Cultura* 17:245-246, 1965a.
- HADLER, W.A., LUCCA O. de, ZITI, L.M., PATELLI, A.S. & VOZZA, J.A. Histoquímica do ferro; estudo das condições mais adequadas para o desenvolvimento da reação do azul da Prússia. *Ciência e Cultura* 17:248, 1965b.

- HADLER, W.A., LUCCA, O. de, PATELLI, A.S. & ZITI, L.M. Relação entre o fixador e a intensidade da reação do azul da Prússia. *Ciência e Cultura* 18:154-155, 1966.
- HADLER, W.A., LUCCA, O. de, ZITI, L.M. & PATELLI, A.S. Significado histoquímico da argentofilia decorrente das técnicas rápidas de impregnação pela prata. *Ciência e Cultura*, 19: 363-364, 1967.
- HANKER, J.S., SEAMAN, A.R., WEISS, L.P., UENO, H., BERGMAN, R. A. & SELIGMAN, A.M. "Osmiophilic Reagents: New Cytochemical Principle Light and Electron Microscopy". *Science* 146:1039-1043, 1964.
- HANKER, J.S., DEB, C., WASSERKRUG, H. & SELIGMAN, A.M. Staining tissue for light and electron microscopy by bridging metals with multidentate ligand. *Science* 152: 1631-1634, 1966.
- HOLMES, W. Silver staining of nerve axons in paraffin sections. *Anat. Rec.* 86:157-186, 1943.
- HOTCHKISS, R.D. A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structure in fixed tissue preparations. *Arch. Biochem.* 16:131-141, 1948.
- JAMES, T.H. & HIGGINS, G.C. Fundamentals of photographic theory. New York, Wiley. 1948.
- KLOTZ, I.M. & CURME, H.G. The thermodynamics of metallo-proteins combinations. Copper with bovine serum albumin. *J. Am. Chem. Soc.* 70:939-943, 1948.
- KLOTZ, I.M., FALLER, I.L. & URQUHART, J.M. Spectra of copper complexes with some proteins, aminoacids and related substances. *J. Physiol. Coll. Chem.* 54:18-32, 1950.
- KLOTZ, I.M. & FIESS, H.A. The thermodynamics of metallo-protein combinations. Buffer effects in copper albumin complexes. *J. Physiol. Coll. Chem.* 55:101-111, 1951.
- LIESEGANG, R.E. Die Kolloidchemie der histologischen Silberfärbungen. *Kolloidchem.* 3:1-46, 1911.
- LISON, L. Sur la spécificité du reactif Schiff envers les aldehydes. *Bull. Histol. Appl. Physiol. et Path.* 9:177-195, 1932.
- LISON, L. Histochemie et cytochemie animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthiers Villars. 1960.
- MARSHALL, A.H.E. A method for the demonstration of reticuloendothelial cells in paraffin sections. *J. Path. Bact.* 60:515-517, 1948.

- MCMANUS, J.F.A. The histological demonstration of mucs after periodic acid. *Nature* 158:202, 1946.
- NICOLET, B.H. & SHINN, L.A. Action of periodic acid on α -amino alcohols. *J.Am.Chem.Soc.* 61:1615-1939.
- NICOLET, B.H. & SHINN, L.A. The determination of serine by the use of periodate. *J.Biol.Chem.* 139:687-692, 1941.
- PALMGREN, A. A rapid method for selective silver staining of nerve fibres and nerve endings in monted paraffin sections *Acta Zool. Stockh.* 29:377-392, 1948.
- PEARSE, A.G.E. *Histochemistry; theoretical and applied.* London, J.& A.Churchill Ltda. 1961.
- PETERS, A. Experiments on the mechanism of silver staining. Part I Impregnation. *Quart.J.Micros.Sci.* 96:84-102, 1955a
- PETERS, A. Experiments on the mechanism of silver staining. Part II Development. *Quart.J.Micros.Sci.* 96:103-115, 1955b
- PETERS, A. Experiments on the mechanism of silver staining. Part III Quantitative studies. *Quart. J. Micros. Sci.* 96:301-315, 1955c
- POLAK, M. Sobre una variante a la técnica de Rio Hortega para la impregnation de celulas reticulo endoteliales normales y patologicas, micro y oligodendroglia, barrera epitelial argentofila, elementos neurologicos blastomatosos, etc *Arch. Histol.(B.Air)* 6:220-222, 1956.
- RAO, M.S.N. & LAL, H. Metal protein interactions in buffer solutions. Part II A polarographic study of the interaction of Zn" and Cd" with bovine Serum-Albumin. *J.Am.Chem.Soc.* 80:3222-3226, 1958a.
- RAO, M.S.N. & LAL, H. Metal protein interactions in Buffer solutions. Part III Interaction of Cu", Zn", Cd", Co" (and Ni") with Native and Modified Bovine Serum-Albumins. *J.Am.Chem.Soc.* 80:3226-3235, 1958b.
- RIO HORTEGA, P. del El tercer elemento de los centros nerviosos. Poder fagocitáριο y movilidad de la microglia. *Boletin de la Sociedad española de Biologia* 9:68-83, 1919.
- RIO HORTEGA, P. del Estabilizacion de las coloraciones cromo-argenticas. *Arch. Histol. (B.Air)* 1:441-442, 1943.
- ROMANES, G.J. The staining of nerve fibres in paraffin sections with silver. *J.Anat. Lond.* 84:104-115, 1950.
- SAMUEL, E.P. Impregnation and development in silver staining. *J.Anat.Lond.* 87:268-277, 1953a.
- SAMUEL, E.P. The mechanism of silver staining. *J.Anat.Lond.* 87:278-287, 1953b.

- SAROFF, H.A. & MARK, H.J. Polarographic analysis of the serum albumin-mercury and zinc complexes. J.Am.Chem.Soc. 75:1420-1426, 1953.
- SELIGMAN, A.M., WASSERKRUG, H.L. & HANKER, J.S. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid containing membranes and droplets in osmium tetroxide fixed tissue with osmiophilic thiocarbonylhydrazide (TCH). J.Cell Biol. 39:424-432, 1966.
- SILVER, M.L. Colloidal factors controlling silver staining. Anat. Rec. 82:507-529, 1942
- STERNBERGER, L.A., DONATI, E. J. & WILSON, C.E. J.Histochem Cytochem. 11:48, 1963 citado por HANKER & col. Science 152:1631-1634, 1966.
- STERNBERGER, L.A., HANKER, J.S., DONATI, E.J., PETRALI, J.P. & SELIGMAN, A.M. J.Cell Biol. (in press) citado por HANKER & col. Science 152:1631-1634, 1966.
- TANFORD, C. The effect of pH on the combination of Serum Albumin with Metals. J.Am.Chem.Soc. 74:211-215, 1952.
- URIEL, J. Interaction entre des protéines sériques e des cations métalliques. Biol. Med. 50:27-97, 1961.
- VISINTINI, F. Recerche sperimentale e conziderazioni teoriche sui fenomeni chimicofisichi della impregnazioni istologiche. Riv. Pat. Nerv. Ment. 38:667-687, 1931.
- WIGGLESWORTH, V.B. Quart. J. Micros. Sci. 93:105, 1952 citado por PEARSE, A.G.E. Histochemistry; theoretical and applied. London, J. & A. Churchill Ltda. 1961.
- WILLIS, A.G. A new method for staining neurofibrillae and axis cylinders. J.R.Micros.Soc. 15:29-33, 1945.
- WOLMAN, M. Studies of the impregnation of nervous tissue elements. I. Impregnation of axons and myelin. Quart.J. Micros.Sci. 96:329-336, 1955a.
- WOLMAN, M. Studies of the impregnation of nervous tissue elements. II. The nature of the compounds responsible for the impregnation of axons; practical considerations. Quart. J.Micros.Sci. 96:337-341, 1955b.
- WORMSER, Y. Recherches sur la dissimulation de l'ion Ag. appliquées à l'étude d'une protéine. J.Chimie physique 48:344-349, 1951.
- YAO, T. Quart.J.Micros.Sci. 90:401, 1949 citado por PEARSE, A.G.E. Histochemistry; theoretical and applied. London, J. & A. Churchill Ltda. 1961.
- ZON, L. The physical chemistry of silver staining. Stain Techn. 11:53-67, 1936.