



# Influência da Longevidade da Solução de Verhoeff na Intensidade/Especificidade das Fibras Elásticas, em Material Biológico de Origem Suína

Raquel R. Meneses<sup>1</sup>; Sílvia C. F. Kakoo<sup>1</sup>; Vera A. Q. Damião<sup>1</sup>; Elisabete Carolino<sup>1</sup>, Carina Ladeira<sup>1,2</sup>  
1 - Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa (ESTeSL)  
2 - Centro de Investigação e Estudos em Saúde Pública (CIESP)

Correspondência para Vera Damião - e-mail: vera.damiao@hotmail.com

## RESUMO

As fibras elásticas são responsáveis pela elasticidade e flexibilidade dos tecidos. A técnica de Verhoeff é o método mais utilizado para demonstrar a presença destas fibras, corando-as de preto. A solução de Verhoeff é exclusivamente utilizada de um modo extemporâneo, no entanto pela revisão da literatura verificou-se que a mesma poderia ter uma maior durabilidade. O presente estudo tem como principal objectivo determinar a longevidade da solução de Verhoeff. Utilizou-se material biológico de origem suína, fixado em formol neutro tamponado a 10% e incluído em parafina. Foram avaliadas um total de 33 lâminas segundo critérios de intensidade e especificidade. Os resultados obtidos provam que o tempo tem influência sobre a referida solução, levando à perda de intensidade de coloração, não se tendo registado alterações significativas a nível de especificidade. Concluiu-se que a solução de Verhoeff pode não ser uma solução descartável, encontrando-se em perfeitas condições de utilização até às 48h de repouso.

**PALAVRAS-CHAVE:** solução de Verhoeff, fibras elásticas, longevidade.

## INTRODUÇÃO

As fibras elásticas representam cerca de 5% do tecido conjuntivo, sendo constituídas essencialmente por elastina e por microfibrilas [1]. São responsáveis pela flexibilidade e retracção elástica, conferindo assim aos tecidos a capacidade de se distenderem facilmente e de voltarem ao seu comprimento normal após abolição da tensão e conseqüente relaxamento [2, 3].

A técnica de Verhoeff é um dos métodos de coloração mais utilizados para demonstrar a presença de fibras elásticas, proporcionando bons resultados [4]. Esta técnica baseia-se num método regressivo em que todo o tecido se encontra saturado de reagente, sendo removido o excesso de corante de forma selectiva, por uma solução diferenciadora que quebra as ligações entre o tecido e a solução corante. Geralmente, este método é utilizado quando é solicitada uma acuidade extrema de distinção entre estruturas [5].

A sobrecoloração é realizada através da solução de Verhoeff constituída por hematoxilina férrica de Weigert, iodo e cloreto férrico. O cloreto férrico e a iodina forte funcionam como agentes mordentes e oxidantes, convertendo a hematoxilina em hemateína [4 - 6].

O mecanismo de ligação da solução de Verhoeff às fibras elásticas é desconhecido, mas supõe-se que ocorre por ligações de hidrogénio [7].

A diferenciação é conseguida pela utilização de excesso de mordente - cloreto férrico 2%, o qual quebra o complexo tecido-corante. O corante é extraído do tecido pela atracção proporcionada pela grande quantidade de mordente presente na solução diferenciadora [4, 5].

As fibras elásticas têm grande afinidade para a hematoxilina férrica, formando complexos insolúveis. Estas retêm o corante durante mais tempo, resistindo à acção do diferenciador, permanecendo coradas, enquanto que as restantes estruturas são descoradas [6].

A diferenciação deve ser realizada cuidadosamente de modo a não ocorrer uma descoloração excessiva, principalmente das fibras mais finas [4].

O contraste é realizado com a picrofucsina de Van Gieson, no entanto, este não deve ser muito prolongado, pois o ácido pícrico presente na referida solução actua também como diferenciador podendo perder-se a evidência de estruturas importantes [4].

Nesta coloração, as fibras elásticas vão aparecer coradas de preto, bem como os núcleos, enquanto que as fibras de colagénio aparecem coradas de vermelho e estruturas como o

citoplasma, eritrócitos, músculo e fibrina adquirem a coloração amarela [4, 5].

A solução de Verhoeff é extemporânea, sendo preparada apenas aquando da sua utilização. No entanto, Bancroft e Gamble (2008) indicam, sem referenciar, que apesar de algumas publicações mais antigas afirmarem que a solução tem uma duração de utilização de apenas 2 a 3h, resultados satisfatórios têm sido obtidos com a utilização da solução até 48h [4].

As principais motivações para a realização desta investigação residem no facto de ser uma temática inovadora e relevante tanto a nível económico, como na rentabilização de tempo e recursos, principalmente em serviços cujos pedidos de colorações histoquímicas sejam frequentes.

Este estudo assenta na seguinte questão de investigação: “Será que a Longevidade da solução de Verhoeff influencia a intensidade e/ou especificidade da marcação das fibras elásticas, em cortes histológicos de origem suína?”

Estabeleceu-se como objectivo geral comparar a solução de Verhoeff extemporânea e a solução de Verhoeff não extemporânea, verificando se os resultados obtidos são similares. Definiu-se como objectivos específicos: determinar a influência do tempo de repouso da solução de Verhoeff não extemporânea na coloração das fibras elásticas de cortes histológicos de pele, pulmão e artéria de origem suína; analisar e comparar microscopicamente as diferenças entre a solução extemporânea de Verhoeff (lâminas controlo) e o conjunto de diferentes tempos de repouso dessa mesma solução; aferir a longevidade da solução de Verhoeff e indicar o tempo de repouso até ao qual esta é passível de utilização.

O tempo de repouso da solução representa a variável independente e a intensidade/especificidade de coloração representam as variáveis dependentes.

## MATERIALE MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no laboratório de Histopatologia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, tendo em conta todas as considerações ético-legais. O material biológico utilizado consistiu em amostras de pele, pulmão e artéria, de origem suína e sem manifestações patológicas, sendo que esta escolha foi efectuada com base na representatividade das estruturas a estudar, as quais são ricas em fibras elásticas [3].

O critério de amostragem foi não probabilístico por selecção racional [8, 9]. Foram colhidos 5

fragmentos de cada amostra e distribuídos por 15 cassetes, os quais foram fixados em formol neutro tamponado a 10% durante 48h, processados no STP 120 Microm® e incluídos em parafina, no aparelho EC 350-2 Microm®. O critério de escolha do número de fragmentos teve em conta a elaboração de lâminas de reserva para prevenir eventuais imprevistos que implicassem a repetição da técnica. Assim, apenas foi utilizado um exemplar de cada tecido, pois sendo a proveniência a mesma, não existiria qualquer vantagem em analisar lâminas redundantes.

Procedeu-se, laboratorialmente, à preparação de todas as soluções necessárias à elaboração da coloração, sem qualquer recurso a soluções comerciais (Figura 1). Os cortes foram obtidos através de micrótomo de Minot (RM 2235 Leica®), tendo sido estipulada uma espessura constante de 3µm, para garantir que diferenças na intensidade de coloração se devem, exclusivamente, à influência dos diferentes tempos de repouso da solução e não à variação da espessura dos cortes. Todos os cortes foram realizados pelo mesmo investigador. Foram realizadas lâminas para a solução de Verhoeff extemporânea (controlo positivo) e, para o conjunto de tempos 5, 10, 24, 30, 36, 48, 58, 72, 82 e 168h de repouso desta mesma solução. Para tal, foi utilizada uma única solução, inicialmente como extemporânea, a qual foi sendo submetida aos referidos tempos de repouso, de forma sequencial, ao fim dos quais se realizava a coloração. A técnica de Verhoeff foi executada segundo o protocolo estabelecido pelo laboratório onde decorreu o estudo (Figura 1).

1. Desparafinar e hidratar;
2. Solução de Verhoeff - 30min;
3. Lavar em água corrente - 10min;
4. Diferenciar em Cloreto Férrico 2% - 30seg;
5. Lavar em água corrente;
6. Tiosulfato de Sódio - 1min;
7. Lavar em água corrente;
8. Contrastar com Van Gieson - 3min;
9. Desidratar, clarificar e montar.

### Preparação de soluções:

Verhoeff: Cloreto Férrico 10% + Hematoxilina 5% + Iodina forte

Iodina forte: Iodeto de Potássio (4g) + Iodina (2g) + Água destilada (100ml)

Solução de Van Gieson: Solução aquosa saturada de Ácido Picrico (100ml) + Fucsina Ácida 1% (10ml)

Figura 1 - Protocolo da coloração de Verhoeff estipulado pelo laboratório de Histopatologia da ESTeSL.

À semelhança dos cortes, as colorações foram realizadas sempre pelo mesmo investigador de forma a minimizar a introdução de variáveis estranhas. Sendo o passo da diferenciação um passo chave no sucesso desta técnica, estipulou-

-se um tempo preciso de diferenciação de 30 segundos, que foi criteriosamente cumprido. Só foi possível estipular esse tempo específico de diferenciação mediante uma experimentação prévia de tempos alternativos acompanhados pelo devido controlo microscópico.

Das lâminas efectuadas, foram avaliados um total de 33 exemplares (3 tecidos x 11 tempos). A avaliação das mesmas foi efectuada de forma cega por 2 observadores experientes, independentes e externos à investigação. Para tal, utilizou-se uma escala de classificação/validação baseada em parâmetros de intensidade (0- Ausência de coloração, 1- Coloração muito fraca, 2- Coloração fraca, 3- Coloração moderada, 4- Coloração intensa, 5- Coloração muito intensa) e especificidade de marcação (0- Sem estruturas coradas, 1- Coloração apenas de estruturas inespecíficas, 2- Coloração de estruturas específicas e inespecíficas, 3- Coloração apenas de estruturas específicas), a qual foi construída pelos autores. A referida grelha constituiu instrumento de recolha de dados.

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística através do Software Informático SPSS 15.0 tendo sido aplicadas as seguintes medidas estatísticas: Estatística Descritiva e Teste de Friedman [10].

**RESULTADOS**

Para verificar se há ou não influência do tempo nas propriedades de coloração, aplicou-se o teste de Friedman. Da sua aplicação detectou-se a influência do tempo na intensidade, para cada um dos avaliadores (Avaliador 1 - valor  $p < 0,0001 < \alpha = 0,05$ ; Avaliador 2 - valor  $p = 0,001 < \alpha = 0,05$ ). Pela aplicação do mesmo teste, relativamente à especificidade não se detectaram diferenças significativas (valor  $p > \alpha$ ) razão pela qual este parâmetro não será objecto de uma análise mais detalhada. Para se determinar de que forma é que o tempo influencia, recorreu-se à estatística descritiva.

O Gráfico I diz respeito ao Índice Global de Avaliação (IGA), resultante das classificações referentes à intensidade de coloração, realizadas pelos 2 avaliadores. Relativamente ao pulmão a solução proporciona resultados satisfatórios apenas até às 5h. Na artéria os bons resultados prolongam-se até às 48h. Na pele esta situação verifica-se até às 82h, sendo que até às 30h a intensidade de coloração foi muito intensa, de um modo idêntico ao valor obtido para a solução extemporânea.

O Gráfico II proporciona uma visão geral da

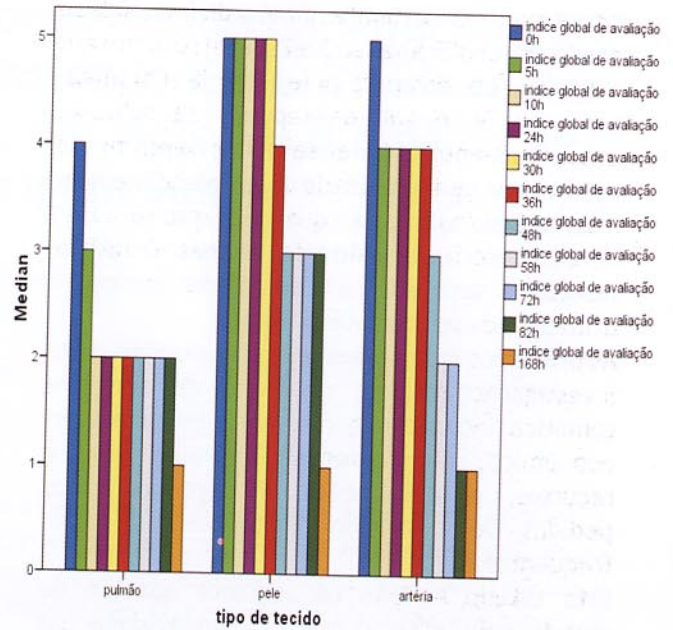


Gráfico I - Influência do tempo de repouso da solução na intensidade de coloração individualizada para os 3 tecidos em estudo.

durabilidade da solução para o conjunto dos 3 tecidos, verificando-se que a solução é viável (mediana = 3) até às 48h.

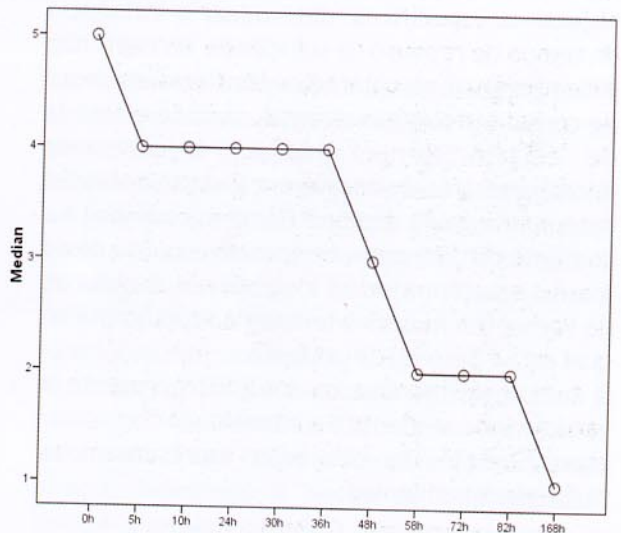


Gráfico II - Influência do tempo de repouso da solução na intensidade de coloração para o conjunto dos 3 tecidos em estudo.

De forma a ilustrar melhor os referidos resultados seleccionaram-se algumas imagens representativas do momento para o qual ainda é possível a obtenção de resultados satisfatórios bem como para o momento subsequente, no qual a solução já não é passível de utilização. As Figuras 2, 4 e 6 correspondem aos resultados obtidos para a pele, artéria e pulmão, com 82, 48 e 5h de repouso de solução, respectivamente. Para estes casos ainda é possível observar uma intensidade de coloração moderada,

correspondendo ao limite mínimo de intensidade satisfatória. As Figuras 3, 5 e 7 dizem respeito aos resultados obtidos para pele, artéria e pulmão, com 168, 58 e 10h de repouso da solução, respectivamente. Há a salientar uma perda significativa de intensidade de coloração, a qual passa a ser fraca para os dois primeiros casos (pele e artéria) e muito fraca para o último (pulmão).

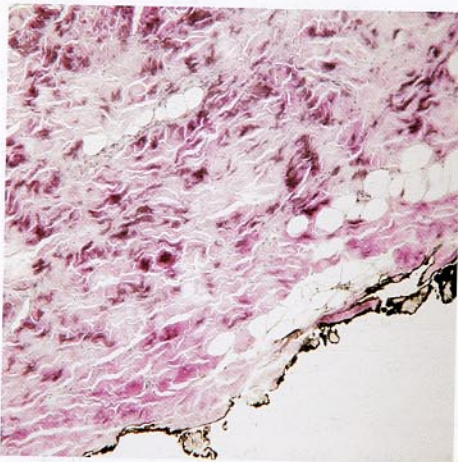


Figura 2 - Coloração de Verhoeff para a pele com 82h de repouso da solução, 100x.

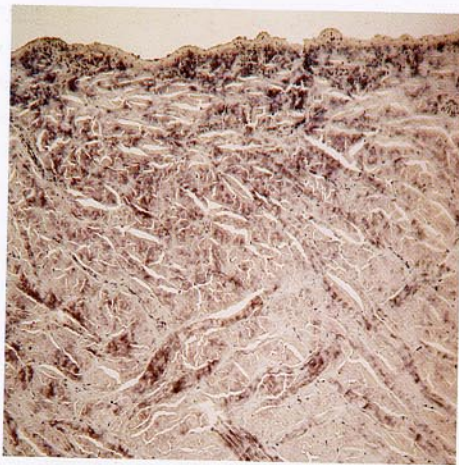


Figura 3 - Coloração de Verhoeff para a pele com 168h de repouso da solução, 100x.

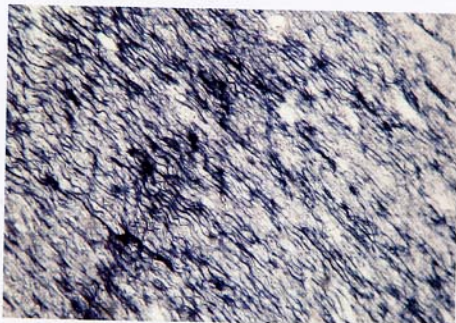


Figura 4 - Coloração de Verhoeff para artéria com 48h de repouso da solução, 100x.

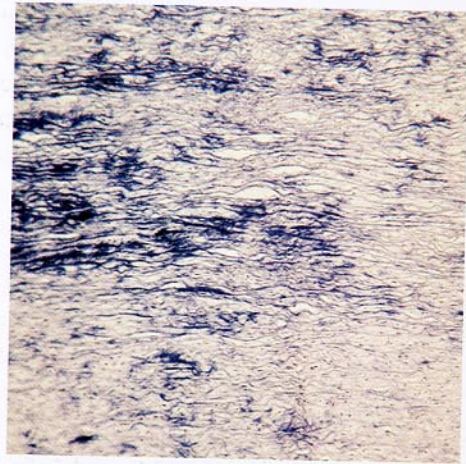


Figura 5 - Coloração de Verhoeff para artéria com 58h de repouso da solução, 100x.

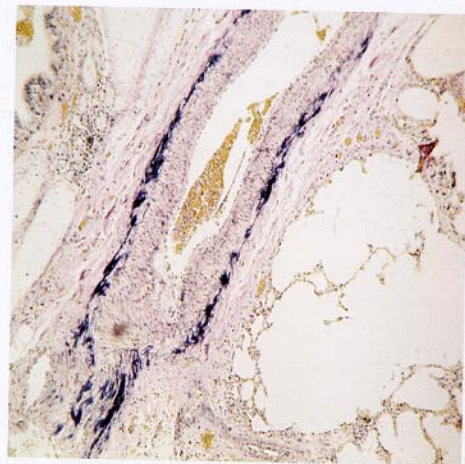


Figura 6 - Coloração de Verhoeff para pulmão com 5h de repouso da solução, 100x.

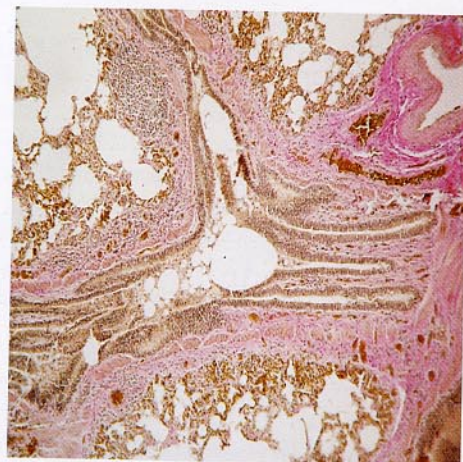


Figura 7 - Coloração de Verhoeff para pulmão com 10h de repouso da solução, 100x.

Investigação

## DISCUSSÃO

A pele foi eleita como o tecido para o qual se verificaram os melhores resultados, sendo seguida da artéria, observando-se os resultados menos satisfatórios no pulmão. Dado que as condições de fixação, processamento e coloração foram idênticas, ao longo do tempo e para cada tecido, estas diferenças de resultados tendem a estar relacionadas com a capacidade de retenção do corante, a qual é variável de tecido para tecido e depende de factores como a solubilidade do corante nas substâncias tecidulares, a densidade e ainda a permeabilidade das estruturas [5].

Constatou-se que o tempo efectivamente influencia a qualidade da solução, que com o passar do tempo diminui, perdendo propriedades de coloração. Este aspecto dever-se-á ao facto da solução de Verhoeff ser constituída por substâncias oxidantes como a iodina e o cloreto férrico [5, 6]. Estas são necessárias para a oxidação da hematoxilina, a qual por si só não funciona como corante, sendo que apenas o produto da sua oxidação (hemateína), é que apresenta essa capacidade. Para tal é essencial a presença dos referidos oxidantes em solução [4 - 6]. No entanto, estas substâncias oxidantes, com o passar do tempo, acabam também por levar à sobre-oxidação e, conseqüentemente degradação da solução, sendo responsáveis pela sua perda de qualidade [6, 11].

Foi possível concluir que a solução Verhoeff é passível de utilização para além do momento da sua preparação, ou seja, não é uma solução exclusivamente extemporânea, proporcionando resultados satisfatórios após algum tempo de

repouso. Como já foi referido, o tempo limite de utilização desta solução depende de tecido para tecido, no entanto, de um modo geral é possível a obtenção de resultados viáveis até às 48h de utilização, verificando-se desta forma a hipótese referida em Bancroft & Gamble [4].

De futuro pensa-se que seria relevante a existência de mais abordagens científicas nesta área, com a realização de mais estudos, que pudessem contribuir para melhorar e ampliar o conhecimento. Por exemplo, poder-se-iam aplicar estes estudos a amostras humanas com patologia relacionada com alteração das fibras elásticas, pois neste contexto o arranjo das fibras difere da disposição característica da dos tecidos saudáveis. Outro aspecto a abordar em estudos futuros, poderia ser o aumento do número de casos, de forma a poder generalizar os resultados com maior fiabilidade.

Relativamente à solução (e dado que esta permaneceu à temperatura ambiente durante o estudo) seria interessante explorar a conservação desta no frio, uma vez que as temperaturas mais baixas podem atrasar a degradação da solução, e aumentar o período de tempo durante a qual esta se mantém passível de ser utilizada, com bons resultados. Outra hipótese relacionada com a utilização da solução durante mais tempo, tem a ver com a diferenciação mediante controlo microscópico, em vez da realizada mediante um tempo previamente estipulado e optimizado. Assim, à medida que a coloração vai perdendo intensidade devido à sua oxidação, o excesso de corante existente inicialmente nas fibras diminui e, desta forma, o período de diferenciação necessário será menor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stevens A, Lowe J. Epithelial Cells. Human Histology. 2ª Ed. Londres: Elsevier Mosby; 1997. p.53.
2. Young B, Weather J. Connective Support Tissue. Weather Functional Histology. 4ª Ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone; 2000. p.66-73.
3. Seeley T, Stephens T, Tate P. Histologia: O Estudo dos Tecidos. Anatomia & Fisiologia. 6ª Ed. Loures: Lusociência; 2003. p.127-128.
4. Bancroft J D, Gamble M. Connective Tissues and Stains. Theory and Practice of Histological Techniques. 6ª Ed. Nova Iorque: Churchill Livingstone; 2008. p.151-153.
5. Moral R G. Fundamentos Generales de Coloracion. Laboratorio de Anatomia Patológica. Madrid: Interamericana McGraw Hill; 1993. p.125.
6. Kiernan J. Methods for Connective Tissue. Histological & Histochemical Methods Theory & Practice. 3ª Ed. Londres: Hodder Arnold; 2005. p.160.
7. Carson F. Connective and Muscle Tissue. Histotechnology - a self instructional text. 2ª Ed. Chicago: ASCP Press; 1996. p.138-140.
8. Fortin M. O Processo de Investigação. Loures: Lusociência; 1999.
9. Bell J. Como realizar um projecto de investigação. Lisboa: Gradiva Publicações; 1997.
10. Pestana M, Gageiro J. Análise de Dados para Ciências Sociais - a complementaridade do SPSS. 3ª Ed. Lisboa: Edições Sílabo; 2003.
11. Prophet E *et al.* Métodos Histotecnológicos. EUA: Registos de Patologia dos Estados Unidos da América; 1995.