

## MÉTODOS HISTOQUÍMICOS PARA A IDENTIFICAÇÃO DE LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS

EUZENIR NUNES SARNO & LEILA MARIA MACHADO VIEIRA

*Os autores descrevem a padronização de técnicas histoquímicas, fosfatase ácida, alfa-naftil-acetato esterase e peroxidase para identificação de linfócitos e macrófagos em tecido. Recomenda-se a fixação em formol sacarose tamponado e inclusão em goma de Holt como a mais eficaz já que não só conserva a atividade enzimática, como também é de realização acessível.*

Os métodos histoquímicos para a detecção de atividade da esterase, fosfatase, ácida e peroxidase são os mais comumente utilizados para a identificação de linfócitos e das células do sistema de fagócitos mononucleares (SFM), já que estas enzimas fazem parte do sistema enzimático contido nos seus grânulos lisossomais (Job & Nadu, 1970; Poore et al., 1981).

Primeiramente estas técnicas foram empregadas utilizando-se tecido fresco, sem fixação. Posteriormente foram feitas tentativas de fixação para evitar a difusão enzimática e aprimorar os resultados. A alternativa de utilizar secções de bloco de parafina tem sido tentada com o objetivo de tornar mais acessível à rotina em patologia (Chilosi et al., 1981).

O presente trabalho teve por objetivo padronizar técnicas histoquímicas para identificação de células do SFM em lesões inflamatórias. Selecionaram-se quatro casos de hanseníases polares, dois na forma tuberculóide e dois na forma virchowiana.

### MATERIAL E MÉTODOS

Cada fragmento de pele era subdividido em três pequenos fragmentos, A, B, C, os quais eram submetidos aos seguintes tratamentos:

- A) Embebido em Tissue-Tek e congelado em nitrogênio líquido, onde foi estocado até o uso.
- B) Fixação em formol tamponado pH 7,0.
- C) Fixação em formol-sacarose-tamponado (Chilosi et al., 1981).

Os fragmentos A e C foram cortados em criostato Cryo-Cut II, American Optical a  $-16^{\circ}\text{C}$  em secções de  $3\ \mu\text{m}$ . Secções do fragmento A eram submetidas a dois procedimentos diferentes.

- .. Uma secção era fixada em glutaraldeído (Bozdech & Bainton, 1981).
- Outra secção foi imediatamente submetida à coloração sem prévia fixação.

O fragmento B incluído em parafina era cortado em micrótomo rotativo Leitz em secções de 3  $\mu$ m, desparafinizadas e hidratadas.

Todas as secções pertencentes aos grupos acima citados foram submetidas ao mesmo procedimento para detectar atividade de alfa-naftil acetato-esterase, peroxidase e fosfatase-ácida, conforme descrito por Chilosì et al. (1981).

No material incluído em parafina a incubação por ANA e FAC foi de quatro dias e para PX de um dia.

Após a incubação as secções eram (com exceção das utilizadas para a pesquisa de PX) contrastadas com verde metila a 1%. As secções para PX foram contrastadas com azul de metileno 0,1%.

## RESULTADOS E COMENTÁRIOS

O aspecto histológico das lesões ao HE era característico das formas selecionadas. Nos dois casos tuberculóides a pesquisa de BAAR foi negativa, acontecendo o contrário nos casos virchowianos, que foram positivos. Em todos observou-se a presença de grande número de macrófagos, quer formando granulomas, na forma tuberculóide, quer com características de células de Virchow na forma virchowiana.

Analisando as secções do grupo A verificamos que há melhor conservação quando logo após o corte em congelação procede-se à fixação em glutaraldeído. Naquelas não fixadas observa-se total difusão das enzimas e opacificação dos cortes.

Entretanto, foi com a fixação do fragmento de formol-sacarose que obtivemos melhores resultados. Nestas secções os limites celulares são bastante nítidos, as enzimas se mantêm intracelularmente e a coloração é bastante eficaz. Dados estes só referentes à ANA e FAC. Ambas são vistas com dois padrões. Na maioria das células identificadas como linfócitos observa-se pequeno glóbulo vermelho acastanhado (ANA) ou vermelho (FAC) citoplasmático adjacente à membrana celular, "dot-like" (Fig. 1). Em outras células, identificadas como macrófagos observa-se coloração vermelha difusa ou granular citoplasmática quer se trate de lesões de hanseníase tuberculóide ou lepromatosa, respectivamente (Figs. 2 e 3).

A peroxidase foi somente detectada em poucos granulócitos presentes. As secções do procedimento B (proveniente de fragmentos incluídos em parafina) somente muito raramente mostraram algumas células positivas para ANA ou FAC.

Comparando os diversos procedimentos realizados consideramos ser a fixação em formol-sacarose, com pós-incubação em goma de Holt, um excelente método para a demonstração de atividade da alfa-naftil-acetato esterase e fosfatase ácida em macrófagos podendo estas enzimas ser utilizadas como marcadores para linfócitos em tecido. Outra vantagem do método é que o mesmo fragmento depois de cortado no criostato pode ser incluído em parafina para o procedimento de rotina e estocagem.

## SUMMARY

The authors report techniques to detect acid-phosphatase, alpha-naphthyl esterase and peroxidase activity in lymphocytes and macrophages in cutaneous lesions of Leprosy. They recommend fixation in formol sucrose buffered followed by inclusion in gumma of Holt as the best method. This method maintain the activity and show sharply the details of cells.

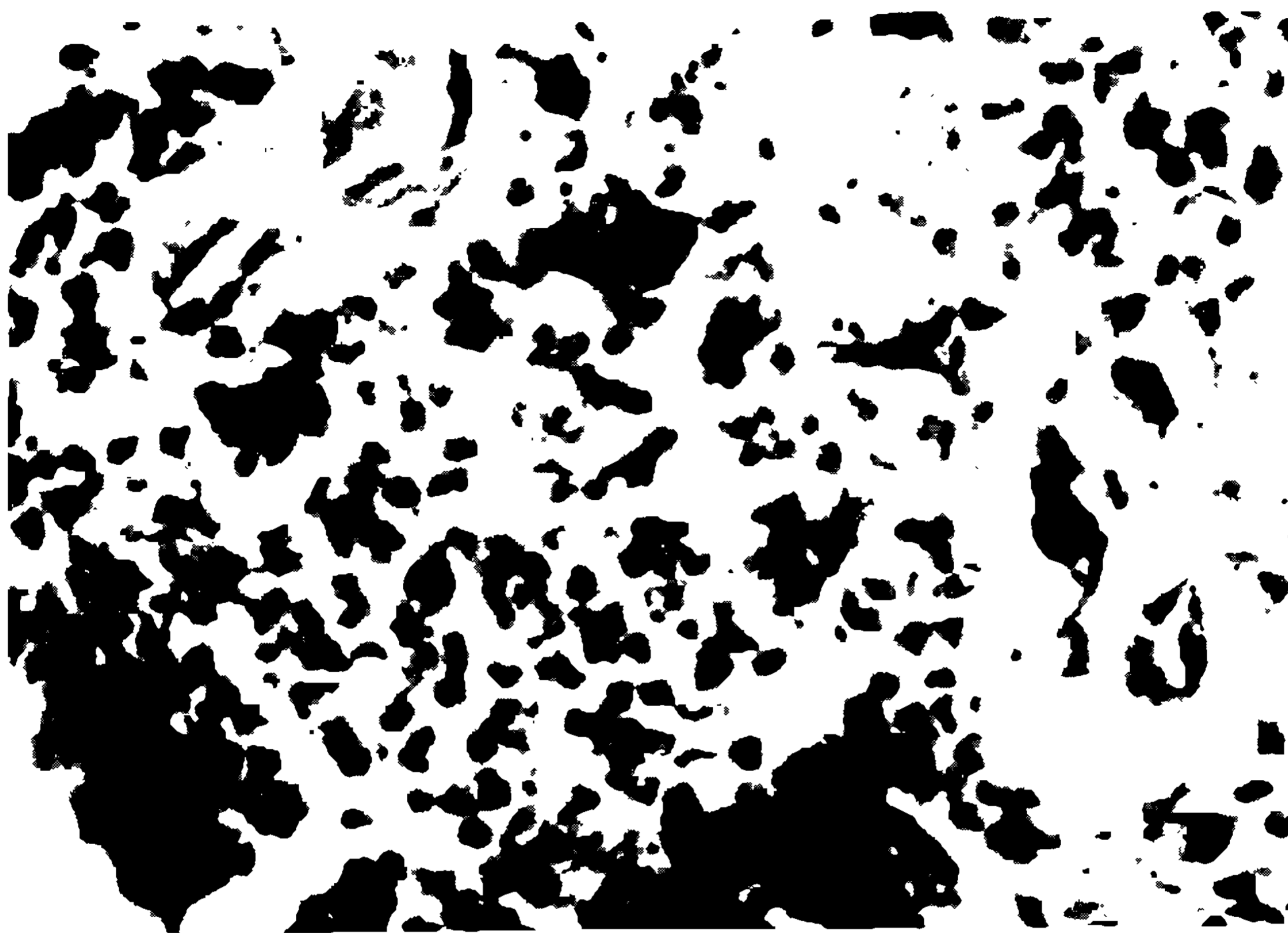


Fig. 1 – Detecção de atividade da alfa-naftil acetato esterase. Identificação de linfócitos através de pontos escuros justa-membrana. Macrófagos mostram difusa coloração. 320x.

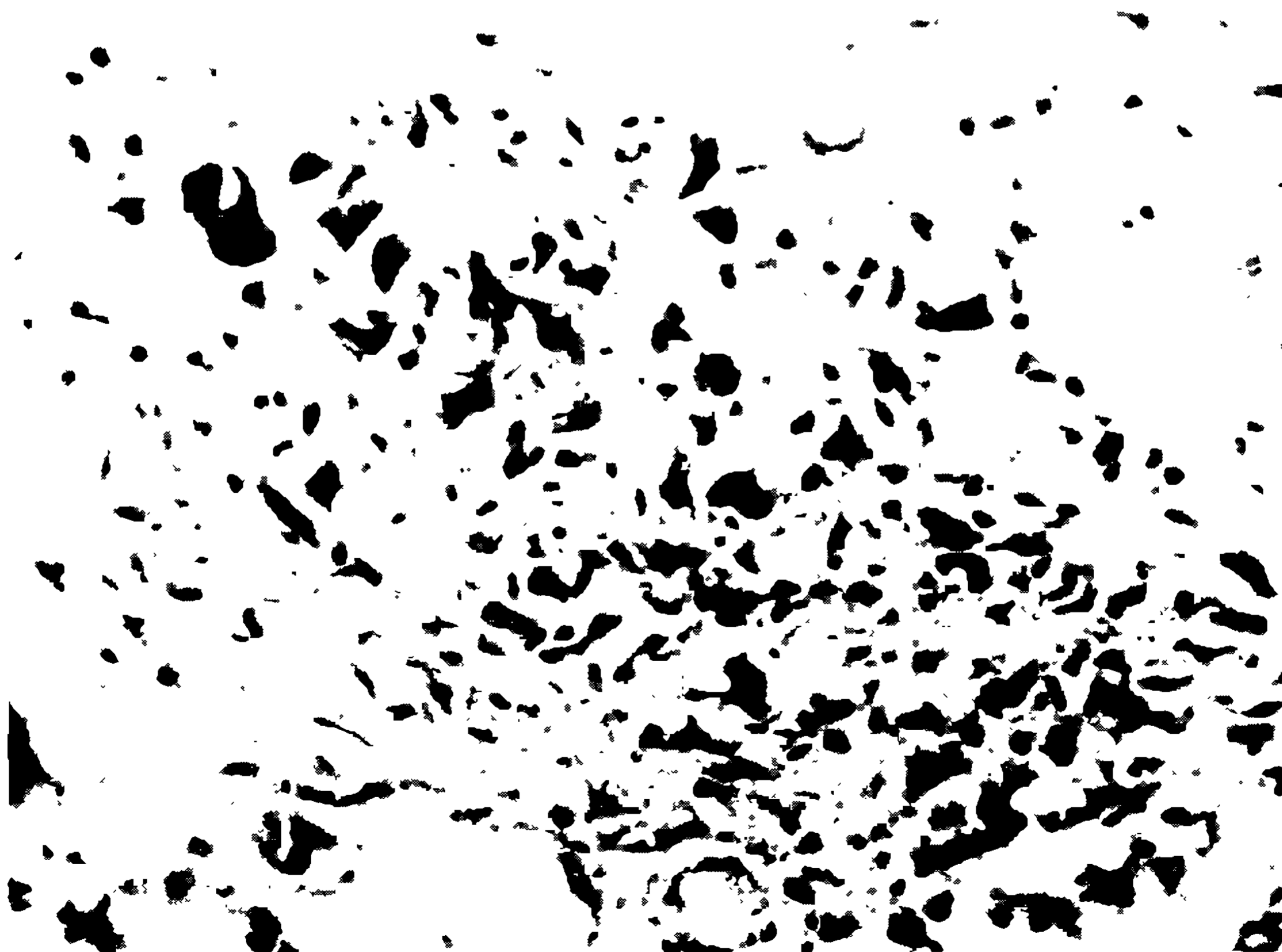


Fig. 2 – Detecção de atividade da fosfatase ácida em macrófagos presentes na lesão cutânea da hanseníase tuberculóide. Vê-se coloração difusa citoplasmática. 200x.

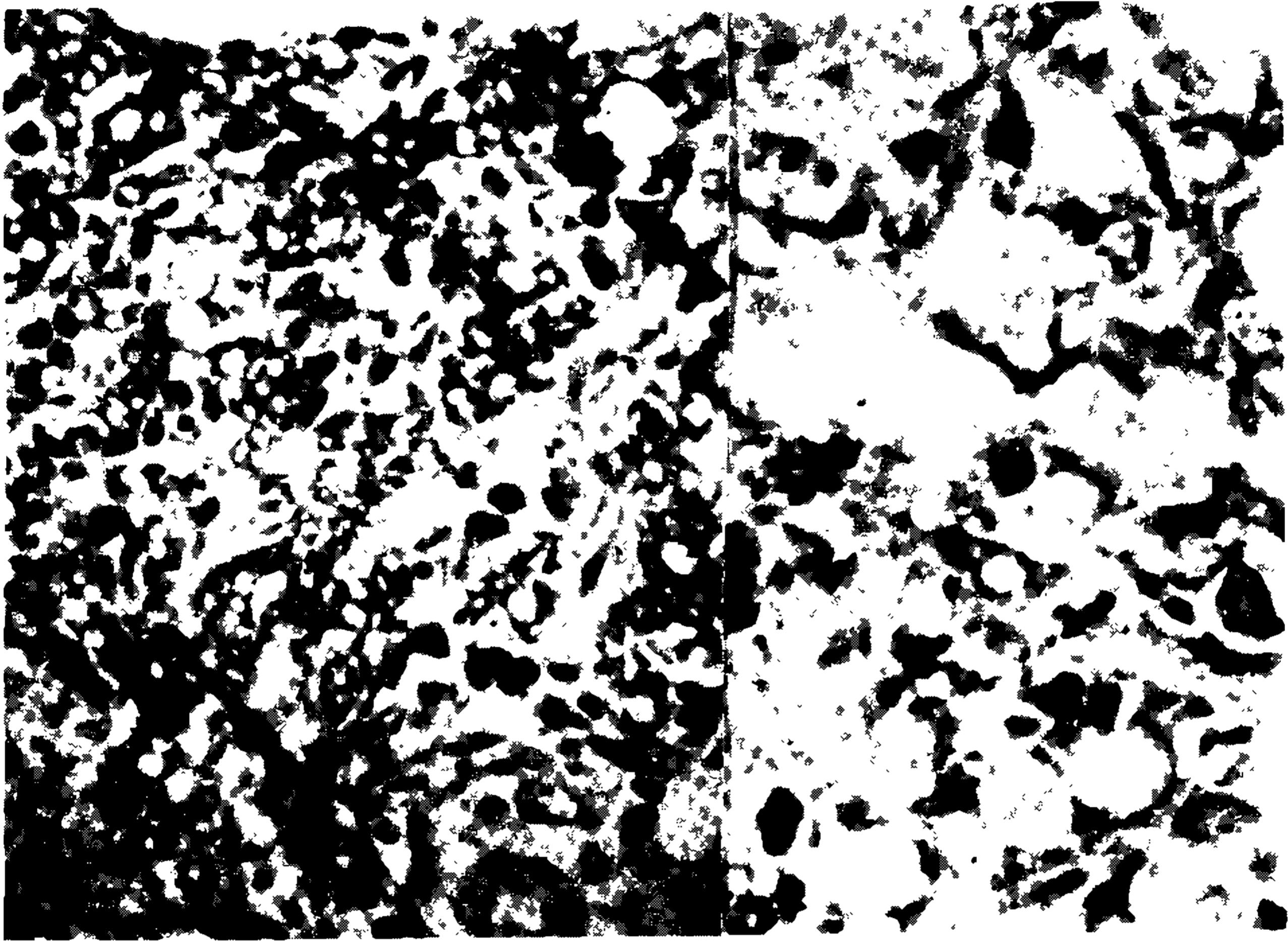


Fig. 3 – Detecção de atividade da fosfatase ácida em células de Virchow presentes na lesão cutânea de hanseníase lepromatosa. Vê-se coloração granular em torno de vacúolos citoplasmáticos. 200x. À direita detalhe das células. 320x.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOZDECH, M.Y. & BAINTEEN, D.F., 1981. Identification of naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as discrete intracellular membrane-bounded organelle in lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 153 :182-195.
- CHILOSI, M.; PIZZOLE, G.; MENESTRINA, F.; JANNUCCI, A.M.; BONETTE, F. & FIORE-DONATI, L., 1981. Enzyme histochemistry on normal and pathologic paraffin-embedded lymphoid tissues. *Am. J. Clin. Pathol.*, 76 :729-736.
- JOB, C.K. & NADU, T., 1970. Lysosomal activity of macrophages in leprosy. *Arch. Path.* 90 :547-552.
- POORE, T.E.; BARRETT, S.G.; KADIN, M.E. & BAINTEEN, D.F., 1981. Ultrastructural localization of acid phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood. *Am. J. Path.*, 102 :72-83.