

CONCENTRAÇÕES DAS DROGAS EM TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

2. Estudo sobre Verhoeff para fibras elásticas ⁽¹⁾

REAGENTS CONCENTRATIONS IN HISTOLOGICAL TECHNIQUES

2. Study on Verhoeff

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS ⁽²⁾
ANTONIO JAMES BRANDI ⁽²⁾
NILZA BAPTISTA ⁽²⁾
ADRIANA MANGINELLI MASSIGNANI ⁽²⁾
MATHILDE TRIGO PIRES DE MESQUITA ⁽²⁾
REGINA CÉLIA MACHADO ⁽²⁾

SUMMARY

An excellent staining of the elastic fibers in a bluish black color is obtained when the solution of Verhoeff is used with lower concentrations of Hematoxilin. The muscular layer stains in green and the collagen fibers in pink as usually. The method was applied to sections from autopsy organs (kidney, lung, aorta).

INTRODUÇÃO

Provamos em trabalho anterior ¹ que a coloração de gorduras em tecidos, pelo Sudan IV e Hematoxilina de Ehrlich, pode ser obtida de forma bem nítida usando concentrações, destes corantes, mais baixas do que as geralmente recomendadas. Animados pelos resultados obtidos, fizemos este trabalho, agora sobre o método de Verhoeff.

Verificamos que as fibras elásticas se coram perfeitamente bem mesmo quando se baixa, de maneira considerável, a concentração do corante Hematoxilina que entra na preparação, pela técnica de Verhoeff ². Na solução de Picro-Ponceau, substituímos o Ponceau S, CI 27195, pelo Ponceau 3 R.

MATERIAL

Utilizamos material obtido de necrópsias efetuadas na Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, constituído por fragmentos de rim, aorta e pulmão.

Drogas empregadas

1) Fixadores

Qualquer fixador pode ser usado, mas nós demos preferência aos seguintes:

a) Formol a 10%. Mistura de Formalina (aldeído fórmico a 40%). Água destilada (10:90, V/V).

b) Zenker

Água destilada	1 000 ml
Cloreto mercúrico ou bicloreto de mercúrio	50 ml
Bicromato de potássio	25 ml
Sulfato de sódio (este sal atualmente está sendo omitido ³)	10 g

Recomendamos dissolver o cloreto de mercúrio em água destilada a quente e, posteriormente, juntar o bicromato de potássio e o sulfato de sódio. No momento de usar, juntar 5 ml de ácido acético glacial a 95 ml da solução de Zenker.

Usando este fixador (b), os blocos devem ser lavados após fixação por 24 horas em

(1) Trabalho realizado na Seção de Anatomia Patológica da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

(2) Do Instituto Adolfo Lutz.

água corrente, seguindo-se depois a desidratação normal. As lâminas, após desparafinização e desidratação, não necessitam ser passadas pelo iodo para se retirar o bicloreto de mercúrio, como usualmente, porque o corante de Verhoeff na sua fórmula contém uma solução aquosa de iodo.

2) Soluções

a) Solução Verhoeff

Dissolver a quente, usando fogareiro elétrico com resistência coberta ou estufa a 40°C, 0,7 g de Hematoxilina (preferivelmente em cristal, marca Harleco) em 66 ml de álcool etílico absoluto. Deixar esfriar até o dia seguinte e filtrar. Retirar 33 ml desta solução e juntar 12 ml de cloreto de ferro a 10% e 12 ml da solução de iodo de Verhoeff.

A solução fica assim diluída quatro vezes mais do que a solução de Verhoeff original.

Nota — A fim de que a solução de Verhoeff tenha uma duração mais longa, sugerimos guardá-la em congelador.

b) Solução Iodo de Verhoeff

Iodeto de potássio (KI) ...	4 g
Água destilada	100 ml
Iodo metálico	2 g

Todo o iodeto de potássio (4 g) é colocado em 3 ml de água destilada e a esta são adicionadas as 2g de iodo metálico, que se dissolvem totalmente. O volume é, então, completado para 100 ml, com água destilada.

c) Solução de cloreto de ferro a 10%

Cloreto de ferro (Fe Cl ₂) ..	10 g
Água destilada	100 ml

d) Solução de cloreto de ferro a 2%

Solução de cloreto de ferro a 10%	20 ml
Água destilada	100 ml

e) Solução Picro-Ponceau

Ponceau 3 R (Harleco)	10 g
Solução aquosa saturada de ácido pícrico	86 ml
Ácido acético glacial a 1% aquoso	4 ml

MÉTODOS

Técnica para cortes em parafina

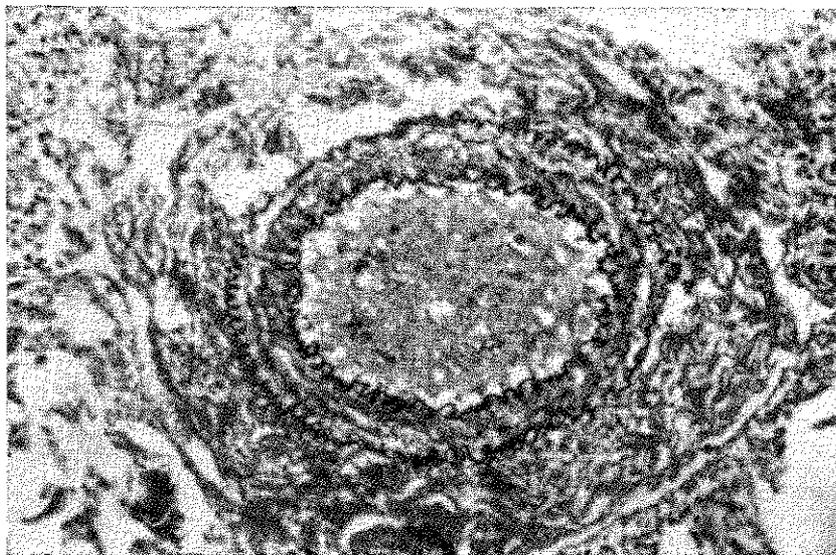
1. Cortes de 6 μ .
2. Desparafinizar (xilol, 5 min; xilol, 5 min).
3. Passar em álcool 100%; 95%; até 70%.
4. Corar na solução de Verhoeff (solução a) durante 15 minutos.
5. Lavar em água destilada.
6. Diferenciar na solução de cloreto de ferro (d), poucos minutos. Controlar a coloração no microscópio onde as fibras elásticas devem aparecer pretas e os núcleos, castanhos. Caso o tempo de diferenciação tenha sido muito prolongado, recolorem-se na solução Verhoeff (a) por algum tempo (5 a 10 minutos).
7. Colocar as lâminas em tiosulfato de sódio a 5%, aquoso, 1 minuto.
8. Lavar em água corrente de 5 a 10 minutos.
9. Sobrecorar na solução Picro-Ponceau (e) durante 1 minuto.
10. Diferenciar em duas porções de álcool a 95%, poucos segundos.
11. Desidratar em álcool absoluto.
12. Enxugar as lâminas em papel de filtro com o corte voltado para baixo.
13. Passar no xilol, outra vez no xilol e montar em bálsamo do Canadá.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As fibras elásticas do conjuntivo são evidenciadas por métodos que contêm o corante Orceína, como o de Unna-Orceína e outros; estes são de difícil execução e, por este motivo, preferimos estudar o método de Verhoeff pois, além de dar os mesmos resultados, é de mais fácil execução.

O corante de Verhoeff é usado para evidenciar fibras elásticas; neste método, entra como corante principal a Hematoxilina.

A solução de Hematoxilina (3 g de Hematoxilina em 66 ml de álcool absoluto), após resfriamento, apresentava grande depósito na filtração. O depósito foi secado na estufa e nova solução foi feita para verificar se poderíamos aproveitar o corante. Notamos,



Artéria de pequeno calibre, do pulmão, destacando-se as limitantes elásticas interna e externa. Verhoeff modificado. 160 X.

porém, que o corante seco e novamente diluído dava uma coloração manchada das fibras elásticas, perdendo a nitidez. Pensamos então em baixar a concentração da solução de Hematoxilina para 1 g/66 ml de álcool etílico absoluto, mantendo as outras drogas na mesma concentração. As lâminas coradas com essa concentração mais baixa de Hematoxilina apresentaram fibras elásticas bem evidenciadas em preto azulado escuro. Continuamos baixando a concentração de Hematoxilina para 0,7 g/66 ml de álcool etílico 100% e obtivemos os mesmos resultados que usando a solução de Hematoxilina na sua fórmula original.

Utilizando-se a concentração por nós determinada, obtêm-se as seguintes vantagens.

1. Evita-se o desperdício da Hematoxilina em cristal, marca Harleco, que é um corante difícil de se achar, pelo menos no nosso meio.

2. As fibras elásticas que se encontram em redor dos grandes e pequenos vasos se apresentam bem coradas em preto azulado, nítidas e isoladas, distinguindo-se bem a camada muscular em verde amarelado, localizada entre as fibras elásticas internas e externas, e a camada das fibras de colágeno, em rosa bastante intenso, conforme se observa na figura.

3. Outro fator importante na técnica de Verhoeff é que seu corante parecia ter, conforme HUMASON² e LILLIE⁴, duração de apenas duas a três semanas. Verificamos porém que, colocando o reativo no congelador, este se conserva bem pelo menos um ano e quatro meses, agindo perfeitamente bem, nada perdendo na sua intensidade; usando-se menor quantidade de corante para prepará-lo, não haverá desperdício.

CONCLUSÕES

Empregando-se a solução de Verhoeff preparada com uma solução de Hematoxilina cristal (marca Harleco) diluída a 0,7 g em 66 ml de álcool etílico absoluto, obtêm-se idênticos resultados aos apresentados pela solução clássica de Verhoeff usualmente indicada e utilizada.

RESUMO

Uma excelente coloração das fibras elásticas em preto azulado é obtida quando a solução de Verhoeff é usada com concentrações mais baixas de Hematoxilina — 0,7 g em 66 ml de álcool etílico absoluto — do que as usualmente empregadas.

A camada muscular cora-se como sempre em verde amarelado e as fibras de colágeno, em rosa.

O método foi aplicado a cortes de órgãos provindos de necrópsias (rim, pulmão, aorta).

Agradecimentos — Aos Dr. José Carlos Arminante, Dra. Laura Comette Taborda, Dr. Oscar de Souza Lopes, Dra. Yolanda Tavares e Sra. Flávia Echuya.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPOS, E. P.; BAPTISTA, N.; MASSIGNANI, A. M. & MESQUITA, M. T. P. — Concentrações das drogas em técnicas histológicas. 1. Estudo sobre Sudan IV. Rev. Inst. Adolfo Lutz 25/27:65-8, 1967/68.
2. HUMASON, G. L. — Animal tissue techniques. S. Francisco, W. H. Freeman, [c1962] p. 166.
3. LILLIE, R. D. — Histopatologic technic and practical histochemistry. New York, Mc Graw-Hill [c1965] p. 51.
4. LILLIE, R. D. — Histopatologic technic and practical histochemistry. 3. ed, New York, Mc Graw-Hill [c1965] p. 551.

Recebido para publicação em 11 de janeiro de 1968.