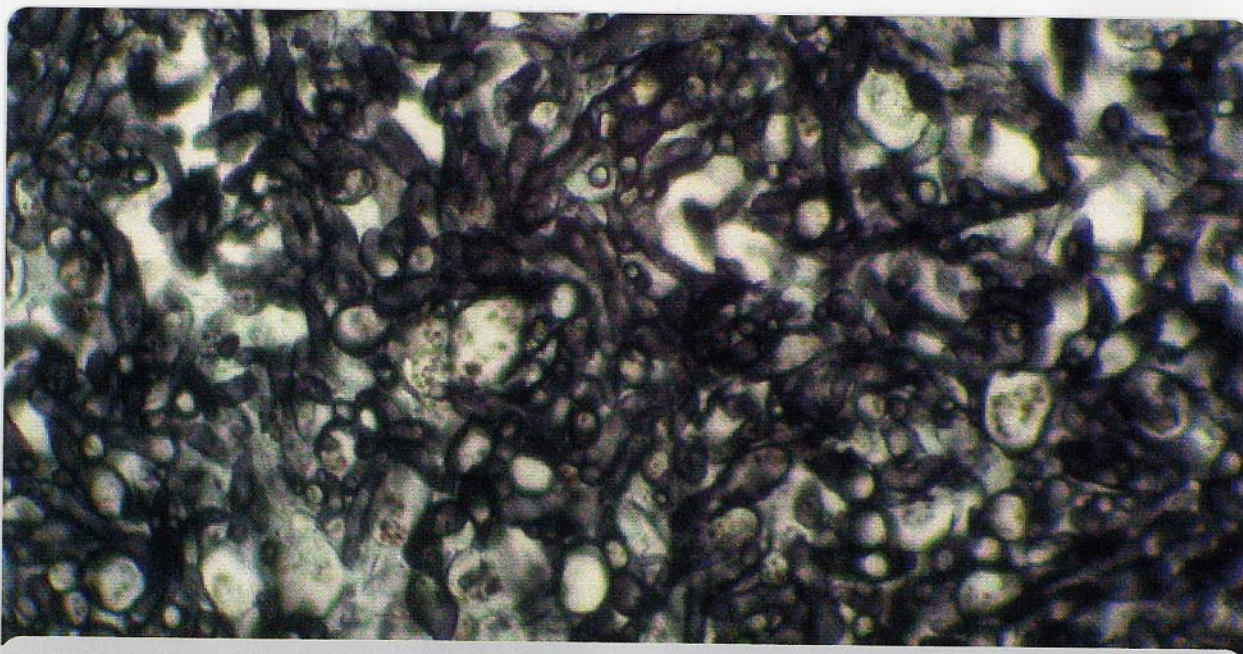


Protocolo alternativo da técnica de Grocott

Carina A. Ladeira¹; Cátia S. Ribeiro²; Edite R. Figueira³; José M. Marques⁴

1- ESTeSL; 2- Hospital do Espírito Santo de Évora; 3- Hospital CUF Descobertas, Lisboa; 4- Hospital Militar Principal, Lisboa

Correspondência para: Edite Figueira – email: meditefigueira@hotmail.com



A técnica de Grocott, de grande utilidade na detecção de fungos, utiliza o ácido crómico que é tóxico, corrosivo e cancerígeno. Esta técnica é morosa, nomeadamente na actuação do agente oxidante e na impregnação com solução de prata metenamina na estufa. Foram objectivos deste trabalho substituir o ácido crómico por outro agente oxidante, de menor perigosidade que permita marcação similar de fungos, reduzir a duração da técnica, através da utilização do microondas em detrimento da estufa testando a sua viabilidade e verificar o tempo / potência que permite melhores resultados. A amostra corresponde a fragmentos de pulmão colhidos em necrópsia. Inicialmente substituiu-se a estufa pelo microondas, tendo sido realizados 18 ensaios testando várias potências: 500W, 550W, 600W, 650W, 700W e 750W; com os tempos 1, 1.30 e 2 minutos. Posteriormente substituiu-se o ácido crómico, recorrendo a 4 agentes oxidantes (ácido periódico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, peróxido de hidrogénio), a diferentes concentrações e sem agente oxidante. Para cada um variou-se o tempo em 1, 3, 5 e 10 minutos. Os resultados foram quantificados por três observadores segundo uma grelha de avaliação que contemplava quatro parâmetros: intensidade de marcação, percentagem de fungos marcados, marcação inespecífica de fundo e preservação morfológica.

Os agentes oxidantes utilizados apresentaram bons resultados, à excepção do ácido sulfúrico. O agente oxidante alternativo de eleição é o ácido periódico devido à menor perigosidade de manipulação e ao respectivo impacto económico. A intensidade de marcação ideal foi obtida em microondas com potência de 650 Watts durante 1 minuto.

Palavras-chave:

Técnica de Grocott; Protocolo Alternativo; Agente Oxidante; Microondas.

INTRODUÇÃO

Os fungos são uma classe de seres vivos que possuem características especiais, merecendo por isso o seu próprio reino – Reino Fungi. São organismos eucariontes, maioritariamente multicelulares, embora alguns possam ser unicelulares (leveduras) que geralmente possuem paredes celulares constituídas por quitina e outros materiais [1].

A quitina é um polímero, constituído por uma sequência linear de açúcares monoméricos, designada de N-acetilglicosamina, que confere elevada rigidez e maior resistência à degradação microbiana [2].

Algumas espécies de fungos desempenham um papel importante na vida do Homem, no entanto existem outras que são extremamente prejudiciais para a saúde, provocando inúmeras doenças [3].

Para detectar a presença de microorganismos em secções de tecido, podem ser utilizadas várias técnicas tais como: H&E, Giemsa, *Acid-fast technics*, coloração Gram de Brown-Brenn, técnica de Hotchkiss-McManus PAS e Bauer, Grocott e Gridley [4].

A técnica de Grocott, resultante da alteração da técnica de Gomori, é a impregnação por metais pesados mais utilizada para a marcação de diversos fungos, tais como: *Aspergillus fumigatus*, *Actynomices israeli*, *Blastomyces dermatidis*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Nocardia asteróides*, *Pneumocystis jiroveci*, *Sporothrix schenckii*. Neste tipo de impregnação o tecido intervém activamente na deposição da prata metálica através de uma reacção química de redução. Geralmente, são colorações que permitem separar componentes celulares, em função da sua capacidade de reduzir o nitrato de prata amoniacal em prata metálica sem a intervenção de agentes redutores externos [5].

No Grocott realiza-se uma impregnação através de uma solução aquosa, fortemente alcalina, de prata metenamina. Este complexo metálico reage com os polissacarídeos da parede dos fungos, reduzindo a prata, que precipita e se torna visível, marcando de preto a parede dos fungos.

O princípio em que se baseia a técnica resulta inicialmente na oxidação dos polissacarídeos existentes em relativa abundância na parede dos fungos, promovida pelo ácido crómico. Este processo de oxidação é propositadamente prolongado de modo a permitir a fa-

lência de determinados grupos aldeídos recentemente formados, impossibilitando-os de se ligarem à prata [6].

A técnica de Grocott fornece resultados satisfatórios na identificação de fungos, no entanto apresenta vários inconvenientes. O agente oxidante utilizado – ácido crómico – apresenta uma elevada toxicidade, que incide sobretudo a nível renal, é corrosivo para a pele e mucosas, cancerígeno, pelo que a sua utilização deveria ser idealmente eliminada [7]. O Grocott é uma técnica morosa, nomeadamente na actuação do agente oxidante (1H) e na impregnação com solução de prata metenamina na estufa a 60°C (1H).

Objectivos

Tendo em conta estes factos decidiu-se realizar um estudo com os seguintes objectivos:

1. Reduzir a duração da técnica de Grocott, através da utilização do microondas em detrimento da estufa testando a sua viabilidade.
2. Determinar o tempo/potência que permite atingir melhores resultados.
3. Substituir o ácido crómico por um agente oxidante, de menor perigosidade para a saúde e de acção mais rápida.

MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com este estudo de caso com vertente experimental [8], designaram-se como variáveis independentes as diferentes potências de microondas, o tempo de incubação e os agentes oxidantes ou ausência deste.

A variável dependente corresponde à qualidade final da coloração. Para quantificar esta variável utilizaram-se os seguintes parâmetros: intensidade de marcação, percentagem de fungos marcados, marcação inespecífica de fundo e preservação morfológica.

Procedimentos Técnicos

A amostra utilizada foi retirada da população alvo, correspondente a todos os fragmentos de pulmão colhidos em autópsia. Pelo facto deste material nos ser cedido, a população acessível resume-se aos fragmentos de pulmão colhidos em autópsias no ano 2003. Para a definição da amostra a estudar, tornou-se necessário estabelecer como critério fundamental a exis-

tência de fungos no fragmento de pulmão. Assim, a amostra corresponde a 2 fragmentos de pulmão colhidos em autópsia no ano de 2003.

Realizaram-se cortes histológicos de cada caso com uma espessura de 3mm utilizando um microtómo de corrediça (Leica SM2000R), colocados em lâminas adesivadas SuperfrostPlus®, e posteriormente, levadas à estufa.

Os ensaios realizados foram efectuados em microondas (MW, Vip20 Philips®) e em estufa (Trade Raypa®). As colorações foram efectuadas segundo o protocolo de Grocott prata metenamina para fungos (Gomori 1946, Grocott 1955), retirado de Bancroft e Stevens[5].

Numa primeira fase substituiu-se a estufa pelo microondas. Para tal, foram realizados 18 ensaios em MW testando diferentes potências e tempos como indica a Tabela I. Numa segunda fase, realizaram-se 48 ensaios utilizando substitutos do Ácido crómico, recor-

Tabela I: Síntese das experiências realizadas na 1.ª fase

Agente oxidante	Potência	Tempo	Nº de lâminas
Ácido crómico 1H	500	2min	9
	550		9
	600		9
	650	1min30seg	9
	700		9
	750	1min	9
Total	18 Ensaios		54 Lâminas

Tabela II: Síntese das experiências realizadas na 2.ª fase

Agente oxidante	Concentração	Tempo	N.º de Lâminas
Ác. crómico	5%	10min	12
Ác. periódico	1%, 5%		24
Ác. nítrico	0.5%, 1%, 2%		36
Ác. sulfúrico	0.1%, 0.25%, 0.5%	5min	36
Peróxido de hidrogénio	3%, 30%	3min	24
		1min	12
Sem agente oxidante	-		12
Total	48 Ensaios		144

rendo-se a 4 substâncias químicas oxidantes, a diferentes concentrações, variando para cada uma o tempo (Tabela II).

Instrumentalização

Para quantificar cada um dos parâmetros (intensidade de marcação, percentagem de fungos marcados, marcação inespecífica de fundo e preservação morfológica) que caracterizam a variável dependente, seleccionou-se uma escala diferencial que permite resultados sob a forma de dados quantitativos numa escala de intervalo.

1. Intensidade de marcação

Capacidade de promover a visualização dos fungos de forma evidente e distintiva das estruturas envolventes. Para a medição do parâmetro intensidade aplicou-se uma escala que apresentava 5 unidades de avaliação, posteriormente ordenada de 0-4, sendo estas: marcação nula (0), fraca (1), moderada (2), forte (3) e muito forte (4), respectivamente (Fig. 1).

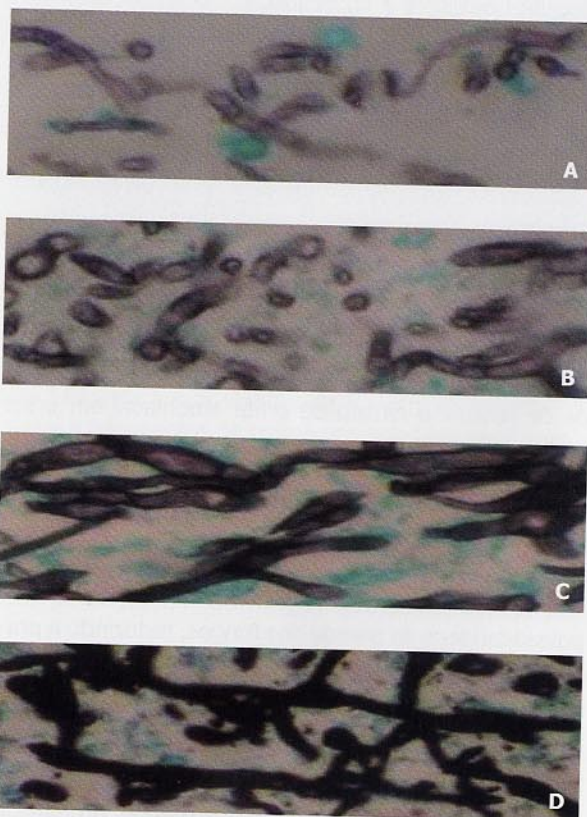


Fig. 1: Grelha de avaliação da intensidade de marcação: A – Fraca (0), B – Moderada (1), C – Intensa (2), D – Muito intensa

2. Percentagem de fungos marcados

Quantidade de fungos marcados num total de 100. Para a medição do parâmetro percentagem de fungos marcados aplicou-se uma escala que apresentava 5 unidades de avaliação, posteriormente ordenada de 0-4, sendo estas: 0% (0), 1%-25% (1), 26%-50% (2), 51%-75% (3), 76%-100% (4), respectivamente.

3. Marcação inespecífica de fundo

Corresponde a toda a marcação causada por uma reacção inespecífica dos reagentes a estruturas celulares e outras de modo a dificultar a identificação das estruturas pretendidas. De forma a medir este parâmetro aplicou-se uma escala que apresentava 4 unidades de avaliação, sendo estas: nula (3), fraca (2), moderada (1) e intensa (0).

4. Preservação morfológica

Manutenção da forma das estruturas celulares, contra a alteração ou qualquer tipo de dano derivado da manipulação ou das reacções provocadas pela coloração. Para a medição do parâmetro preservação morfológica aplicou-se uma escala que apresentava 3 unidades de avaliação, posteriormente ordenada de 0-2, sendo estas: sem preservação morfológica (0), algumas alterações morfológicas (1), com preservação morfológica (2).

Para cada um destes parâmetros, atribuiu-se o mesmo factor de ponderação cuja soma resultou num score final:

- Não satisfaz (0-5)
- Satisfaz (6-7)
- Bom (8-11)
- Muito Bom (12-13).

As lâminas foram avaliadas por 3 observadores independentes. A análise estatística da média das observações e *scores* médios foi realizada em Microsoft Excel 2003.

RESULTADOS

Depois de aplicadas as técnicas em estudo e a respectiva avaliação das lâminas, os *scores* médios obtidos para cada potência variaram entre 6,55 para a

potência 750W e 11,42 para potência 650W (Gráfico I).

A 750W durante 2' observou-se marcação inespecífica intensa (Fig. 2). A 500W durante 2' e a 650W durante 1' verificou-se marcação intensa dos fungos sem marcação inespecífica de fundo (Fig. 3).

Gráfico I: Score médio dos ensaios para cada potência

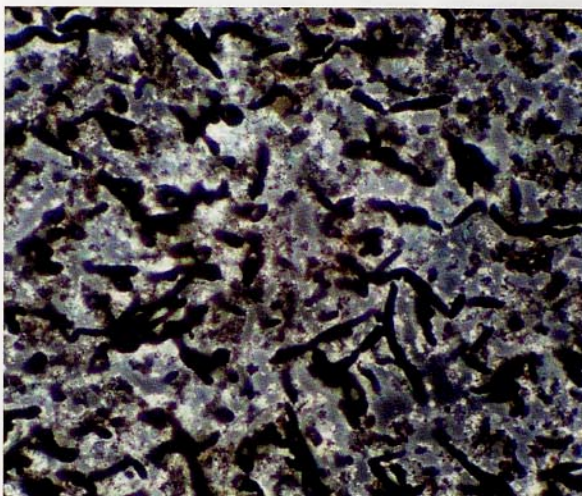
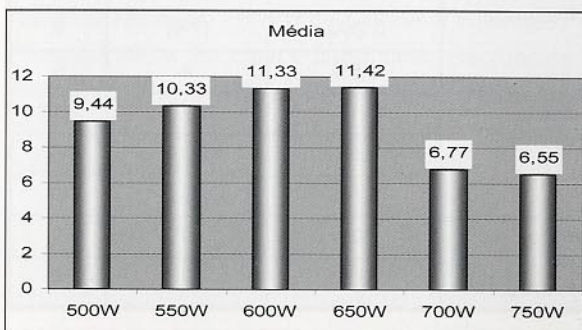


Fig. 2: MW 750W a 2 minutos (Grocott, 400 X)

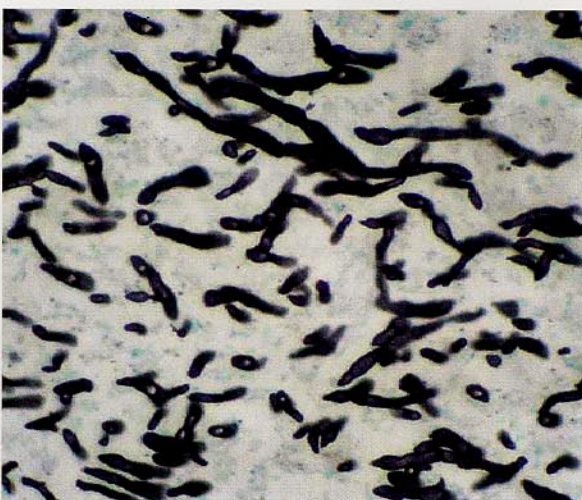


Fig. 3: MW 650W a 1 minutos (Grocott, 400 X)

Tabela III – Resultados da 2ª fase

Reagente	Concentração	Intervalo de classificação	Média
Ácido Crómico	5%	11	11
Ácido Periódico	1%	[10-11]	10,25
Ácido Sulfúrico	0,1%	[7-9]	8,33
	0,25%	[7-9]	8
	0,5%	9	9
Ácido Nítrico	0,1%	[9-10]	9,33
	0,25%	[9-10]	9,33
	0,5%	9	9
Peróxido de Hidrogénio	30%	9	9
	3%	9	9

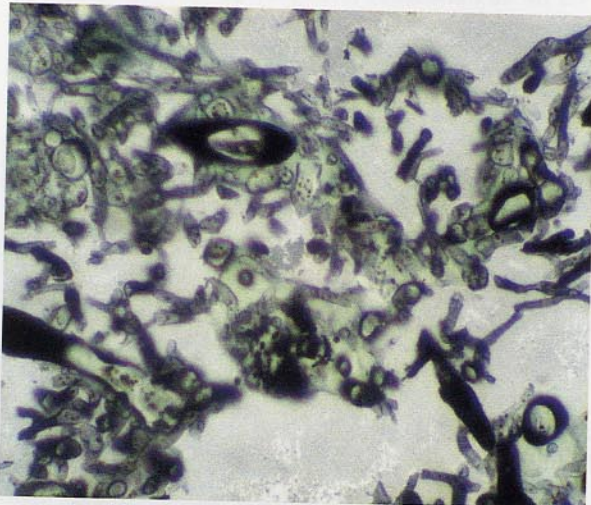


Fig. 4: Ácido nítrico 0,5% a 10 minutos (Grocott, 400 X)

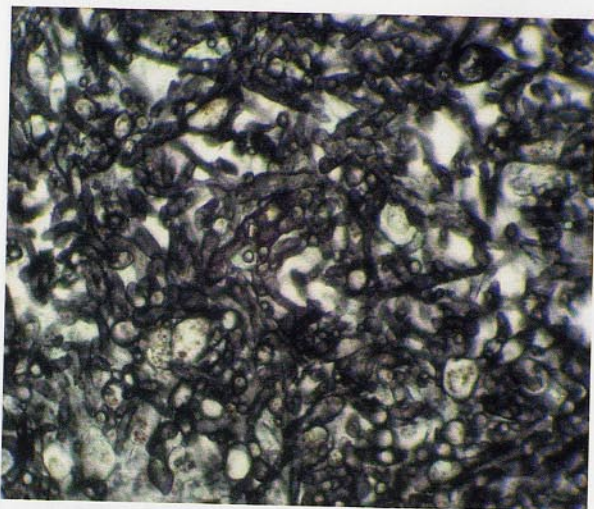


Fig. 5: Ácido periódico 1% a 1 minuto (Grocott, 400 X)

0.25% e 10.25 para o ácido periódico a 1%, sendo que o controlo, ácido crómico, obteve *score* médio de 11 (Tabela III).

O ácido nítrico a 0.5% marca com pouca intensidade uma baixa percentagem de fungos e provoca marcação inespecífica de fundo (Fig. 4). O ácido periódico a 1% demonstra uma intensidade de marcação intensa, percentagem máxima de fungos marcados, ausência de marcação inespecífica de fundo e preservação da morfologia (Fig. 5).

DISCUSSÃO

As experiências efectuadas na primeira fase consistiram na realização de vários ensaios utilizando o microondas, mantendo a estufa como controlo positivo. Verificou-se que as lâminas que permaneceram uma hora na estufa apresentaram intensidade de marcação ideal e ausência de marcação inespecífica. No entanto, é um método muito demorado, pelo que, recorrendo ao microondas foi possível alcançar resultados análogos. Da análise dos resultados concluiu-se que, para 1 minuto a 650W as lâminas apresentaram uma marcação intensa (ideal) dos fungos e ausência de marcação inespecífica.

As experiências efectuadas na segunda fase referem-se à substituição do agente oxidante convencionalmente utilizado, ácido crómico, por outros agentes oxidantes. Através da análise dos resultados obtidos verifica-se que o ácido sulfúrico actua de forma deficiente na oxidação da parede dos fungos, sendo que este foi o *score* médio mais baixo do conjunto dos agentes oxidantes (Tabela III). De forma geral, todos os agentes químicos oxidantes tiveram uma classificação qualitativa de boa. O peróxido de oxigénio é uma boa alternativa quando não existe qualquer outro agente oxidante, sendo efectivo mesmo na sua forma concentrada a 30%.

Desta forma verifica-se, no conjunto das duas fases da experiência, que a intensidade de marcação ideal com ausência de marcação inespecífica foi obtida em forno de microondas com potência de 650W durante 1 minuto com ácido periódico como agente oxidante alternativo. A utilização de ácido periódico apresenta várias vantagens relativamente ao ácido crómico, uma vez que é mais económico e com menor perigosidade [9]. Desta forma, é possí-

vel obter resultados similares na técnica de marcação de fungos pelo Grocott através da utilização de forno de microondas e ácido periódico como agente oxidante, sendo efectivo a 1', a partir de um protocolo alternativo que, para além de primar pela segurança do Técnico de Anatomia Patológica, permite um protocolo mais rápido e, conseqüentemente, um diagnóstico mais célere e igualmente fidedigno.

Este estudo apresenta algumas limitações, tais como a quantidade da amostra que não permite a generalização de resultados e a ausência de uma escala validada para a quantificação das técnicas de histoquímica pode inferir alguma subjectividade da aplicação por parte dos avaliadores.

AGRADECIMENTOS

Para a concretização deste trabalho foi fundamental a colaboração de várias pessoas às quais agradecemos. Ao professor Amadeu Ferro pela sua disponibilidade e disposição imediata em nos auxiliar em todas as dúvidas.

A todos os técnicos que nos receberam calorosamente no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Militar Principal e SAMS onde efectuamos os trabalhos experimentais, tendo-nos facultado algum material e em situações pontuais esclareceram as nossas dúvidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. & Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. (4.ª ed.). EUA: John Wiley and Sons.
- [2] Prescott, M., Harley, J., & Klein, D. (1996). *Microbiology* (3.ª ed.). USA: Wc. C. Brown Publishers.
- [3] Burton, G.R. & Engelkirk, P.G. (1998). *Microbiologia para as Ciências da Saúde* (5.ª ed.). Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.
- [4] Hrapchak, B. & Sheehan, D. (1980). *Theory and Practice of Histotechnology* (2.ª ed.). Columbus: Battelle Press.
- [5] Bancroft, J. D. & Stevens, A. (1975). *Histological stains and their diagnostic uses*. USA: Churchill Livingstone.
- [6] Bancroft, J. D. & Gamble, M. (2002). *Theory and Practice of Histological Techniques* (5.ª ed.). USA: Churchill Livingstone.
- [7] Merck (2007). Fichas de dados de seguridad: ácido crómico (MSDS, fds). Recuperado em 2006, Fevereiro 07 de
- [8] Fortin, M. F. (2003). *O Processo de Investigação: da Concepção à Realização* (3.ª ed.). Loures: Lusociência.
- [9] Faenquil (2003). Ficha de segurança: ácido periódico. Recuperado em 2006, Fevereiro 07 de