

DISTRIBUIÇÃO CUTÂNEA DOS MASTÓCITOS EM RATOS NORMAIS E DIABÉTICOS

MAST CELL DISTRIBUTION IN SKIN OF NORMAL AND DIABETIC RATS

Patricia Graciano VICCI

Aluna do Curso de Graduação em Fonoaudiologia da FOB - USP.

Denise Tostes OLIVEIRA

Professora Doutora do Departamento de Patologia da FOB - USP.

Raquel Mendonça ROSA

Professora Auxiliar da Disciplina de Anatomia da Universidade de Marília - UNIMAR.

O objetivo deste trabalho foi verificar o efeito da hiperglicemia de longa duração na distribuição dos mastócitos na pele. Vinte ratos foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo I - normais e Grupo II - diabéticos. Todos os animais foram sacrificados 30 dias após a indução do diabetes melito. Pequenos fragmentos da região dorsal da pele foram removidos, fixados em formol, incluídos em parafina e corados pelo azul de toluidina para identificação dos mastócitos pela metacromasia. Os mastócitos cutâneos foram quantificados utilizando-se a técnica morfométrica de contagem de pontos e o número médio de mastócitos nos dois diferentes grupos comparados estatisticamente pelo teste "t" de Student. A porcentagem de volume na derme ocupada pelos mastócitos no grupo diabético foi relativamente pequena ($0,8\% \pm 0,24$). A análise estatística demonstrou um maior número de mastócitos na derme dos animais normais quando comparado com os diabéticos.

Recebido para publicação
em 07/11/95

Unitermos: Mastócitos; Diabete melito; Hiperglicemia.

INTRODUÇÃO

Os mastócitos e os basófilos, descritos inicialmente por ERLICH⁸, em 1877, são células com morfologia, desenvolvimento e propriedades biológicas muito semelhantes. Essas células contêm em seu interior grânulos ricos em mediadores químicos biologicamente ativos, como a histamina, a heparina, os fatores quimiotáticos para eosinófilos e neutrófilos, as proteases neutras e os metabólitos do ácido araquidônico, estes últimos potentes

mediadores inflamatórios liberados pela degranulação induzida por diferentes estímulos^{2,4,5}. Apresentam também em suas superfícies receptores para imunoglobulina E (IgE), através dos quais participam das reações de hipersensibilidade do tipo I^{2,5}. São essencialmente células teciduais originadas de precursores provenientes da medula óssea^{4,8}.

Na pele de humanos, ratos e camundongos, os mastócitos são encontrados primariamente na região superficial da derme logo abaixo da junção epiderme-

derme^{2,3}. Podem ser observados também em associação com vasos sanguíneos e nervos, provavelmente, envolvidos no controle nervoso do fluxo sanguíneo e na angiogênese (BENYON⁷, 1989). Possui potencial proliferativo após sua diferenciação morfológica e apresentam capacidade de migração (SONODA et al.¹⁹, 1984).

Um maior número dessas células é encontrado nos tecidos de pacientes com lesões inflamatórias crônicas, alergias, mastocitose sistêmica e portadores de diabetes melito^{6,9,10}.

No diabetes melito experimentalmente induzido por aloxana em ratos, MAITI; DASGUPTA¹¹ (1980) demonstraram, após 7 e 30 dias, um aumento do número de mastócitos em diferentes tecidos como pâncreas, tireóide, pele e mesentério. Os autores sugeriram que a hiperglicemia persistente e a ausência de insulina nesses animais foram a causa do aumento da proliferação dos mastócitos naqueles órgãos.

Os diversos trabalhos de NORRBY e colaboradores (1982^{12,13}, 1983¹⁴, 1985¹⁵, 1989⁶, 1990¹⁶) em animais diabéticos demonstraram um aumento da mitogênese de células do tecido conjuntivo, como fibroblastos e angioblastos, induzida por substâncias secretadas pelos mastócitos. Essa resposta proliferativa de algumas células nos diabéticos parece estar associada a algum fator tecidual adquirido pelas mesmas, durante o desenvolvimento desta síndrome. Esse fator responsável pelo aumento da mitogênese pode ser adquirido também pelos mastócitos, ocasionando o aumento tecidual destas células⁶.

A indução química de longa duração do diabetes melito, por drogas como a aloxana e a estreptozotocina, interfere diretamente com o metabolismo dos carboidratos, das proteínas e dos lipídios, ocasionando nos animais um acentuado estado de debilidade orgânica. Essas alterações prejudicam a atividade celular⁷, modificando as condições metabólicas dos diferentes tecidos. Para manter a homeostasia, o organismo ativa diversos processos adaptativos e compensatórios.

O objetivo deste trabalho consiste em estudar a distribuição dos mastócitos na região cutânea de ratos normais e diabéticos, com a finalidade de verificar a influência da hiperglicemia de longa duração na sua distribuição tecidual.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados dezoito ratos (*Rattus norvegicus*, *albinus*, Wistar) adultos jovens, divididos em dois grupos experimentais: **Grupo I** - Normais (8 animais

e **Grupo II** - Diabéticos (10 animais). Os animais foram tratados com ração balanceada (Anderson Clayton) e água *ad libitum* e mantidos em gaiolas próprias com cinco animais em cada uma.

Após um jejum de 24 horas, os animais foram pesados e o diabetes melito induzido por injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ - Sigma Chemical Company) - 65mg/kg de peso corporal, dissolvida em solução salina de citrato tamponado pH 4,5, seguindo-se a técnica utilizada por ABBEY; COHEN; SHKLAR¹, 1972.

Os animais do Grupo I foram injetados com a mesma solução descrita acima, porém sem a presença do diabetes melito. Vinte e quatro horas após a indução do diabetes melito, sua confirmação e seu grau foram obtidos pelo teste de BENEDICT¹⁸. Os animais com teste BENEDICT positivo receberam, via intramuscular, uma unidade de insulina NPH 40U (Biobrás - Brasil) no primeiro dia e 2 unidades a cada 24 horas, durante os dois dias subsequentes.

Trinta dias após a indução do diabetes melito, todos os animais do Grupo Normal e Diabético foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico. Um pequeno fragmento de pele de aproximadamente 4,0 x 5,0 cm foi retirado com o auxílio de um bisturi Bader-Parker e uma pinça dente-de-rato, da região dorsal de cada animal.

Antes do sacrifício, após um jejum de 24 horas, 3 ml de sangue de cada animal foram coletados por punção cardíaca, colocados em um tubo de ensaio contendo anticoagulante fluoreto (2 gotas para 2,5 ml de sangue), e centrifugados a 2.000 rpm durante 15 minutos para obtenção do plasma sanguíneo. A dosagem de glicose no plasma foi realizada pelo método da glicose-oxidase, utilizando-se o sistema Glicose Labtest. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, sendo os valores glicêmicos (mg/dl) obtidos por uma curva padrão.

Os fragmentos de pele coletados foram distendidos com auxílio de alfinetes em placas de Petri contendo parafina sólida, em uma espessura de 0,5cm e fixados em formol neutro a 10%, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Após a fixação, cada fragmento de pele foi dividido em fragmentos menores, de 1,0x0,5cm, antes da inclusão em parafina, segundo a técnica de rotina do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP. Foram obtidos três lâminas de cada bloco contendo cortes de 6mm de espessura. Uma lâmina foi corada com hematoxilina e eosina, para avaliação das condições teciduais gerais e duas lâminas foram coradas com azul de toluidina, pH 5,7, seguindo-se basicamente a técnica de PEARSE, 1968¹⁷, para identificação dos mastócitos

cutâneos pela metacromasia e análise morfométrica.

O número de mastócitos presentes na derme dorsal, identificados pela coloração com azul de toluidina, foi determinado utilizando-se um microscópio binocular OLYMPUS e um retículo de integração ZEISS com uma ocular Kpl (8x) e objetiva 40X. A área do retículo, obtida através de uma lâmina milimetrada, foi de 0,121285mm². Analisou-se 50 campos e o número de mastócitos/mm² foi calculado dividindo-se o número médio de mastócitos no campo (PA) pela área examinada, que foi igual a 0,121285mm².

A fração de volume ocupada pelos mastócitos na derme dorsal foi calculada utilizando-se o mesmo retículo de integração ZEISS descrito anteriormente, seguindo-se basicamente a técnica indicada por WEIBEL; GOMES²⁰ (1962). Em cada fragmento de pele foram contados os pontos coincidentes do retículo com os mastócitos em 50 campos, perfazendo um total de 5.000 pontos. A porcentagem da derme ocupada pelos mastócitos (fração de volume) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula: Fração de Volume (Vvi) = Pi + P, onde: Pi = pontos coincidentes sobre os mastócitos, e P = número total de pontos (número de pontos do retículo, que são 100, vezes o número de campos examinados, que são 50, assim, P = 100x50 = 5.000). Os dados obtidos pela fórmula acima foram tratados estatisticamente utilizando-se o *Test "t" de Student*, com nível de probabilidade de erro de 5%.

RESULTADOS

As médias dos níveis de glicose no plasma sanguíneo dos ratos dos Grupos Normal e Diabético podem ser visualizadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Média dos níveis sanguíneos de glicose dos animais, obtidas 30 dias após a indução do diabetes mellitus

GRUPOS EXPERIMENTAIS	GLICEMIA (mg/dl)
NORMAIS	162,33
DIABÉTICOS	431,95

Os mastócitos morfologicamente identificados pela metacromasia com azul de toluidina, em pH 5,7, encontravam-se distribuídos principalmente na derme, onde assumiam uma localização perivascular e circundando, algumas vezes, os anexos cutâneos. A fração de volume da derme ocupada pelos mastócitos (porcentagem de volume) foi de 1,2% nos animais normais

e de 0,8% nos animais diabéticos (Tabela 2). Aplicando-se o *Test "t" de Student* com nível de probabilidade de erro de 5% (P=0,05) detectou-se que as médias dos dois grupos são estatisticamente diferentes (Tabela 2). Portanto, de acordo com esses resultados, a fração de volume ocupada pelos mastócitos na região dorsal da derme é menor nos animais diabéticos quando comparado com os animais normais.

TABELA 2 - Média e desvio-padrão da média da densidade de volume (%) de mastócitos na região da derme dorsal de ratos normais e diabéticos

GRUPO	MÉDIA	DESIVIO-PADRÃO	AMOSTRA
NORMAL	1,2025*	0,2455	8
DIABÉTICO	0,8760	0,2454	10

* signficante para p < 0,05

O número médio de mastócitos em cada campo microscópico examinado nos diferentes animais dos Grupos Normal e Diabético pode ser observado na Tabela 3. A área examinada em cada campo corresponde a área do retículo de integração utilizado. A divisão do número médio de mastócitos em cada campo pela área do retículo expressa em mm² permitiu a obtenção do número de mastócitos/mm², como pode ser visualizado na Tabela 3. Nota-se que o número de mastócitos/mm² é maior no Grupo Normal, quando comparado com o Grupo Diabético.

DISCUSSÃO

A técnica morfométrica utilizada neste trabalho de contagem de pontos para obtenção da fração de volume ocupada pelas estruturas ou células nos diferentes campos microscópicos tem sido utilizada por outros autores¹⁰ no estudo da distribuição e quantificação de mastócitos. A padronização das características morfológicas das estruturas ou células a serem estudadas, bem como a escolha da técnica de coloração, são critérios importantes a serem observados para a realização da morfometria¹⁰.

A coloração dos fragmentos cutâneos com azul de toluidina, em pH 5,7 permitiu a visualização adequada dos mastócitos por metacromasia. A análise morfométrica realizada demonstrou uma pequena redução, estatisticamente significativa, no volume da derme dorsal ocupado pelos mastócitos nos ratos diabéticos — 1,2% no Grupo Normal e 0,8% no Grupo Diabético. Essa redução parece estar associada principalmente com a

TABELA 3- Número total de mastócitos em 50 campos microscópicos (N) e número médio de mastócitos (PA) com respectivo desvios-padrão (\pm) em cada campo microscópico equivalente a uma área de 0,121285mm² (área do retículo) na região da derme dorsal dos ratos normais e diabéticos

NÚMERO DO ANIMAL	NORMAL		DIABÉTICO	
	N	PA	N	PA
1	402	8,04	251	5,02
2	421	8,42	198	3,96
3	317	6,34	334	6,68
4	316	6,32	350	7,00
5	486	9,32	280	5,60
6	533	10,66	219	4,32
7	472	9,44	248	4,96
8	469	9,38	325	6,50
9	-	-	288	5,76
10	-	-	279	5,58
TOTAL	3.396	67,92	2.769	55,38
MÉDIA	424,5	8,49 \pm 1,54	277,2	5,538 \pm 0,99

diminuição do número de mastócitos pois analisando-se os dados da Tabela 4 ou Gráfico 1, observa-se que o número médio de mastócitos/mm² também diminuiu. Na derme dos animais do Grupo Normal encontramos 69,99 mastócitos/mm² e nos animais do Grupo Diabético, 45,65 mastócitos/mm².

Esses dados são contrastantes com alguns poucos trabalhos na literatura^{6,11} que verificaram um aumento do número de mastócitos nos diferentes tecidos de diabéticos. Em razão da diversidade de metodologias utilizadas para quantificação dos mastócitos^{3,11}, principalmente na derme,

TABELA 4- Número médio de mastócitos/mm² e desvios-padrão da média (\pm) da região da derme dorsal dos ratos normais e diabéticos

NÚMERO DO ANIMAL	NORMAL	DIABÉTICO
1	66,29	41,39
2	69,42	32,65
3	52,27	55,07
4	52,10	57,71
5	76,84	46,17
6	87,89	35,61
7	77,83	40,89
8	77,33	53,59
9	-	47,49
10	-	46,00
TOTAL	559,77	456,57
MÉDIA	69,99 \pm 11,89	45,65 \pm 7,82

e das variações na coloração destas células^{10,11}, comumente observadas com o uso de corantes como o azul de toluidina, torna-se difícil uma comparação entre os vários resultados destes trabalhos e os nossos.

Além disso, a distribuição dos mastócitos nos diferentes tecidos varia com a idade, a raça, a região do corpo examinada e com a hiperglicemia acentuada¹¹. MAITI; DANGUPTA¹¹, em 1980 foram os primeiros autores a observarem no diabetes melito, induzido por aloxana, em ratos, o aumento do número de mastócitos na língua,

estômago, músculos, mesentério, pâncreas e derme. A comparação dos nossos achados com o destes autores tornou-se difícil, pois a técnica microscópica usada por eles, para a quantificação dos mastócitos foi pouco clara, não sendo citado nem mesmo a objetiva microscópica utilizada. A discrepância desses resultados com os nossos parece refletir diferenças nos critérios determinados, tanto para realização da análise microscópica (como as características celulares) quanto na metodologia empregada para indução do diabetes melito (aloxana e estreptozotocina, respectivamente). Outro aspecto a ser considerado refere-se ao medicamento utilizado por nós para indução do diabetes melito, o antibiótico estreptozotocina pode ter causado uma degranulação acentuada dos mastócitos cutâneos diminuindo assim o número de células coradas pela metacromasia com azul de toluidina.

Para DRUVVEFORS; NORRBY⁶ (1989), NORRBY et al.¹³, 1992, NORRBY et al.¹², 1982, NORRBY et al.¹⁰, 1990, o aumento da mitogênese de células como fibroblastos, angioblastos e células epiteliais após a secreção local de substâncias pelos mastócitos nos animais diabéticos, provavelmente está relacionado com algum fator celular ou extracelular adquirido durante o desenvolvimento desta síndrome. Sugeriram que este fator poderia afetar também os mastócitos, aumentando sua capacidade proliferativa e, conseqüentemente, seu número em determinados tecidos¹². NORRBY¹³, 1982, observou que

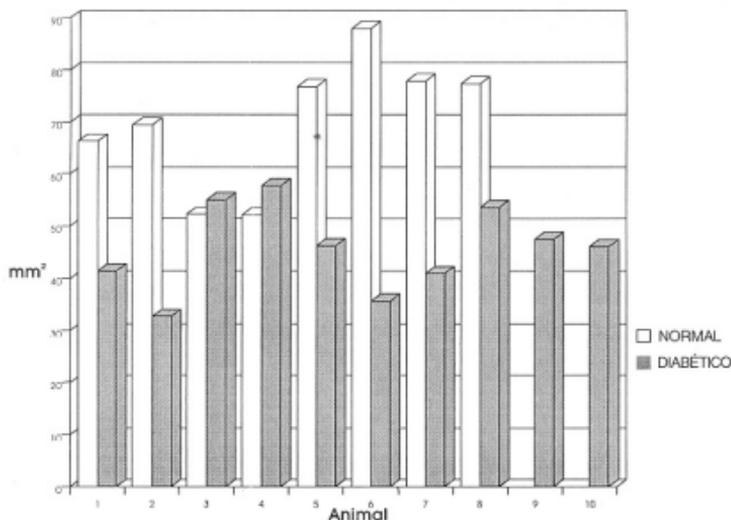


GRÁFICO 1- Número médio de mastócitos/mm² da região dorsal dos ratos normais e diabéticos

estas alterações da mitogênese ocorrem tardiamente, principalmente após 4 semanas da indução do diabetes melito. Como o tempo médio de vida dos ratos é de aproximadamente 2-3% comparado ao dos humanos, 4 semanas no rato, como o utilizado neste trabalho, podem ser comparadas com 2,5 a 3 anos nos humanos. Portanto, a hiperglicemia de longa duração induzida por estreptozotocina, pode interferir no número ou mesmo na degranulação dos mastócitos.

Sabendo-se que, algumas das afirmações acima são apenas especulativas, outros estudos são necessários para determinar se no diabetes melito de longa duração o número ou apenas as alterações na atividade secretora dos mastócitos influenciam a mitogênese de outras células do tecido conjuntivo. Além disso, torna-se importante a análise do modelo experimental utilizado nos diferentes trabalhos e sua influência na degranulação mastocitária.

O conhecimento dos principais fatores responsáveis pela indução da secreção de substâncias pelos mastócitos poderão ajudar no futuro a esclarecer o real papel destas células nas diferentes lesões proliferativas que afetam rins, artérias e olhos, comumente presentes em diabéticos.

ABSTRACT

This work was done aiming to quantify the mast cell in

skin of normal and diabetic rats induced by streptozotocin. Eighteen rats were shared in two experimental groups: I control and II diabetics. The diabetes mellitus was induced through intraperitoneal injection of streptozotocin. All animals from the I and II groups were sacrificed on the 30th day after streptozotocin administration. Small samples of skin were removed, embedded in paraffin and stained with toluidine blue solution. Dermal mast cell were quantified with the use of a morphometric point counting technic. The analysis of differences

between the mean number of mast cells in two different groups were compared using Student's test "t". In diabetic animals the mast cell in skin occupied a relatively small percentage of the dermal volume, with a mean value of 0.8% ($\pm 0,24SD$). The statistical test revealed significantly more dermal mast cell in control than in diabetics animals. It is concluded that the decreased in dermal mast cell was brought about a consequence of diabetic hyperglycemia.

UNITERMS: Mast cell; Diabetes mellitus; Hyperglycemia.

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a FAPESP pela bolsa de iniciação Científica (Processo nº 94/0516-4) concedida a Patrícia Graciano Vicci, para o desenvolvimento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ABBEY, L.M.; COHEN, M.M.; SHKLAR, G. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the healing of artificially product tongue wounds in rats. *Oral Surg.* v.33, n.4, p.672-83, 1972.
- 2- BENYON, R.C. The human skin mast cell. *Clin. Experim. Allergy.* v.19, p.375-87, 1989.

- 3- BOLTON, L.L.; MONTAGNA, W. Mast cells in human ulcers. *Amer. J. Dermatopathol.*, v.15, n.2, p.133-138, 1993.
- 4- CARRICO, T.J.; MEHRHOFT, A.I.; KELMAN, C.I. Biology of wound healing. *Surg. clin. north. Amer.*, v.64, p.721, 1984.
- 5- CHURCH, M.K.; EL-LATI, S.; OKAYAMA, Y. Biological properties of human skin mast cells. *Clin. Experim. Allergy*, v.12, p.1-9, 1991.
- 6- DRUVEFORS, P.; NORRBY, K. Evidence of an acquired increase in mitogenesis instreptozotocin-diabetic rats, apparently relating to some tissue factor. *Virchows Arch. B. Cell Pathol.*, v.56, p.293-98, 1989.
- 7- DVORAK, A.M. **Human mast cells.** London, Springer-Verlag, 1989.
- 8- EHRlich, P. Beiträge zur Kenntnis der Anilinfärbungen und ihrer Verwendung in der mikroskopischen Technik. *Archiv. Mikrosk. Anat.*, v.13, p.263-77, 1877 apud DVORAK, A.M.?
- 9- GILL, D.S.; THOMPSON, C.S.; DANDONA, P. Increased histamine in plasma and tissues in diabetic rats. *Diabetes Res.*, v.7, p.31-4, 1988.
- 10- KASPER, C.S.; FREEMAN, R.G.; THARP, M.D. Diagnosis of mastocytosis subsets using a morphometric point counting technique. *Arch Dermatol.*, v.123, p.107-21, 1987.
- 11- MAITI, A.K.; DASGUPTA, S.R. Mast cells in different tissues of alloxan diabetic rats. *In. J. Exp. Biol.*, v.18, p.1152-5, 1980.
- 12- NORRBY, K. Delayed mast cell mediated mitogenic reactivity in diabetic rats. *Virchows Arch.*, v.41, p.39-43, 1982.
- 13- NORRBY, K. et al. Augmented mitogenesis in normal connective tissue cells following mast cell secretion in diabetic rats. *Virchows Arch.*, v.39, p.137-44, 1982.
- 14- NORRBY, K. et al. The effect of insulin on delayed augmented mast cell mediated mitogenesis in diabetics rats. *Virchows Arch.*, v.44, p.287-94, 1983.
- 15- NORRBY, K.; ARNQUIST, H.J. Acute hyperglycemia and mast cell dependent mitogenesis in rat. *Horm. metabol. Res.*, v.17, p.626-9, 1985.
- 16- NORRBY, K. et al. Increased angiogenesis in diabetes. *Experientia*, v.46, p.856-60, 1990.
- 17- PEARSE, A.G.E. **Histochemistry - theoretical and applied.** 3.ed. London, Churchill, 1968. v. 1, p.665.
- 18- PESPININI, I.A. et al. **Fisiologia experimental - para curso de ciências biomédicas.** Araçatuba-SP, 1980. p.149.
- 19- SONODA, T. et al. Proliferation of peritoneal mast cells in the skin of W/W mice that genetically lack mast cells. *J. Exp. Med.*, v.160, p.138-51, July 1984.
- 20- WEIBEL, E.R. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.*, v. 26, p. 235-302, 1969.