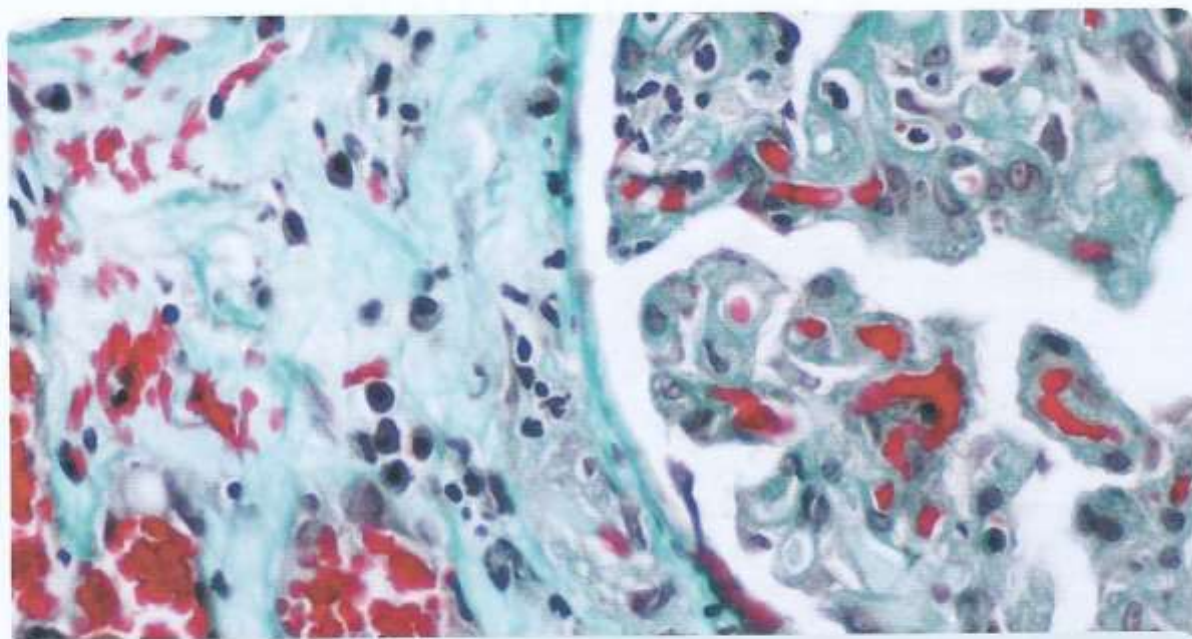


## Optimização da Técnica do Tricrómio de Masson

Amadeu B. Ferro<sup>1</sup>; Isabel Alves<sup>2</sup>; Maria A. Silva<sup>3</sup>; Olga Carrujo<sup>4</sup>

1- ESTeSL – Lisboa; 2- LAPRoriz; 3- HSC – Lisboa; 4 - HSM – Lisboa

Correspondência para: Amadeu B. Ferro – e-mail: amadeu.ferro@estesl.lpl.pt



A crescente valorização de diagnósticos diferenciais em Anatomia Patológica conduziu à procura recorrente das colorações especiais que podem ser uma ferramenta de baixo custo e de fácil execução. Dentro das colorações especiais o Tricrómio de Masson tem como objectivo principal evidenciar as fibras de colagénio e recorre às soluções corantes: hematoxilina férrica de Weigert, fucsina ácida/ponceau de xilidina e verde-luz; e aos ácidos fosfomolibdico/fosfotúngstico e acético. O principal princípio de actuação do Tricrómio de Masson baseia-se na diferença de permeabilidade que existe entre as fibras de colagénio e os outros elementos do tecido. Quando os componentes proteicos de um tecido são expostos a um agente fixador ocorrem interações entre as proteínas do tecido, sendo formada uma rede proteica tridimensional e insolúvel, sabendo-se que diferentes proteínas formam diferentes tipos de rede com diferentes permeabilidades. Neste contexto surge o nosso estudo, que pretende estudar a qualidade da coloração de Tricrómio de Masson, comparando 6 variações à técnica original, tendo como objectivo a identificação da variante que permite a maior qualidade de coloração. Efectuamos um estudo de base quantitativa, com componente experimental, mas sem preocupações generalizadoras, tendo como testes positivos fragmentos de rim e definindo as variantes com base na utilização de diferentes ácidos em diferentes momentos.

Os resultados obtidos evidenciam a perda de intensidade de coloração pela não utilização de qualquer ácido na técnica do Tricrómio de Masson. Verifica-se ainda que a não utilização do ácido acético na preparação dos solutos e como intensificador final também implica perda de intensidade de coloração. Este estudo permite concluir que, nos casos estudados, a variação que utilizou o ácido fosfotúngstico e o ácido acético é a que permite uma melhor qualidade de coloração das estruturas em estudo.

### Palavras-chave:

Tricrómio de Masson; Variantes de protocolo.

Artigo aceite após revisão.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a crescente valorização de diagnósticos diferenciais em Anatomia Patológica (AP) conduziu à procura recorrente das técnicas de histoquímica ou colorações especiais que podem ser uma ferramenta de baixo custo e de fácil execução.

O termo Tricrómio é aplicado em algumas destas colorações pois são usados três corantes [1]. Dentro das colorações tricrómicas focamos o Tricrómio de Masson que recorre às soluções corantes: hematoxilina férrica de Weigert, fucsina ácida/ponceau de xilidina e verde-luz. O principal princípio de actuação do Tricrómio de Masson baseia-se na diferença de permeabilidade que existe entre as fibras de colagénio e os outros elementos do tecido[9], pois quando os componentes proteicos de um tecido são expostos a um agente fixador ocorrem interacções entre as proteínas do tecido, sendo formada uma rede proteica tridimensional e insolúvel, sabendo-se que diferentes proteínas formam com os constituintes celulares diferentes tipos de rede com diferentes permeabilidades. Assim, as proteínas dos eritrócitos e músculo produzem uma "rede" bastante densa com pequenos poros entre os elementos proteicos e alguns tipos de colagénio são os que têm a "rede" menos densa e bastante porosa. Desta forma, as moléculas corantes mais pequenas irão penetrar em qualquer dos tipos de tecido e as moléculas corantes maiores só podem penetrar no colagénio deixando o músculo e os eritrócitos sem cor[1]. Mais especificamente podemos afirmar que a fucsina ácida/ponceau de xilidina com peso molecular 586/494 permite a coloração final dos citoplasmas de eritrócitos e músculo e o verde-luz (pm - 793) permite a coloração final do colagénio [1, 3].

Existem, no entanto, outros elementos intervenientes na coloração com um papel fundamental, que são apresentados em seguida.

### Ácido Fosfomolibdico/Ácido Fosfotúngstico

Após uma coloração difusa de todos os elementos pela fucsina ácida/ponceau de xilidina, há uma diferenciação pelo ácido fosfomolibdico que para além de fixar a cor no citoplasma retira-o do colagénio, passando a ter uma função de mordente para o

corante seguinte – verde luz – que irá corar o colagénio de verde[1]. O ácido fosfomolibdico (AFM) e o ácido fosfotúngstico (AFT), são ácidos formados pela conjugação do ácido fosfórico com o ião molibdico e o ião túngstico respectivamente. O AFM e o AFT não produzem reacções idênticas nas colorações tricrómicas, embora sejam semelhantes, actuando como mordente para os corantes aniónicos utilizados nestas colorações. Estes ácidos também vão actuar como agentes acidificantes da solução[1]. O AFM é utilizado na coloração do Tricrómio de Masson na maioria dos laboratórios de AP. No entanto, a utilização do AFT em substituição do AFM pode ser realizada devido ao facto do primeiro ter características muito semelhantes as do segundo, tornando-se assim relevante analisar os resultados de cada um, de forma a seleccionar o mais eficiente.

### Ácido Acético

Os corantes utilizados para as fibras do tecido conjuntivo e colagénio são ácidos, pelo que são dissolvidos em ácido acético, o que vai permitir não só conservar as soluções por mais tempo como intensificar a coloração e permitir que ela se mantenha inalterada a longo prazo num arquivo de lâminas [4].

### Hematoxilina Férrica de Weigert

Os corantes utilizados para as fibras do tecido conjuntivo e colagénio são ácidos, pelo que é necessário corar o núcleo com um corante ácido-resistente[1]. Apesar de alguns mecanismos de acção da coloração do Tricrómio de Masson já estarem documentados ainda subsiste alguma heterogeneidade de critérios relativamente à escolha do melhor protocolo para aplicação laboratorial. Com este trabalho procurámos realizar variações à Técnica, pretendendo avaliar qual das alternativas demonstra maior eficácia na qualidade de visualização das estruturas tecidulares com vista a facilitar o diagnóstico.

### Objectivos

Partindo dos elementos anteriormente referidos foram constituídos vários objectivos:

1 – Corar cortes histológicos pela coloração do Tricrómio de Masson em seis variantes diferentes, que utilizam di-

ferentes combinações de ácidos como diferenciadores, mordentes, acidificadores ou intensificadores finais.

- 2 – Avaliar a qualidade da visualização das estruturas tecidulares utilizando as seis variantes seleccionadas;
- 3 – Identificar a variação que permite melhor qualidade na visualização das estruturas tecidulares;

## MATERIAL E MÉTODOS

O método utilizado, enquadra-se nas referências do paradigma quantitativo com uma base experimental. Dado o limitado número de casos em estudo, não se pretende generalizar ou extrapolar resultados e conclusões. Optou-se por realizar um estudo prospectivo, em que as observações são colhidas a partir do momento em que a investigação começa [6].

Definiu-se como variável independente, o tipo de técnica do Tricrómio de Masson a utilizar. Com génese no protocolo base – ver **Tabela I** – foram delineados seis variantes (VAR I a VI) à técnica com base na utilização de diferentes ácidos em diferentes momentos – ver **Tabela II**.

Consideramos como variável dependente, a qualidade de coloração das estruturas tecidulares. A técnica que terá maior qualidade na visualização das estruturas tecidulares será aquela que permite uma maior intensidade de coloração de: núcleos, eritrócitos, fibrina,

músculo liso e colagénio I, III e IV.

### Procedimentos Técnicos

O trabalho foi realizado recorrendo a fragmentos de rim fixados em formol tamponado a 10% (bio-óptica 05k01004) durante cerca de 24 horas, à temperatura ambiente (20°C). Posteriormente foram processados e incluídos em parafina. Dos blocos obtidos realizaram-se 36 cortes histológicos em micrótomo de Minot (Leica-Dsc1), que foram posteriormente utilizados para a execução das diferentes variantes. A montagem das lâminas foi feita em Entellan.

### Tratamento de Dados

Para avaliar a qualidade de coloração das estruturas tecidulares, as lâminas coradas foram observadas em microscópio óptico por quatro avaliadores independentes, que utilizaram uma escala com 5 níveis para a intensidade de marcação (**Tabela III**). Para cada uma das estruturas foi obtido um score de intensidade de coloração resultante da soma dos valores atribuídos por cada avaliador. Assim, obteve-se um score parcial que variou entre 0 e 16 (sendo 0 o valor correspondente à pior qualidade possível e 16 o valor correspondente à melhor). Posteriormente foi constituído um score final (que variou entre 0 e 80) para cada variante, resultante da soma dos valores obtidos para cada estrutura.

**Tabela I** – Protocolo base de Tricómio de Masson.

Reagentes	Protocolo	Resultados
<b>Soluto A</b> Hematoxilina de Weigert A + B em partes iguais	1 - Desparafinar e hidratar até à água destilada.	Núcleos: Pretos
<b>Soluto B</b> -2cc de Ponceau de Xilidina a 1% em ácido acético a 1%	2 - Hematoxilina de Weigert – 6 minutos (soluto A). 3 - Água morna e a seguir água destilada – 5 minutos.	Músculo, eritrócitos, fibrina: Vermelho
-1cc de Fucsina Ácida a 1% em ácido acético a 1%	4 - Ponceau de Xilidina / Fucsina Ácida – 10 minutos (soluto B). 5 - Água destilada.	Colagénio: Verde
<b>Soluto C</b> Ácido Fosfomolibdico a 1%	6 - Aplicar diferenciador/mordente – (soluto C) até o colagénio descorar.	
<b>Soluto D</b> Verde Luz a 2% em ácido acético 1%	7 - Contrastar com o Verde Luz – 10 segundos (soluto D). 8 - Água destilada. 9 - Diferenciar com Ácido Acético 1%. 10 - Desidratar, diafinizar e montar com Entellan.	

**Tabela II – Variantes à Técnica do Tricómio de Masson**

Var	Diferenciador/ mordente		Acidificação das Soluções Corantes com ácido acético		Intensificação Final por ácido acético	
	Fosfomolibdico	Fosfotúngstico	Sim	Não	Sim	Não
I	✓	✗	✓	✗	✓	✗
II	✗	✓	✓	✗	✓	✗
III	✓	✗	✗	✓	✗	✓
IV	✗	✓	✗	✓	✗	✓
V	✗	✗	✓	✗	✓	✗
VI	✗	✗	✗	✓	✗	✓

Legenda: ✓ - utilização do ácido ✗ - não utilização do ácido

**Tabela III – Intensidade de coloração**

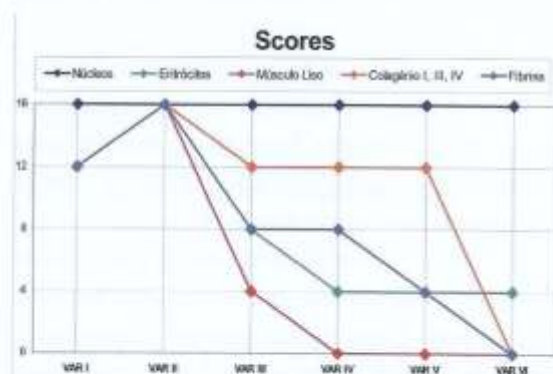
Intensidade de coloração	Score
Nula	0
Fraca	1
Média	2
Forte	3
Muito forte	4

**DISCUSSÃO**

Verificou-se que a não utilização de qualquer ácido na técnica (VAR VI) implica que músculo liso, colagénio e fibrina não apresentem qualquer coloração (Fig. 1), enquanto que a utilização do ácido acético sem qualquer outro ácido (VAR V) fez com

**RESULTADOS**

O score final mais elevado (80) foi atribuído à Var II e o score mais reduzido foi o da Var VI (20). A Var I obteve um score final de 64, a Var III e a Var IV obtiveram ambas 48 e a Var V obteve 36 – ver Gráfico I.



**Gráfico I:** Scores obtidos.



**Fig. 1:** VAR VI. Artéria de médio calibre.

que apenas o músculo liso não apresente coloração (Fig.2). O facto de haver perda de intensidade de coloração pela não utilização de qualquer ácido na técnica do Tricómio de Masson, vem confirmar as afirmações feitas por Carson [3], que defende que a coloração do Tricómio de Masson é mais eficaz quando o meio é ácido.

Optimização da Técnica do Tricómio de Masson



Fig. 2: Var. V. Glomérulo de Malpighi.

A não utilização do AFM ou do AFT (VAR V e VI) diminuiu bastante a qualidade final da técnica provocando a obtenção de scores finais bastante baixos. Consequentemente, é possível verificar que houve um aumento da intensidade de coloração na VAR I (Fig. 3) e na Var II (Fig. 4 e Fig. 5) que recorreram à utilização dos referidos ácidos. No entanto a VAR II (utilização do ácido fosfotúngstico) destacou-se pela

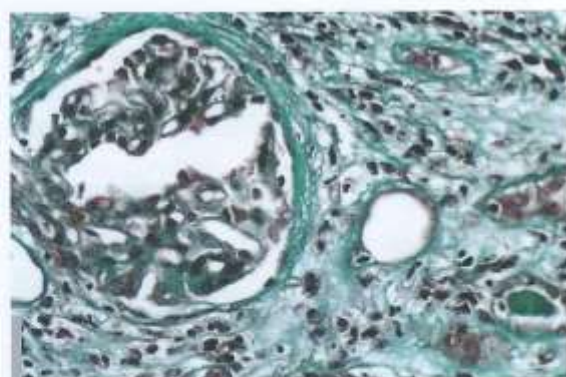


Fig. 3: VAR I. Glomérulo de Malpighi. 400x

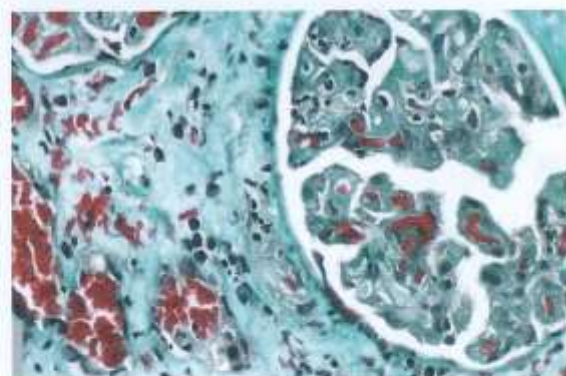


Fig. 4: VAR II. Glomérulo de Malpighi. 400x.

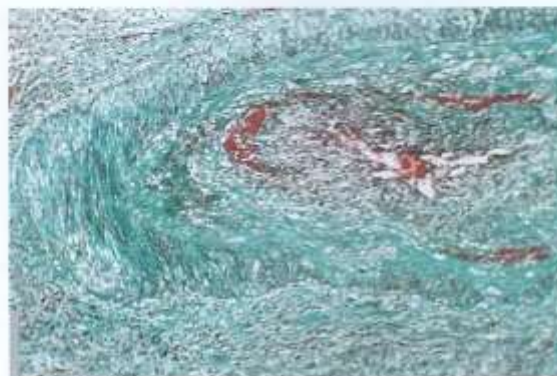


Fig. 5: Var. II. Glomérulo Malpighi.

positiva com o score final mais elevado. Estes factos permitem concluir que existe uma relação entre o tipo de ácido utilizado (AFM/AFT) na coloração de Tricrómio de Masson e a qualidade de visualização das estruturas tecidulares; e que a utilização de ácidos na diluição dos corantes paralelamente à utilização dos ácidos com papéis diferenciadores contribui para uma mais eficaz visualização das estruturas tecidulares.

A variante que utilizou AFT é a que permite uma melhor qualidade de coloração das estruturas em estudo (núcleos, músculo liso, eritrócitos, fibrina e colagénio I, III e IV). Parece existir algum fundamento químico para esta conclusão, pois apesar dos elementos que dão base aos referidos ácidos pertencerem ambos ao mesmo grupo da tabela periódica (VI A), a massa atómica do AFT é bastante maior (183.85) do que a do AFM (95.94), para além da configuração electrónica do AFT ser  $[(xe) 4f^{14} 5d^4 6s^2]$  o que mostra que é uma molécula mais estável do que o AFM  $[(kr) 4d^5 5s^1]$ . Assim, o AFT poderá exercer melhor a sua função de mordente e de diferenciador, visto a permeabilidade do tecido e o tamanho molecular do corante condicionarem a coloração do Tricrómio de Masson [1].

A utilização do ácido acético na diluição dos corantes parece também ser fundamental para uma boa visualização das estruturas tecidulares. Assim, os corantes têm vantagem em ser preparados com uma solução de baixo pH (1,5-3,0) tal como sugere Chang [4].

Parece também oportuno referir que a coloração nuclear não sofreu enfraquecimento ao longo das variações utilizadas. Desta forma a utilização da hematoxilina férrica de Weigert parece bastante adequada e resistente aos meios ácidos utilizados que são potencial-

mente diferenciadores. Devido ao facto deste estudo só ter sido feito em tecido proveniente de rim e num número limitado de amostras, não é possível extrapolar resultados para outras realidades laboratoriais. Contudo, achamos que deverá existir um método de coloração optimizado, e que cada laboratório deve estar integrado num sistema de controlo de qualidade. O aumento de qualidade conduz a um aumento de credibilidade e fiabilidade dos diagnósticos.

Este trabalho poderá constituir ponto de partida para estudos futuros que utilizem a técnica do Tricrómio de Masson analisando os custos implicados e os benefícios obtidos, uma vez que é importante aliar o melhor ao menos dispendioso. Poder-se-ão testar ainda outras variações como a utilização de um outro ácido (ácido silicotungstico ou ácido borotungstico).

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bancroft J, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4ª ed. New York: Churchill Livingstone; 2002.
2. Carola R, Harley J, Nobach C. *Human Anatomy & Physiology*. 2ª ed. London: McGraw-Hill; 1999.
3. Carson L. *Histotechnology - A Self - Instructional Text*. 4ª ed. Dallas, USA: ASCP Press; 1997.
4. Chang R. *Química*. 5ª ed. Lisboa: McGraw-Hill; 1994.
5. Feldman A, Dapson R. *The Chemistry of Fixation and Staining*, J. *Histotechnonology* 1980, 3:132..
6. Fortin M. *O Processo de Investigação: Da Concepção à Realização*. Lisboa: Lusociência; 1999.
7. Junqueira L, Carneiro J. *Histologia Básica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1995.
8. Mason G, O'Leary T. *Effects of Formaldehyde Fixation on Protein Secondary Structures; a Colorimetric and infrared spectroscopic Investigation*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1989, 39, p. 225-231.
9. Moral G. *Laboratório de Anatomia Patológica*. Madrid: McGraw-Hill; 1993.
10. Pearse A. *Histochemistry*. 3ª ed. Baltimore: Williams & Wilkins, Co; 1980.
11. Rosai G. *Ackerman's Surgical Pathology*. 8ª ed. New York: Mosby; 1996.
12. Sternberg M. *Histology for Pathology*. New York: Raven Press; 1992.

#### Agradecimentos

À Dr.ª Ana Paula Martins e Dr.ª Sância Ramos que participaram na avaliação das lâminas realizadas neste estudo.

Aos colegas que de um modo simples nos permitiram a realização deste estudo, substituindo-nos nas nossas ausências.