

ESTUDO HISTOQUÍMICO DA LIPOFUSCINA CARDÍACA DO HOMEM E DO CÃO EM RELAÇÃO À IDADE §

Roberto GRECCHI*

RFMV-A/19

GRECCHI, R. — *Estudo histoquímico da lipofuscina cardíaca do homem e do cão em relação à idade.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 12: 205-22, 1975.

RESUMO: O pigmento lipofuscina aparece no miocárdio humano aos 10 anos de idade e no de cães aos 18 meses.

A maior concentração deste pigmento no coração de cães foi encontrada a partir dos 6 anos e independe, qualitativa e quantitativamente, de processos patológicos.

Do ponto de vista histoquímico a principal diferença observada está relacionada à reação PAS do pigmento que foi negativa em humanos acima de 60 anos de idade e positiva nas outras idades e em todos os diferentes grupos de cães examinados.

UNITERMOS: *Lipofuscina cardíaca**; *Cães**; *Lipofuscina, histoquímica**.

INTRODUÇÃO

As modificações morfo-fisiológicas que os seres vivos apresentam com o decorrer do tempo, após seu completo desenvolvimento, têm sido observadas desde há longa data sem que tenham sido satisfatoriamente compreendidas. Estas progressivas modificações, que em seu conjunto constituem o envelhecimento, manifestam-se de maneira tão paulatina e imperceptível que só podem ser avaliadas ao final de longo período de tempo, deixando dúvidas, quanto ao seu caráter, se patológicas ou fisiológicas. O desenvolvimento gradual e lento destas modificações é fator limitante para seu estudo em condições experimentais e, conseqüentemente, para a melhor compreensão do fenômeno.

Diferenças entre um organismo jovem e outro senil estão estabelecidas. Uma delas é a presença de pigmento em células de animais idosos, sendo esta mais evidente e constante em células do tecido nervoso e do muscular cardíaco. Este pigmento, conhecido de há longa data e relacionado sempre ao fator idade, recebeu várias denominações, tendo perdurado as de "pigmento de uso", "pigmento de desgaste" e "pigmento senil". Assim, o estudo de sua natureza química, bem como de suas variações morfológicas e histoquímicas, reveste-se de importância por refletir parte de fenômeno mais geral e complexo que é o envelhecimento.

§ Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P. para obtenção do título de Doutor.

* Professor Assistente Doutor.

Departamento de Patologia e Clínica Médicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da U.S.P.

Andrew¹ (1962) menciona que alguns estudiosos do assunto aplicam o termo envelhecimento à soma total das alterações que ocorrem na substância viva de um organismo no curso de uma geração, isto é, da fecundação até a morte natural. Aceita este conceito mais geral, porém, prefere a idéia um tanto artificial de que o envelhecimento indica as mudanças que ocorrem após ter sido atingido o ápice das atividades vitais, principalmente a reprodutora.

Para Vest⁵⁵ (1943) a senescência é fisiologicamente inevitável, inerente à própria célula e se constitui no tipo mais genérico de involução vital. Mayer³⁸ (1949) afirma que o envelhecimento é o resultado do desvio da síntese de proteínas para a síntese de gorduras, sem que haja deficiência metabólica.

Fazendo uma breve análise das teorias, Curtis⁹ (1963) defende a "teoria da mutação somática" segundo a qual as células de um organismo acumulariam gradualmente genes deletérios, por mutações, que levariam as células à perda paulatina de suas funções mais especializadas. Esta teoria apoia-se na observação de que animais irradiados envelhecem mais rapidamente⁹. Intimamente relacionada a esta teoria está a da "crosslinkage" (interligação), pela qual as macromoléculas, entre elas as do DNA, se interligariam ocasionando as mutações gênicas. Nas moléculas de estromas teciduais teríamos, também, alterações como, por exemplo, a perda de elasticidade observada no tecido conjuntivo de indivíduos senis⁴.

Desde há muito são descritas nas células nervosas ganglionares do homem, modificações morfológicas que acompanham o envelhecimento, representadas por limites celulares borrados, núcleos pobres em cromatina, desaparecimento do núcleo, além de acúmulo de grânulos citoplasmáticos de natureza lipóide²¹. Já há longa data, depósitos lipóides foram também descritos nas células de Purkinge do cerebelo e células piramidais do cérebro em cães senis¹⁹.

No miocárdio senil, foram também descritas alterações na relação número de núcleos/número de fibras. Esta relação é maior na criança do que a encontrada no adulto e no indivíduo senil⁵². Dogliotti¹¹ (1930) descreveu tendência à hipertrofia das fibras cardíacas na senilidade. Segun-

do este autor, ainda, na senilidade extrema estas fibras apresentam-se atroficas.

A presença de um cromolipóide, comumente denominado de lipofuscina, encontrado com maior constância no tecido nervoso e no muscular cardíaco é admitida, pela quase totalidade dos autores interessados no assunto, como intimamente relacionada ao envelhecimento^{10,46,53}.

A maior constância com que este pigmento aparece no tecido nervoso e cardíaco seria devido à incapacidade que têm as células destes tecidos de se renovarem. Esta condição poderia ser considerada como um marcador do envelhecimento, já que estes tecidos podem ser considerados tão velhos quanto o indivíduo⁴⁰.

Assim, da simples constatação da presença do pigmento nos tecidos de animais senis, os autores contemporâneos passaram a se preocupar em determinar as relações entre a taxa de deposição do mesmo e a idade do indivíduo. Entre esses autores podemos citar Jayne²⁴ (1950) que, utilizando-se da propriedade da álcool-ácido resistência do pigmento, observou que a quantidade deste aumenta progressivamente no miocárdio humano, entre a 2.^a e a 6.^a décadas de vida. Trabalhando também com miocárdio humano, porém utilizando-se da autofluorescência do pigmento à luz ultravioleta, Strehler, Mark, Mildvan & Gee⁵³ (1959) confirmam os achados de Jayne²⁴ e concluem que a concentração média do pigmento aumenta linearmente a uma taxa aproximada de 0,33% do volume cardíaco, por década de idade. Munnell & Getty⁴⁰ (1968), usando a mesma metodologia de Strehler e col⁵³, em miocárdio de cães, constataram a presença do pigmento somente em animais de idade superior a 6 meses. Demonstraram ainda que a concentração do mesmo, a partir dos 3 anos e meio, aumenta linearmente à taxa de 0,36% do volume de miocárdio por ano. Samorajski, Ordy & Rady-Reimer⁵⁰ (1968) verificaram que a porcentagem de células pigmentadas do gânglio nervoso dorsal do camundongo aumenta de 15 a 92%, dos 4 aos 30 meses de idade e, nas células de Purkinge do cerebelo, aumenta de 25 a 88% naquele mesmo período. Estes dados sugerem claramente, portanto, que a quantidade de pigmento aumenta com a idade do tecido.

Segundo Hueck²³ (1912), Borst foi quem introduziu o termo lipofuscina na lingua-

gem científica para designar partículas pigmentadas intracelulares coradas por lipocorantes, nas fibras miocárdicas, células nervosas ganglionares, fibras musculares lisas, em algumas células do tecido conjuntivo e no epitélio germinativo. Lubarsch³³ (1922) e sua escola confundiram-na com melanina e outros, como Hueck, com a hemofuscina de Recklinghausen. Connor⁷ fez a distinção entre lipofuscina e lipocromos, entretanto, chamou-a de hemofuscina ao observá-la no miocárdio de quatro pessoas.

A divergência quanto ao significado deste termo acentuou-se principalmente depois que Lillie, Daft & Sebrell³¹ (1941) descreveram, na cirrose dietética do rato, um pigmento de origem lipídica que se apresentava sob a forma de glóbulos amarelos, com diâmetro variando de 1 a 20 micros. Posteriormente, Endicott e Lillie¹⁴ (1944), passando a denominá-lo ceróide, descreveram-no também em macrófagos do septo alveolar pulmonar, na polpa esplênica, na medula óssea, em linfonodos e no córtex adrenal, e, baseados em métodos histoquímicos, caracterizaram-no como sendo insolúvel em liposolventes, sudanófilo, basófilo, redutor de sais de prata, álcool-ácido resistente, auto-fluorescente, positivo para a fuscina de Mallory e negativo para os testes de Perls e de Schmorl. A exceção deste último, que é positivo somente para a lipofuscina, todos os outros, com pequenas variações, caracterizam também a lipofuscina clássica^{30,32}. Devido a esta grande semelhança de comportamento histoquímico, a identificação de ambos prestou-se a confusões e passou a ser uma questão de preferência individual. Lison³² (1960) estabeleceu uma classificação geral para pigmentos, separando os relacionados a lípidos em dois grupos: carotenóides e cromolipóides. Os carotenóides são pigmentos exógenos que se dissolvem em lípidos, constituindo, então, os lipocromos e que em presença de ácido sulfúrico concentrado apresentam cor azul. Os cromolipóides são os que derivam de lípidos, englobando as lipofuscinas, o ceróide e a hemofuscina, esta, descrita por Recklinghausen em 1889⁴⁵. Embora não haja, segundo afirma, distinção nítida entre estes 3 tipos, Lison menciona algumas diferenças. Assim, quanto à localização, o ceróide pode aparecer em macrófagos e ser obtido em condições experimentais enquanto que a lipofuscina aparece naturalmente em células miocárdicas, hepáticas, nervosas, gliais, do epidídimo e da supra

renal. A hemofuscina aparece no fígado e em outros órgãos, porém quase sempre, em casos de hemocromatose. Quanto à autofluorescência, Lison cita para o ceróide como sendo amarelo-esverdeada tendendo à branca e anulada pelo permanganato de potássio e, como sendo de cor vermelho-acastanhada para a lipofuscina. Quanto à afinidade por lipocorantes, a lipofuscina cora-se menos intensamente que o ceróide e a hemofuscina, sendo que este último pigmento somente seria evidenciado em cortes por congelamento³². Quanto à reação de Schmorl (redução do ferricianeto férrico), Lison menciona que é negativa para o ceróide e positiva para a lipofuscina, e, finalmente, quanto às afinidades tintoriais, cita que o ceróide cora-se lentamente pelos corantes básicos e que sempre é álcool-ácido resistente, apresentando, por outro lado, a lipofuscina basofilia intensa e álcool-ácido resistência somente em alguns casos.

Barka & Anderson² (1963) mencionam as mesmas características dadas por Lison para as lipofuscinas e, baseados na origem lisossômica deste pigmento, acreditam que muitas de suas propriedades tintoriais seriam proporcionadas pelos componentes estruturais daquela organela. Citam, como exemplo, a positividade à reação do PAS tanto para a membrana do lisossomo como para aquele pigmento. Em relação às diferenças entre lipofuscinas e ceróide, Barka & Anderson assinalam, além daquelas citadas por Lison, a reação PFAS (ácido perfórmico + reativo de Schiff) que é fracamente positiva para as lipofuscinas e usualmente positiva para o ceróide.

Lillie³⁰, citando outros autores, quando trata especificamente da lipofuscina cardíaca, afirma que a redução do ferricianeto férrico é observada em alguns mas não em todos os casos; que somente parte do pigmento dá a reação do PAS e uma parte ainda menor, é positiva para o PAAS (ácido peracético + reativo de Schiff). Além disso, assinala que o pigmento não é definitivamente álcool-ácido resistente e que pequena porção reduz a prata amoniacal.

Em vista do exposto, verifica-se que as diferenças entre ceróide e lipofuscina são mínimas suscitando, às vezes, denominações diferentes para um mesmo pigmento. Observou-se, também, que o comportamento histoquímico de um dado pigmento, em um mesmo órgão, pode variar^{30,41}. Estes fatos levaram Pearse⁴¹ (1961) a ela-

borar um esquema evolucionário com condições de explicar algumas divergências de resultados obtidos por vários autores que estudaram os cromolipóides. Assim, Pearse é de opinião que lipóides, de início sem cor, iriam se oxidando, tornando-se insolúveis e perdendo a capacidade de absorver corantes de gorduras. Estabelecer-se-ia ainda, o aumento paulatino de grupos redutores e de grupos ácidos, bem como o desenvolvimento de cor. A reação do PAS seria positiva somente nos estágios intermediários de evolução do pigmento. O produto final desse processo auto-oxidativo seria o pigmento lipofuscínico, fortemente basófilo, ativamente autofluorescente e redutor de soluções argênticas e de ferricianeto. Em um estágio intermediário entre os lipóides e a lipofuscina, Pearse localiza o ceróide ou lipofuscina tipo ceróide. Entretanto os limites entre estas várias etapas da evolução de um lipóide para um cromolipóide não foram ainda exatamente determinados.

Nas fibras musculares cardíacas a lipofuscina foi sempre descrita em espaços claros, livres de miofibrilas, junto aos polos dos núcleos^{7,24}. Em miocárdio humano, a lipofuscina apresenta-se sob a forma de grânulos ovóides de coloração amarelo-acastanhada.

Desde longa data, sabe-se da natureza lipídica da lipofuscina e os lípidos segundo a maioria dos autores, encontram-se formando complexo glicolipoprotéico ou lipoprotéico²⁶. Na lipofuscina cardíaca da espécie humana, foi encontrada atividade de peroxidases e de fosfatase ácida¹⁶. Em grânulos pigmentares isolados de miocárdio humano, Hendley, Mildvan, Reporter & Strehler²⁰ verificaram que a atividade da fosfatase ácida, da citocromo-oxidase e da catepsina eram relativamente baixas. Em coração de bovino, Bjorkerud & Cummins³ também encontraram a citocromo-oxidase muito pouco ativa em grânulos isolados. Em lipofuscinas do tecido nervoso do homem, rato, gato, cobaia e camundongo, foi detectada atividade da catepsina (tipo C), esterase ácida e da deoxirribonuclease ácida^{26, 27, 48}.

A maioria dos autores admite a formação da lipofuscina, bem como a de outros cromolipóides, a partir de lípidos insatu-

rados que se oxidam e se polimerizam^{2,30,41}. Para alguns, como Barka & Anderson², o início do processo de formação dos grânulos de pigmento teria lugar no interior de lisossomos. Com o aumento da quantidade do material corado, o lisossomo posteriormente desapareceria como tal e, no grânulo de lipofuscina, restariam alguns resquícios que poderiam justificar certas propriedades físico-químicas comuns ao lisossomo e aos grânulos de pigmento. Esta relação entre lisossomo e grânulo de lipofuscina é aceita pela maioria dos autores^{15,26,49} com base nas semelhanças histoquímicas e ultra-estruturais apresentadas.

Tanto o mitocôndrio¹² como o complexo de Golgi⁵ foram relacionados com a gênese das lipofuscinas, prevalecendo contudo, na atualidade, a idéia de que seria o lisossomo a organela mais diretamente relacionada com o processo.

Como se depreende dos dados da literatura, são escassas as informações concernentes à propriedades histoquímicas básicas da lipofuscina cardíaca, bem como de suas diferenças entre espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

O material do presente estudo constou de fragmentos de músculos cardíaco das espécies humana e canina. O da espécie humana foi representado por nove fragmentos de miocárdio, incluídos em blocos de parafina segundo a técnica histológica usual, após fixação pelo formol neutro a 10%.* Os fragmentos foram obtidos em autópsias realizadas e registradas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital "Emílio Ribas" sob os números: 5/67; 29/67; 56/67; 70/67; 32/68; 65/68; 80/68; 86/68; e 90/68. Alguns dados deste material encontram-se na tabela I. Estes nove casos constituíram amostras de três grupos etários.

O material da espécie canina constou de fragmentos de músculo cardíaco de 100 cães enviados à Disciplina de Anatomia Patológica pelas Disciplinas de Patologia e Clínica Médicas, Patologia e Clínicas Cirúrgicas e Obstétrica, pelo Ambulatório da

* Este material foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Thales de Brito.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e, ainda, por clínicas particulares, com a indicação de eutanásia. Foram selecionados os animais cuja idade correta era informada diretamente pelo proprietário. Durante a necrópsia, iniciada logo após a morte por choque elétrico, ao se examinar o coração e não se verificar nenhuma lesão macroscópica aparente, recolhiam-se vários fragmentos de 0,5cm de espessura, retirados por duas incisões paralelas, perpendiculares ao epicárdio, abrangendo também o endocárdio. Os locais de escolha para a retirada dos fragmentos foram as paredes dos ventrículos direito e esquerdo. O material assim obtido foi fixado em formol neutro a 10%. Após inclusão em parafina, foram feitos cortes de 5 micros de espessura, segundo a técnica histológica usual.

Além daqueles 100 casos cuja fixação foi feita em formol neutro a 10%, alguns outros receberam fixação diferente, de acordo com a finalidade de estudo a que se destinavam. Assim, fragmentos de miocárdio de um cão de 12 anos foram fixados em formol cálcio de Baker a 4°C, por 24 horas, para o estudo de lípidos e para a pesquisa de fosfatase ácida. Outros fragmentos foram fixados em líquido de Gendre para a pesquisa de glicogênio e no líquido de Carnoy para a pesquisa de ácido ribonucléico.

Na tabela II encontram-se os dados relativos ao material da espécie canina (idade, sexo e raça), bem como o número de registro na Disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para realização dos testes histoquímicos foram escolhidos, ao acaso, 3 animais de cada grupo etário num total de 24 casos.

Os métodos indicados na tabela III observam, em sua maioria, as indicações dadas por Lison³² (1960), Lillie³⁰ (1965), Pearse⁴¹ (1961) e McManus & Mowry³⁵ (1965) e foram utilizados por vários autores para o estudo histoquímico de pigmentos em tecidos animais. Entre nós podemos citar Sasso, Castro & Pacheco⁵¹ (1958), Katchburian, Sasso & Della Serra²⁵ (1961), Morais³⁹ (1964), Villa⁵⁶ (1964), Grecchi, Mariano, Saliba & Zezza¹⁷ (1966), Mariano³⁷ (1968), Grecchi¹⁸ (1969) e Tokumaru & Ferri⁵⁴ (1970).

Além daqueles métodos, em alguns casos da nossa série de cães, foram feitos: o método do azul de alcian (Alcian blue) para mucosubstâncias ácidas, conforme Lison³² o método de Gomori para fosfatase ácida, modificado por Holt²², a impregnação argêntica, segundo Polak⁴³ e a hematoxilina fosfotungstíca de Mallory para mitocôndrios e o método da galocianina¹³ para RNA. O método de Elftmann, para lípidos³⁰ foi efetuado em fragmentos de miocárdio de 6 cães: 3 de idade inferior a 1 ano e 3 de idade superior a 10 anos.

Para avaliação e comparação do diferente teor de pigmento encontrado em nossos casos, valemo-nos, nas lâminas coradas pelo método de Hueck, de um critério subjetivo atribuindo ao teor máximo o sinal +++ (foto n.º 1), ao teor médio ++ (foto n.º 2) e ao teor mínimo + (foto n.º 3). À ausência do pigmento correspondeu o sinal —.

RESULTADOS

Os cortes histológicos do material do presente estudo, após coloração pela hematoxilina-eosina, não revelaram, além do pigmento em estudo, alterações patológicas no tecido miocárdico, quer no estroma, quer nas fibras musculares que apresentavam estriação evidente. Junto aos polos dos núcleos dessas fibras havia espaço, no interior dos quais puderam ser vistos grânulos de cor castanho-clara, principalmente no material proveniente de cães mais idosos e de cor castanha no proveniente de miocárdio humano.

Como pode ser visto na tabela II a presença do pigmento foi detectada, pelo método de Hueck, no miocárdio de um em 3 cães examinados de idade igual a 18 meses. De 6 animais com 2 anos, 3 não tinham pigmento nas fibras musculares cardíacas e, a partir dessa idade, todos os animais apresentaram pigmento. No material humano apenas os 2 casos de menor idade, não apresentaram pigmento por este método (Tabela I).

Quanto à solubilidade, o pigmento de ambas as espécies, revelou-se insolúvel no éter, clorofórmio, acetona, piridina, ácidos e álcalis. Foi considerado insolúvel também em água, álcool e xilol, posto que, foi utilizada a inclusão em parafina para a feitura dos cortes histológicos.

Quanto ao descoloramento por soluções oxidantes, o pigmento por nós estudado, descolorou-se ligeiramente em ambas as espécies.

O pigmento do presente estudo mostrou-se positivo ou reativo para os seguintes métodos: Hueck para cromolipóides, Negro-Sudão B, Negro-Sudão B após ação de solventes e oxidantes, argentafim de Masson, argentafim de Lillie, fucsina de Ziehl para álcool-ácido resistência e fucsina de Mallory para hemofuscina. A reação de Schmorl foi positiva somente no pigmento da espécie humana. A reação do PAS, após ação da amilase salivar, foi positiva nos grânulos pigmentares, em todos os nossos casos, tanto no homem como no cão, à exceção dos 3 casos humanos de idade mais avançada (60, 63 e 64 anos).

Por outro lado, o referido pigmento revelou-se negativo aos seguintes métodos: de Perls para Fe^{+++} , de Stein e de Kutlik para pigmento biliar, ácido peracético-Schiff, ácido perfórmico-Schiff, ao teste do ácido sulfúrico para carotenóide e de Verocay para pigmento formólico.

O pigmento em apreço demonstrou basofilia em pH 5,6, porém não mais em pH 3,4, em ambas as espécies.

A autofluorescência dos grânulos do pigmento foi observada em todos os casos e era de cor alaranjada. Foi, no entanto, abolida após tratamento pelo permanganato de potássio. Pelo método alternativo de Lillie, para diferenciar lipofuscina de melaninas, o pigmento por nós estudado descolorou-se pela ação do ácido sulfúrico a 1% após estar corado pelo azul do Nilo.

Nos cortes histológicos do material proveniente dos casos 90/68 e o 65/68 da espécie humana e do proveniente dos cães, que não apresentavam a pigmentação em apreço, também foram efetuados os métodos para pigmentos. Nestes casos os métodos anteriormente referidos como positivos foram negativos, inclusive a pesquisa de autofluorescência.

Os resultados dos métodos empregados encontram-se na tabela III e abrangem os 9 casos da espécie humana e 24 casos da espécie canina. Nestes resultados foi somente levado em conta o material que, nos

cortes corados pela hematoxilina-eosina, aparece junto aos polos dos núcleos das fibras miocárdicas. Não foram considerados alguns grânulos encontrados no conjuntivo embora fossem positivos para diversos métodos.

Os testes para a pesquisa de ácido ribonucleico (galocianina) e de polissacárides ácidos (azul-de-alcian) resultaram negativos nos grânulos de pigmento. A pesquisa da fosfatase ácida, pelo método de Gomori, modificado por Holt²², resultou positiva em alguns pontos dos grânulos. Utilizando-se o método de Polak⁴³ e o da hematoxilina fosfotúngstica para evidenciação de mitocôndrios, verificou-se que não há correlação topográfica entre estes e os grânulos de pigmento. Estes testes e métodos foram feitos somente em miocárdios de cães.

Os testes para a detecção de gordura — método de Eifftmann e o do Negro-Sudão B em cortes de congelação, antes e após a passagem em solventes — no espaço adjacente aos polos dos núcleos, tanto em cães jovens como nos senis, resultaram positivos. Evidenciaram aqueles testes que além dos grânulos de pigmento que se coraram intensamente, é possível detectar-se também material de natureza lipídica entre os mesmos. Este material solubilizou-se após tratamento por 24 horas na mistura de éter-clorofórmio. A reação do PAS, efetuada em material fixado em líquido de Gendre para a pesquisa de glicogênio, revelou-se de mesma intensidade, com ou sem tratamento prévio pela amilase salivar, junto aos polos do núcleo de fibras cardíacas do cão.

Pelo método de Hueck, que se revelou um dos melhores para a evidenciação do pigmento em estudo, foi avaliada subjetivamente a variação do teor de pigmento de acordo com as diferentes idades. O resultado desta avaliação pode ser visto nas tabelas I para o homem e na II para o cão.

Nas tabelas IV e V encontram-se relacionados os grupos etários com a variação do teor do pigmento. Para efeito de comparação entre diferentes grupos, o número de casos em cada um foi igualado a 100 e os valores expressos em porcentagem.

TABELA II

Espécie canina segundo grupo etário, sexo, raça e teor de lipofuscina no miocárdio. (Método de Hueck)

Casos *	Grupo I (0-2a)			Grupo II (2-4a)			Grupo V (8-10a)			Grupo VIII (11a-12a)				
	Raça	Sexo	Idade	Raça	Sexo	Idade	Raça	Sexo	Idade	Raça	Sexo	Idade		
8728	Pastor	M.	Rn	SRD	M.	2 a	8224	SRD	M.	8 a	8202	SRD	F.	14 a
9092	Pequin.	F.	21 d	Cocker	M.	2 a	8310	SRD	M.	8 a	8278	SRD	F.	14 a
9097A	SRD	M.	45 d	Pastor	F.	2 a	8946	Basset	F.	8 a	9371	SRD	F.	14 a
9097B	SRD	M.	45 d	SRD	M.	2 a	9067	Boxer	M.	8 a	8714	Pastor	M.	14 a
9097C	SRD	F.	45 d	SRD	F.	2 a	8500	SRD	M.	9 a	9008	Boxer	M.	14 a
196	SRD	F.	2 m	SRD	M.	2 a	8991	Pointer	F.	9 a	9084	SRD	M.	14 a
8346	SRD	M.	4 m	SRD	F.	2a3m	9009	SRD	F.	9 a	9167	SRD	M.	14 a
9025	SRD	F.	4 m	SRD	M.	3 a	9165	Poodle	F.	9 a	8204	SRD	F.	15 a
9022	SRD	F.	5 m	SRD	M.	3 a					8229	SRD	M.	15 a
8391	SRD	M.	6 m	Pastor	M.	3 a					8340	SRD	M.	15 a
8383	SRD	M.	6 m	Dalmata	F.	3 a					9038	SRD	F.	15 a
8361	SRD	F.	6 m	Chimasa	F.	3 a					8203	SRD	F.	16 a
8773	SRD	F.	7 m	SRD	M.	3 a					8284	SRD	F.	16 a
9039	SRD	M.	7 m								8349	SRD	F.	16 a
8962	SRD	M.	7 m								9071	Fox	F.	16 a
8970	SRD	M.	8 m								9072	Basset	F.	16 a
8977	SRD	F.	8 m								9158A	SRD	F.	16 a
9354	SRD	F.	9 m								8341	SRD	F.	17 a
8326	SRD	M.	12 m								9052	SRD	M.	17 a
8377	SRD	M.	12 m								9019	SRD	F.	18 a
8380	SRD	M.	12 m								9158	SRD	F.	22 a
8944	SRD	F.	12 m											
8488	SRD	F.	18 m											
8864	SRD	F.	18 m											
8945	SRD	F.	18 m											

Casos	Grupo III (4-6a)			Grupo IV (6-8a)			Grupo VII (12-14a)			
	Raça	Sexo	Idade	Raça	Sexo	Idade	Raça	Sexo	Idade	
8578	SRD	M.	4 a	Pastor	M.	6 a	8529	SRD	M.	10 a
9020	SRD	F.	4 a	SRD	M.	6 a	8593	Pequin.	F.	10 a
8506	SRD	F.	4a6m	SRD	M.	6 a	8953	SRD	M.	10 a
8441	SRD	F.	5 a	SRD	F.	6 a	9074	Poodle	M.	10 a
				SRD	F.	6 a	9088	SRD	M.	10 a
				SRD	F.	6 a	9116	Pequin	F.	10 a
8287	Pastor	M.	6 a							
8426	SRD	M.	6 a							
8434	SRD	M.	6 a							
8796	SRD	M.	6 a							
9159	Pastor	F.	6 a							
8329	SRD	F.	7 a							
9923	SRD	F.	7 a							
8986	Pastor	M.	7 a							
9029	Poodle	M.	7 a							
9032	SRD	M.	7 a							
9040	Pequin	F.	7 a							
9051	SRD	F.	7 a							
9031	SRD	F.	7a6m							

Casos	Raça	Sexo	Idade	Teor do pigmento
8202	SRD	F.	14 a	+++
8278	SRD	F.	14 a	+++
9371	SRD	F.	14 a	+++
8714	Pastor	M.	14 a	+++
9008	Boxer	M.	14 a	+++
9084	SRD	M.	14 a	+++
9167	SRD	M.	14 a	+++
8204	SRD	F.	15 a	+++
8229	SRD	M.	15 a	+++
8340	SRD	M.	15 a	+++
9038	SRD	F.	15 a	+++
8203	SRD	F.	16 a	+++
8284	SRD	F.	16 a	+++
8349	SRD	F.	16 a	+++
9071	Fox	F.	16 a	+++
9072	Basset	F.	16 a	+++
9158A	SRD	F.	16 a	+++
8341	SRD	F.	17 a	+++
9052	SRD	M.	17 a	+++
9019	SRD	F.	18 a	+++
9158	SRD	F.	22 a	+++

Casos	Raça	Sexo	Idade	Teor do pigmento
8224	SRD	M.	8 a	+
8310	SRD	M.	8 a	-
8946	Basset	F.	8 a	-
9067	Boxer	M.	8 a	-
8500	SRD	M.	9 a	-
8991	Pointer	F.	9 a	-
9009	SRD	F.	9 a	-
9165	Poodle	F.	9 a	++
8529	SRD	M.	10 a	+
8593	Pequin.	F.	10 a	+
8953	SRD	M.	10 a	+
9074	Poodle	M.	10 a	+
9088	SRD	M.	10 a	++
9116	Pequin	F.	10 a	+++
8529	Pastor	M.	12 a	++
8602	SRD	F.	12 a	+++
8771	SRD	F.	12 a	+++
8839	SRD	M.	12 a	++
8987	SRD	F.	12 a	+++
9157	SRD	M.	12a6m	+++
8337	SRD	M.	13 a	+++
8392	SRD	F.	13 a	+++
8552	SRD	M.	13 a	+++
8942	SRD	F.	13 a	+++
9054	SRD	M.	13a5m	+++

* Número de registro na Disciplina de Anatomia Patológica da Fac. Med. Vet. e Zootecnia da U.S.P.

TABELA III

Pigmento em células miocárdicas de homem e de cão, segundo resultados dos métodos e testes histoquímicos.

MÉTODO OU TESTE	homem (9 casos)			cão (24 casos)		
	+	-	±	+	-	±
Presença do pigmento (cor natural) Hematoxilina-Eosina	7	2	0	21	3	0
Bálsamo do Canadá	7	2	0	21	3	0
Solubilidade: álcool, xilol, clorofórmio, éter, acetona, ácido e álcali	0	7	0	0	21	0
Descoramento:						
por peróxido de hidrogênio	0	7	0	0	21	0
por ácido peracético	0	0	7	0	0	21
Fluorescência à luz UV	7	2	0	21	3	0
Fluorescência à luz UV após ação do KMnO ₄	0	9	0	0	24	0
Basofilia pH 3,4	0	9	0	0	24	0
pH 5,6	7	2	0	21	3	0
Ácido sulfúrico concentrado	0	9	0	0	24	0
Negro-Sudão B	7	2	0	21	3	0
após ação de solventes	7	2	0	21	3	0
após ação de oxidantes	7	2	0	21	3	0
Hueck	7	2	0	21	3	0
Schmorl	7	2	0	0	24	0
Fucsina de Ziehl	7	2	0	21	3	0
Fucsina de Mallory	7	2	0	21	3	0
Alternativo de Lillie (lipofuscina)	7	2	0	21	3	0
Argentafim de Lillie	7	2	0	21	3	0
Argentafim de Masson	7	2	0	21	3	0
Lillie (melaninas)	0	9	0	0	24	0
PAS após ação da amilase	4	5	0	21	3	0
PFAS	0	9	0	0	24	0
PAAS	0	9	0	0	24	0
Perls	0	9	0	0	24	0
Kutlik	0	9	0	0	24	0
Stein	0	9	0	0	24	0
Verocay	0	9	0	0	24	0

OBS.: Os números representam quantidade de casos positivos (+), negativos (—) ou em dúvida (±), do total de 9 casos para o homem e 24 casos para o cão.

UV = ultra violeta; PAS = reação ácido periódico + Schiff; PAAS = ácido peracético + Schiff; PFAS = ácido perfórmico + Schiff.

TABELA IV

Grupo etário (cão) segundo a porcentagem de casos de acordo com o teor do pigmento.

Grupo etário	Teor do pigmento			
	-	+	++	+++
Grupo I	96,0	4,0	0,0	0,0
Grupo II	25,0	66,6	8,3	0,0
Grupo III	0,0	25,0	50,0	25,0
Grupo IV	0,0	16,6	33,3	50,0
Grupo V	0,0	12,5	12,5	75,0
Grupo VI	0,0	0,0	28,5	71,4
Grupo VII	0,0	0,0	36,3	63,6
Grupo VIII	0,0	0,0	0,0	100,0

TABELA V

Grupo etário (homem) segundo a porcentagem de casos de acordo com o teor do pigmento.

Grupo etário	Teor do pigmento			
	-	+	++	+++
Grupo I	66,6	33,3	0,0	0,0
Grupo II	0,0	0,0	100,0	0,0
Grupo III	0,0	0,0	0,0	100,0

OBS.:
 - = nulo
 + = mínimo
 ++ = médio
 +++ = máximo

A extinção da autofluorescência pelo tratamento prévio dos cortes pelo permanganato, teste proposto por Brenner⁶ e que, segundo Lison³², caracteriza o ceróide, foi por nós obtida, tanto para o homem como para o cão. Infelizmente não encontramos referência a este fato em miocárdio na literatura compulsada. Mariano³⁷ a menciona em células nervosas de cães senis.

A basofilia dos lipopigmentos foi sempre posta em evidência pela maioria dos autores tratadistas, não sendo contudo determinada a natureza do fenômeno. Na opinião de Lison³², esta basofilia é devida à presença de grupamentos oxiácidos na composição química do pigmento. Para os cromolipóides e lípidos oxidados, este autor aponta basofilia até pH ao redor de 2,5 a 3,0 e, especificamente para lipofuscinas, sem mencionar a origem, afirma que a basofilia, às vezes, é muito intensa. Mariano³⁷ estudando um cromolipóide de células nervosas de cães encontrou basofilia até pH 3,4 enquanto que Cordes & Mosher⁸, na mesma espécie, na musculatura lisa do intestino, não encontraram basofilia em pH 3,5. Pearse⁴¹ assinala que a basofilia é fraca para "lipocromo" cardíaco. Em nosso material, quer da espécie humana quer da canina, a basofilia foi evidenciada em pH 5,6 extinguindo-se em pH mais baixo.

Enquanto que para a identificação do ceróide, na opinião de Lison³², a álcool-ácido-resistência é o método de escolha, já para o pigmento do miocárdio não tem a mesma utilidade pois, é um teste que se apresenta com resultados variáveis. Pearse⁴¹ assinala que o "lipocromo" cardíaco é usualmente positivo para este teste e que, em um mesmo corte histológico, encontramos grânulos positivos e outros negativos. Cordes & Mosher⁸ mencionam que o pigmento em miocárdio de cães apresenta fraca afinidade tintorial frente a este teste de álcool-ácido-resistência. Em todos os casos do nosso material de estudo, que tinham pigmento, este sempre apresentou álcool-ácido-resistência.

O teste da redução do ferricianeto férrico, que Schmorl utilizou para a evidência da lipofuscina e que muitos autores^{32, 41} mencionam como negativo para o ceróide, em nosso estudo, se apresentou positivo nos grânulos menores e negativo nos maiores na espécie humana e, nos cães, sempre foi negativo. Resultados variáveis foram encontrados, no miocárdio e em outros órgãos, por diversos autores. Assim, Lillie³⁰ menciona que, para a lipo-

fuscina cardíaca, a redução do ferricianeto é observada em alguns mas não em todos os casos; Pearse⁴¹ assinala que a reação de Schmorl no "lipocromo" cardíaco vai de fracamente positiva à negativa. Em cães, Cordes & Mosher⁸ a citam como positiva para o pigmento cardíaco e também para o ceróide de mama, e, Mariano³⁷ como negativa para o cromolipóide que estudou em neurônios de cão. Sem mencionar a localização, Barka & Anderson² citam para as lipofuscinas positividade na reação de Schmorl e, ainda, redução de sais de prata.

A capacidade redutora do lipopigmento cardíaco manifesta-se, também, quando se utilizam métodos que têm por princípio a redução da prata amoniacal. Entretanto esta redução é somente vista, segundo Lillie³⁰, em pequena porção dos grânulos. Para Pearse⁴¹, o "lipocromo" cardíaco não reduz a prata alcalina. Cordes & Mosher⁸, que utilizaram a reação argentafim de Fontana-Masson em corações de cães, encontraram resultados positivos. Para nós, em todos os casos, tanto a reação argentafim de Masson como a de Lillie, foram positivas.

Quanto às reações do PAS, PFAS e PAAS, os achados que os diversos autores mencionam variam muito. Assim, para Lison³², referindo-se aos cromolipóides em geral, o PAS e o PAAS podem ser ora positivos, ora negativo. Para Barka & Anderson², as lipofuscinas, em geral, dão um PFAS francamente positivo e Pearse⁴¹ cita o PAS como usualmente positivo. No caso específico do pigmento cardíaco, Pearse⁴¹ menciona como negativo o PAS e como positivo o PFAS; Cordes & Mosher⁸ citam para o miocárdio do cão um PAS positivo. Picard, Chambost & Vitry⁴², ainda em miocárdio de cão, assinalam a reação do PAS como de inconstante a positiva. Em nosso material, encontramos para o homem o PAS negativo para as idades igual e superiores a 60 anos, bem como negativos foram também os métodos do PFAS e PAAS em todas as idades. Para os cães o PAS sempre foi positivo e o PFAS e PAAS negativos.

Afora os testes mencionados e discutidos acima, o pigmento considerado em nosso estudo, em ambas as espécies, evidenciou-se com resultados positivos naqueles métodos que caracterizam os lipopigmentos. Assim, foi positivo para os corantes de gorduras como o Negro-Sudão B, Negro Sudão B após ação de solventes

e após ação de oxidantes; e ao sulfato de azul-do-Nilo pelo método de Hueck. Foi positivo também ao método de Mallory, originalmente descrito para hemofuscina mas que é positivo para os cromolipóides e ao método alternativo de Lillie para lipofuscinas.

Revelou-se negativo nosso material para os outros testes da sistemática proposta por Sasso, Castro e Pacheco⁵¹ que evidenciaram pigmentos de outros grupos que não os do cromolipóides. Assim, foi negativo ao teste do ácido sulfúrico concentrado que caracteriza os carotenóides, ao método de Lillie para melaninas, aos métodos de Perls, de Stein e de Kutlik que caracterizam os pigmentos derivados da hemoglobina e ao teste de Verocay.

Quanto à natureza e constituição dos grânulos, os testes efetuados em nosso material nos permitem concluir que o pigmento em estudo, tanto no homem como no cão, apresenta componentes lipídicos modificados, pelo fato de se corarem por corantes para gorduras, apresentarem cor a serem insolúveis em grande número de solventes. Há, possivelmente, a presença de grupamentos vic-glicóis ou afins como atesta a reação de PAS após ação da amilase. Possuem, ainda, o pigmento, grupos redutores revelados pela reação de Schmorl em alguns casos e, na totalidade dos casos pelas reações argentafins.

Dado as contradições ressaltadas na literatura somos levados a não aceitar como absoluto nenhum teste para a distinção entre ceróide e lipofuscina. Talvez novos estudos sistemáticos possam estabelecer outros critérios para distingui-los. É nossa opinião que deva prevalecer no miocárdio a denominação de lipofuscina por ser a mais antiga e, praticamente, consagrada pelos autores.

Na tentativa de se conseguir novos dados para detectar outros componentes no pigmento, empregamos, em miocárdio de cães, vários métodos além daqueles da sistemática acima mencionada. Assim, foi realizado o método do azul-de-alcian para mucosubstâncias ácidas e o teste da galocianina para ácido ribonucléico. Os resultados foram entretanto negativos.

Preocupou-nos, também, determinar o conteúdo do espaço claro junto aos polos dos núcleos além dos grânulos de pigmento. Assim, pelo método do PAS, em material fixado pelo líquido de Gendre, verificamos que não há hidratos de carbono

naquele local. Pela utilização da técnica do Negro-Sudão B, feita antes e depois da passagem de cortes de congelação em solventes para gorduras, verificamos que, junto aos polos do núcleo, além dos grânulos de pigmento, havia também material lipídico, fato que foi confirmado posteriormente pelo método de Elftman. Estes testes foram efetuados em miocárdio de cães.

Analisando-se os resultados obtidos no homem, relacionados na tabela VIII e no capítulo de resultados, verificamos que foram poucas as diferenças qualitativas, em relação à idade, frente aos nossos testes histoquímicos. Assim, constatamos que somente os 3 casos de idade mais avançada (60, 63 e 64 anos) foram negativos ao PAS após amilase. Este fato poderia significar que somente após os sessenta anos de idade a lipofuscina cardíaca atingiria seu estágio mais avançado, se nos basearmos na teoria evolucionária de Pearse⁴¹.

Na espécie canina não foram observadas diferenças no comportamento histoquímico do pigmento em relação à idade, isto é, o resultado qualitativo foi o mesmo, independente da idade do animal.

Na comparação entre espécies, verificamos que a reação de Schmorl apresentou-se positiva para o homem e negativa para os cães.

Quanto ao tamanho dos grânulos, os encontrados no miocárdio humano são aparentemente de dimensões maiores que aqueles encontrados no miocárdio de cães.

Em nosso estudo não pudemos constatar a variação da quantidade de pigmento que Munnell & Getty⁴⁰ assinalam em cães, utilizando a autofluorescência. Esta discordância correu, possivelmente, por conta dos métodos empregados.

Pela nossa avaliação, valendo-nos de quatro alternativas (—, +, ++ e +++), pudemos verificar que o pigmento aparece gradativamente com a idade, havendo com poucas exceções como pode ser visto na tabela III, uma correspondência entre quantidade de pigmento e idade. O mesmo fato pôde ser observado por nós na espécie humana, embora tenham sido utilizados somente 9 casos para fins de comparação.

Estas observações em miocárdio de cão, tanto nossas como de outros autores⁴⁰, reforçam as afirmações de Lebeau²⁸ de que a idade de 6 meses em um cão corresponde,

aproximadamente, à idade de 10 anos de uma criança e a de 8 anos corresponde a cerca de cinquenta anos no homem. Estas são respectivamente as idades humanas e canina, em que pode se iniciar a deposição do pigmento e as idades em que esta antige a quantidade final.

Segundo ainda Lebeau²⁸, as idades de 60 a 64 anos no homem correspondem aproximadamente às de 11 e 12 anos na espécie canina. Nestas condições seria de se esperar um comportamento histoquímico idêntico do pigmento em ambas as espécies nestas idades, se a gênese do mesmo dependesse exclusivamente das alterações metabólicas que caracterizam o envelhecimento, entretanto, verificamos pelos nossos dados que, pelo menos frente ao método do PAS, houve diferença evidenciando que o pigmento não "envelhece" da mesma maneira que o indivíduo. Isto sugere transformações intrínsecas do pigmento no decorrer do tempo, independente do metabolismo celular.

Pelo que depreendemos de nossos dados quantitativos obtidos em cães, a lipofuscina cardíaca parece independe do estado de saúde, da raça, do talhe e das condições em que viveram os animais, dado que, os 100 casos por nós estudados, tiveram as mais variadas procedências e apresentavam os mais diferentes tipos de enfermidades. Este fato corrobora os resultados obtidos por Munnell & Getty⁴⁰ que trabalharam com animais de mesma raça e em perfeita higiene.

Quanto à origem do pigmento, vários autores^{15,26} a admitem como relacionada a lisossomos. Podemos compartilhar dessa opinião visto que encontramos atividade da fosfatase ácida, enzima encontrada em grande quantidade no lisossomo², em alguns pontos dos grânulos. Contudo, a formação dos grânulos pode se iniciar a partir das membranas de diferentes organelas intracelulares, como suscitam as afirmações de Bjorksten⁴. Segundo este autor, ocorrem durante o ciclo vital numerosos fenômenos de interligação ("crosslinkage") entre as macromoléculas que constituem aquelas membranas. Como as macromoléculas são constituídas por lipoproteínas, poderiam haver fenômenos de interligação entre as moléculas de lípidos e entre as de proteínas, dando ensejo ao aparecimento de produtos refratários à ação enzimática. Seriam, ainda, resíduos hidrófobos (oleofílicos) e indifusíveis, portanto, de difícil remoção. Favorecendo a "crosslinkage"

existem os peróxidos e os radicais livres de curta duração¹⁴, que se formam nos processos metabólicos celulares. Os peróxidos foram evidenciados por diferentes autores nos grânulos pigmentares¹⁶. Necessariamente não há injúria ou lesão celular e esta modificação de estrutura físico-química aparece única e exclusivamente pelo maior tempo de exposição à ação de agentes "crosslinkers" e de radicais livres. Este fato explica, também, porque este pigmento é característico de células que não se renovam, como exemplo, as musculares e as nervosas, ensejando assim, seu acúmulo com o tempo.

CONCLUSÕES

1.^a — O pigmento encontrado junto aos núcleos das fibras musculares cardíacas do homem e do cão, enquadra-se na categoria de cromolipóide, segundo a classificação de Lison.

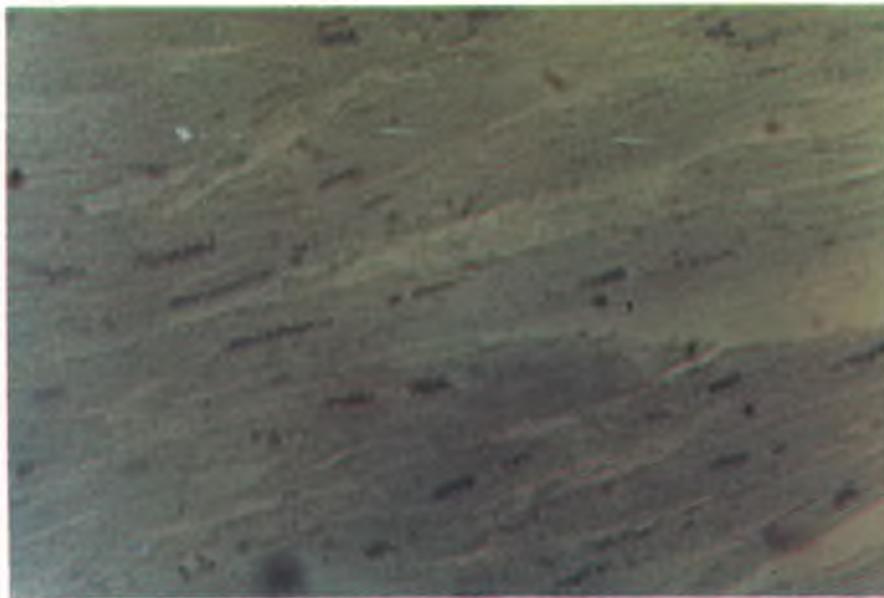
2.^a — À luz dos resultados de nossos testes histoquímicos, não é possível estabelecer-se a distinção entre ceróide e lipofuscina em miocárdio do homem e do cão.

3.^a — Os resultados dos métodos histoquímicos efetuados em pigmento miocárdico da espécie canina, mantêm-se constantes em todas as idades do animal, ao passo que, no do miocárdio de humanos de idade superior a sessenta anos a reação do PAS apresenta-se negativa.

4.^a — No cão, a quantidade máxima de cromolipóide cardíaco pode ser atingida dos seis aos oito anos de idade.

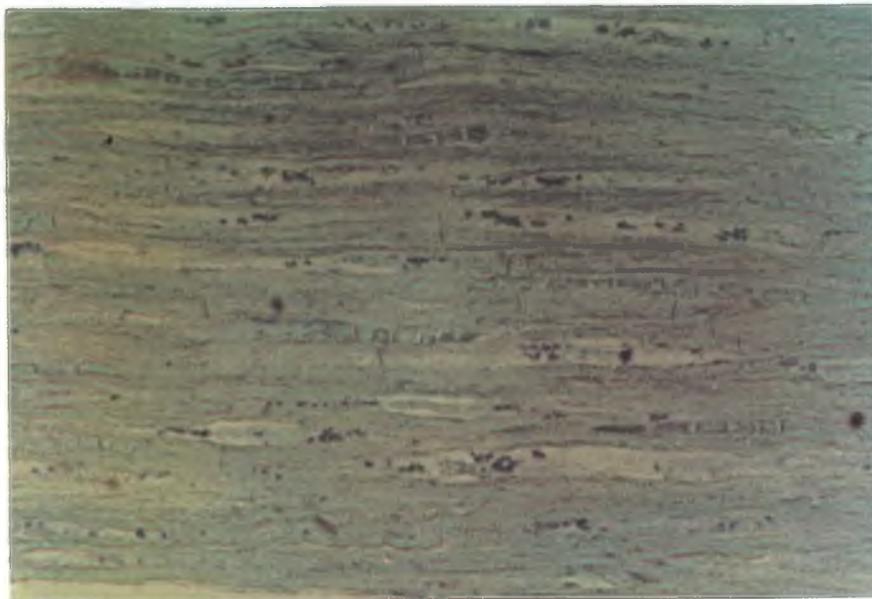
5.^a — O cromolipóide cardíaco, no material de nosso estudo, no cão pôde ser evidenciado aos 18 meses e no homem aos 10 anos de idade e aumentou progressivamente com a mesma.

6.^a — No cão, o cromolipóide cardíaco independente, qualitativa e quantitativamente, do estado de saúde clínica do animal.



Fotomicrografia n.º 1 — Lipofuscina em miocárdio de cão com 22 anos de idade. Os grânulos de pigmento, junto aos núcleos, apresentam-se corados intensamente em azul. Quantidade avaliada em ***. Método de Hueck. Aumento de aproximadamente 470 X.

GRECCHI, R. — Estudo histoquímico da lipofuscina cardíaca do homem e do cão em relação à idade. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:205-22, 1975.

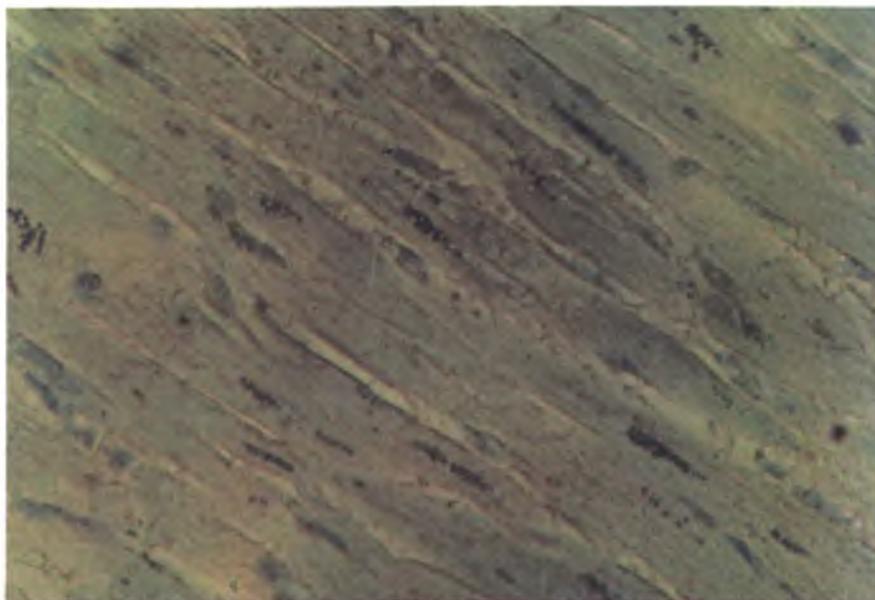


Fotomicrografia n.º 2 — Lipofuscina em miocárdio de cão com 5 anos de idade. Os grânulos de pigmento, junto aos núcleos, apresentam-se corados intensamente em azul. Quantidade avaliada em **. Método de Hueck. Aumento de aproximadamente 470 X.



Fotomicrografia n.º 3 — Lipofuscina em miocárdio de cão com 2 anos de idade. Os grânulos de pigmento, junto aos núcleos, apresentam-se corados intensamente em azul. Quantidade avaliada em *. Método de Hueck. Aumento de aproximadamente 470 X.

GRECCHI, R. — Estudo histoquímico da lipofuscina cardíaca do homem e do cão em relação à idade. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:205-22, 1975.



Fotomicrografia n.º 4 — Lipofuscina em miocárdio de homem de 64 anos de idade. Os grânulos de pigmento junto aos núcleos, apresentam-se corados intensamente em azul. Método de Hueck. Aumento de aproximadamente 470 X.

RFMV-A/19

GRECCHI, R. — *Histochemical studies of the cardiac lipofuscin in the heart of men and dogs related to age.* *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:205-22, 1975.

SUMMARY: Lipofuscin pigments were first detected in the heart of 10 years old humans and in dogs of eighteen months of age. The highest concentration of this type of pigment in the heart of dogs was observed in animals from 6-8 years of age and seems to have no quantitative or qualitative correlation to pathologic processes.

From the histochemical point of view the main difference observed is related to the PAS reactivity of the pigment which was negative in humans over 60 years of age and positive in all the different age groups of dogs examined.

UNITERMS: *Cardiac lipofuscin*; Dog*; Lipofuscin, histochemistry*.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDREW, W. — *Cellular changes with age*. Springfield, Charles C. Thomas Publ., 1962, p. 3.
2. BARKA, T. & ANDERSON, P. J. — *Histochemistry: theory: practice and bibliography*. New York, Hoeber Medical Division, 1963, 660 p.
3. BJORKERUD, S. & CUMMINS, J. T. — Selected enzymic studies of lipofuscin granules isolated from bovine cardiac muscle. *Exp. Cell Res.*, 32:510-520, 1963.
4. BJORKSTEN, J. — The crosslinkage theory of aging. *J. Amer. Geriat. Soc.*, 16:408-427, 1968.
5. BONDAREFF, W. — Genesis of intracellular pigment in the spinal ganglia of senile rats. An electron microscope study. *J. Geront.*, 12:364-369, 1957.
6. BRENNER, S. — Ceroid in the human ovary, with special reference to its mode of formation. *S. Afr. med. Sci.*, 11:173-176, 1946.
7. CONNOR, C. L. — Studies on lipochromes. IV. The nature of the pigments in certain organs. *Amer. J. Path.*, 4: 293-308, 1928.
8. CORDES, D. O. & MOSHER, A. H. — Brown pigmentation (lipofuscinoses) of intestinal muscularis. *J. Path. Bact.*, 92:197-206, 1966.
9. CURTIS, H. J. — Biological mechanisms underlying the aging process. *Science*, 141:686-694, 1963.
10. DIXON, K. C. — Hydrophobic lipids in injured cells. *Histochem. J.*, 2:151-187, 1970.
11. DOGLIOTTI, G. C. — La struttura del miocardio dell'uomo nei vari individui e nelle varie età. Ricerche di anatomia microscopica del miocardio su 200 cuori normali in rapporto alla senescenza ad alla costituzione individuale. *Boll. Soc. ital. Biol. sper.*, 5:294-296, 1930, apud ANDREW, W., p. 36.
12. DUNCAN, D.; NALL, D.; MORALES, R. — Observations in the fine structure of old age pigment. *J. Geront.*, 15: 366-372, 1960.
13. EINARSON, L. — A method for progressive selective staining of Nissl and nuclear substance in nerve cells. *Amer. J. Path.*, 8:295-307, 1932.
14. ENDICOTT, K. M. & LILLIE, R. D. — Ceroid, the pigment of dietary cirrhosis of rats. Its characteristics and its differentiation from hemofuscin. *Amer. Path.*, 20:149-153, 1944.
15. ESSNER, E. & NOVIKOFF, A. B. — Human hepatocellular pigments and lysosomes. *J. Ultrastruct. Res.*, 3:374-391, 1960.
16. GOLDFISCHER, S.; VILLAVERDE, H.; FORSCHIRM, R. — The demonstration of acid hydrolase, thermostable reduced diphosphopyridine nucleotide tetrazolin reductase and peroxidase activities in human lipofuscin pigment granules. *J. Histochem. Cytochem.*, Baltimore, 14:641-652, 1966.
17. GRECCHI, R.; MARIANO, M.; SALIBA, A. M.; ZEZZA NETTO, L. Ceroid pigment in ovary of mare. Histochemical study. *Rev. bras. Biol.*, 26:361-366, 1966.
18. GRECCHI, R. — Estudo histoquímico de pigmento em fígados cirróticos de cães. *Rev. Fac. Med. vet. (São Paulo)*, 8:195-213, 1969.
19. HARMS, W. — Morphologische und experimentelle Untersuchung an alternden Hunden. *Z. Anat. Entwickl.-gesch.*, 71: 319-381, 1924.
20. HENDLEY, D. D.; MILDVAN, A. S.; REPORTER, M. C.; STREHLER, B. L. — The properties of isolated human cardiac age pigment. II. Chemical and enzymatic properties. *J. Geront.*, 18:250-259, 1963.
21. HODGE, C. F. — Changes in ganglion cells from birth to senile death. Observations on man and honey bee. *J. Physiol.*, 17:129-134, 1894, apud JAYNE, E. P., p. 319.
22. HOLT, S. J. — Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon the Gomori acid fosfatase technique. *Exp. Cell Res.*, (Suppl., 7) 1-27, 1959.

23. HUECK, W. — Pigmentstudien. *Beitr. z. path. Anat.*, Stuttgart, 54:68, 1912, apud CONNOR, C. L., p. 293.
24. JAYNE, E. P. — Cytochemical studies of age pigments in the human heart. *J. Geront.*, 5:319-325, 1950.
25. KATCHBURIAN, E.; SASSO, W. S.; DELLA SERRA, O. — Estudo histoquímico de um pigmento da célula hepática do bugio *Alouatta fusca*. *Rev. bras. Biol.*, 21:131-138, 1961.
26. KOENIG, H. — Histochemical study of lysosomes and lipofuscin granules in the nervous system (rat, cat, man). *Anat. Rec.*, 148:303, 1964.
27. KUMAMOTO, T. & BOURNE, G. H. — Histochemical localization of respiratory and other hydrolytic enzymes in neuronal lipopigment (lipofuscin) in old guinea pigs. *Acta histochem.*, 16: 87-100, 1963.
28. LEBEAU, A. — L'âge du chien et celui de l'homme. Essai de statistique sur la mortalité canine. *Bull. Acad. vét. Fr.*, 26:229-232, 1953.
29. LILLIE, R. D. — The basophilia of melanins. *J. Histochem. Cytochem.*, 3: 453-454, 1955.
30. LILLIE, R. D. — *Histopathologic technic and practical histochemistry*. 3rd. ed., New York, Mc Graw-Hill Book Co., 1965, 715 p.
31. LILLIE, R. D.; DAFT, F. S.; SEBRELL JR., W. H. — Cirrhosis of the liver in rats on a deficient diet and the effect of alcohol. *Publ. Hlth. Rep.*, 56: 1255-1258, 1941.
32. LISON, L. — *Histochimie et cytochimie animales*. 3e. éd. Paris, Gauthier-Villars, 1960, 842 p.
33. LUBARSCH, O. — Über das sogenannte Lipofuscin. *Virchows Arch. path. Anat.*, 239:491-503, 1922.
34. McMANUS, J. F. A. — Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, London, 158 (4006): 202, 1946.
35. McMANUS, J. F. A. & MOWRY, R. W. — *Staining methods. Histologic and histochemical*. New York, Hoeber Medical Division, Harper & Row Publishers, 1965, 432 p.
36. MALKOFF, D. B. & STREHLER, B. L. — The ultrastructure of isolated and in situ human cardiac age pigment. *J. Cell Biol.*, 16:611-616, 1963.
37. MARIANO, M. — Chromolipoid in nerve cells of aged dogs. *Rev. bras. Biol.*, 28:135-140, 1968.
38. MAYER, J. — Problems of organic growth. *Nature*, London, 164(4158): 65, 1949.
39. MORAIS, F. F. — Histochemical study of the ceroid pigment in dentigerous cysts. *Ann. Histochem.*, 9:221-228, 1964.
40. MUNNEL, J. F. & GETTY, R. — Rate of accumulation of cardiac lipofuscin in the aging canine. *J. Geront.*, 83: 154-158, 1968.
41. PEARSE, A. G. E. — *Histochemistry-theoretical and applied*. 2nd. ed., Gloucester, J. & A. Churchill, 1961, 998 p.
42. PICARD, D.; CHAMBOST, G.; VITRY, G. — Sur les corps sidérophiles de la fibre musculaire cardiaque et leurs rapports avec les lipofuscines. *Acta anat.*, 30:613-623, 1957.
43. POLAK, M. — *Técnica de Polak para evidenciar o condrioma: Curso de técnicas de impregnações argênticas*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1953, p. 4 (mimeografado).
44. PRYOR, W. A. — Free radicals in biological systems. *Sci. Amer.*, 223:70-83, 1970.
45. RECKLINGHAUSEN, F. — Über Hamochromatose. *Tageblatt der 62. Versammlung Gesellsch. Naturf.u. Artze*, 1889, p. 324-325, apud ENDICOTT, K. M. & LILLIE, R. D., p. 152.
46. REICHEL, W. — Lipofuscin pigment accumulation and distribution in five organs as function of age. *J. Geront.*, 23:145-153, 1968.
47. RUBINSTEIN, L. J. — Aging changes in muscle. In: BOURNE, G. H. — *Structure and function of muscle*. New York, Academic Press, 1960, v. 3, p. 217.
48. SAMORAJSKI, T.; KEEFE, J. R.; ORDY, J. M. — Intracellular localization of lipofuscin age pigment in the nervous system. *J. Geront.*, 19:262-276, 1964.

GRECCHI, R. — Estudo histoquímico da lipofuscina cardíaca do homem e do cão em relação à idade. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:205-22, 1975.

49. SAMORAJSKI, T.; ORDY, J. M.; KEEFE, J. R. — The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice. *J. Cell Biol.*, 26:779-795, 1965.
50. SAMORAJSKI, T.; ORDY, J. M.; RADYREIMER, P. — Lipofuscin pigment, accumulation in the nervous system of aging mice. *Anat. Rec.*, 160:555-573, 1968.
51. SASSO, W. S.; CASTRO, N. M.; PACHECO, I. P. — Histochemical study of the pigment found in the epithelium of the kidney of the *Philodryas schotii* (Schlegel). *J. Histochem. Cytochem.*, 6:233-236, 1958.
52. SCHIEFFERDECKER, P. — Untersuchungen des menschlichen Herzens in Verschiedenen Lebensalternin bezug auf die Grossenverhältnisse der Fasern und Kerne. *Arch. f. Physiol.*, 165: 499-564, 1916, apud ANDREW, W. p. 36.
53. STFEHLER, B. L.; MARK, D. D.; MILDVAN, A. S.; GEE, M. V. — Rate and magnitude of age pigment accumulation in the human myocardium. *J. Geront.*, 14:430-439, 1959.
54. TOKUMARU, M. & FERRI, A. G. — Histochemistry of the pigments found in the liver, spleen and kidney of the fresh-water fish. *Rev. bras. Biol.*, 30: 163-171, 1970.
55. VEST, W. E. — The phenomena of normal senescence. *W. Va. med. J.*, West Virginia, 39:198-208, 1943, apud *Biol. Abstr.*, 17:20048, 1943.
56. VILLA, N. — Caracterização de um pigmento ceróideo em células intersticiais do ovário de cadela *Canis familiaris* (Carnivora, Mammalia). *Rev. Fac. Odont.*, São Paulo, 2:49-57, 1964.

Recebido para publicação em 22-7-75

Aprovado para publicação em 17-9-75