

UTILIZAÇÃO DO PICO-SIRIUS PARA CORAR O *PARACOCCIDIOIDES* *BRASILIENSIS*

Hipólito de Oliveira Almeida, Marilda da Costa
Brandão, Maria das Graças Reis de Moraes, Marlene Antonia
dos Reis e Suzana Aparecida Silveira

A solução do pico-sirius foi usada para corar o Paracoccidioides brasiliensis em tecidos humanos fixados em formol. À luz comum, o fungo mostra uma faixa periférica avermelhada e, à luz polarizada, apresenta um ou mais anéis birrefringentes esverdeados. A imersão prévia em solução de hidróxido de sódio a 1%, por alguns minutos, melhora a coloração, sendo o fungo visualizado com mais nitidez à luz polarizada. Por outro lado, a diferenciação dos cortes corados, com pico-sirius em hidróxido de sódio a 0,5%, elimina a birrefringência do colágeno mais rapidamente que do Paracoccidioides.

Palavras chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicose. Pico-sirius. Histotecnologia. Micoses.

A coloração pelo pico-sirius é empregada em histologia como específica para colágenos, aumentando a birrefringência deste material²³⁴⁶. Entretanto o *Cryptococcus neoformans*, quando tratado por esse corante, mostra anéis birrefringentes em seu envoltório¹. Como o *Paracoccidioides* é um fungo que tem algumas propriedades tintoriais semelhantes às do *Cryptococcus*, é provável que, quando corado com o pico-sirius, também se torne birrefringente. Tal possibilidade levou-nos a testar esta coloração em casos de Paracoccidioidomicose do nosso arquivo de necrópsias. No presente estudo, além da técnica clássica do pico-sirius, testamos algumas modificações visando simplificações e melhora da visualização do fungo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados fragmentos de linfonodos, pulmões, baço e fígado, fixados e conservados em formol comercial a 10%, por período que variou de 6 meses a 10 anos, provenientes de 5 casos de paracoccidioidomicose e de 2 casos-controles de tuberculose. O diagnóstico de paracoccidioidomicose teve por base a identificação do fungo em colorações pela hematoxilina-eosina, Grocott e PAS. Dos fragmentos, incluídos em parafina, foram obtidos cortes de 5 a 7 micrômetros que foram desparafinados, hidratados e colocados na solução corante (pico-sirius) por tempo que variou de 10, 20, 30, 40, 50 ou 60 minutos. Alguns cortes, antes da coloração, foram banhados em solução de hidróxido de sódio a 1 g% por 2, 5, 10, 15 ou 20 minutos, em seguida lavados em água destilada e imersos na

solução corante; outros, após a coloração foram imersos em solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,5 g% com leve agitação para diferenciação rápida (menos de um minuto) até perder a cor vermelha, seguida de banho em água de torneira; um quarto grupo, de preparados histológicos, foi tratado com hidróxido de sódio antes e após a coloração. Após estes tratamentos, os cortes eram processados rotineiramente para montar em Entelan e examinados ao microscópio comum e de luz polarizada. Alguns cortes foram apenas desparafinados e montados, enquanto outros foram banhados em hidróxido de sódio, montados e examinados. A solução corante constou de água destilada à qual se adiciona ácido picrico até à saturação ($\pm 1, 2g\%$) e depois o vermelho da Síria (Sirius Red) F3B, na concentração de 0,1 g%.

RESULTADOS

Os cortes corados pelo pico-sirius, sem outro tratamento adicional, quando analisados ao microscópio de luz comum, mostram áreas intensamente coradas em vermelho (colágeno) e áreas mais claras que podem ter tons claros de rosa, verde ou amarelo. Nestas áreas mais claras ou entre os feixes colágenos vermelhos, podemos observar as células fúngicas como estruturas arredondadas, ovais ou deformadas que se apresentam contornadas por delgada faixa vermelho-escura, externamente à qual pode ser vista outra faixa mais espessa que se apresenta num tom bastante claro de amarelo-esverdeado (Figura 1). O interior do fungo pode ser completamente claro ou apresentar material granuloso de pouca afinidade tintorial. À luz polarizada as células do *Paracoccidioides* mostram um anel birrefringente, mais espesso e com brilho de cor verde limão, que pode ser acompanhado de um, ou mais raramente, por dois

Trabalho realizado na Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Pça. Manoel Terra s/nº, 38100 Uberaba-MG.

Recebido para publicação em 8/6/87

anéis delgados e de menor brilho, também esverdeados. O conjunto apresenta-se interrompido em 4 pontos diametralmente opostos, sendo os anéis lisos e homogêneos (Figura 2). As fibras colágenas apresentam-

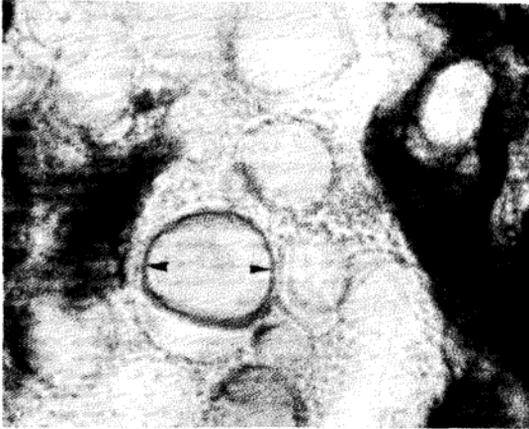


Fig. 1 - Corte de linfonodo humano, corado durante 30 minutos pelo picro-sirius após banho de 5 minutos em hidróxido de sódio a 1g%, examinado à luz comum (x2000), mostrando *Paracoccidioides brasiliensis* que apresentam faixa periférica corada em vermelho que na foto mostra-se mais escura (setas). De cada lado, as áreas mais escuras representam feixes colágenos.

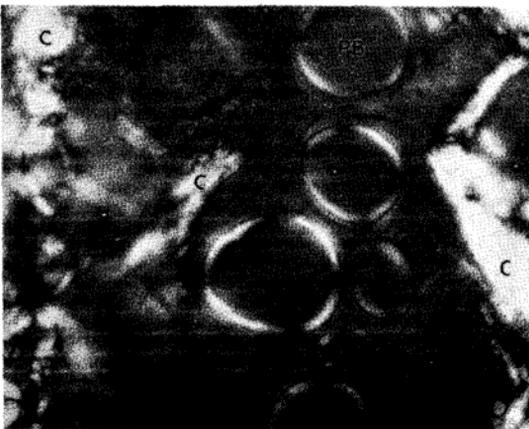


Fig. 2 - Mesmo campo da Fig. 1, visto à luz polarizada. As células do *Paracoccidioides brasiliensis* (PB) mostram um anel interno mais brilhante e mais espesso, externamente ao qual pode ser visto outro anel mais delgado e de brilho mais discreto. Os feixes colágenos (C) se apresentam intensamente brilhantes. x2000.

se também birrefringentes, com brilho intenso vermelho-amarelado ou mais discreto de cor verde. Estruturas semilunares prateadas podem representar células fúngicas fragmentadas ou colabadas; enquanto estruturas arredondadas apresentando anel periférico e conteúdo, às vezes lembrando cruz de malta, ambos

emitindo intensa luz prateada, embora raramente, podem ser vistas em locais onde, à luz comum, identificam-se células fúndicas aparentemente normais. Figuras irregulares e brilhantes que parecem representar partículas contaminantes e pigmento de formol, são facilmente distinguíveis dos grupos de anéis esverdeados que representam as células fúngicas. A comparação de um mesmo campo microscópico à luz comum e à luz polarizada mostra que, apesar de a grande maioria das células fúngicas formarem os anéis birrefringentes descritos, algumas não o fazem, ficando invisíveis à luz polarizada. Os aspectos descritos foram observados tanto nos preparados corados no picro-sirius durante 10 minutos como durante uma hora, parecendo atingir seu máximo entre 30 e 40 minutos de coloração. Quando os cortes são banhados em solução de hidróxido de sódio a 1g%, durante dois, até o máximo 20 minutos, antes da coloração pelo picro-sirius, a afinidade do fungo pelo corante e sua birrefringência aumentam sensivelmente, enquanto o colágeno parece não se alterar. Em geral o banho em hidróxido por cinco minutos, seguido de coloração por 30 a 40 minutos, dá bons resultados. Quando fizemos o processo inverso, isto é, quando após coloração pelo picro-sirius imergimos o preparado histológico em solução aquosa de hidróxido de sódio a 0,5%, verificamos sua rápida descoloração macroscopicamente e o exame, à luz polarizada, mostra que enquanto o tecido torna-se escuro conservando o colágeno fraca birrefringência espontânea, as células fúngicas conservam seus brilhantes anéis verdes praticamente inalterados ou com discreta redução do brilho (Figura 3). Em geral os melhores resultados foram obtidos quando as colorações por 30 minutos (ou mais) eram precedidas por banho em hidróxido a 1g% e seguidas de diferenciação por poucos segundos (Figura 3) no hidróxido a 0,5%. Uma mistura de álcool comum (96°GL) mais solução aquosa de hidróxido de sódio a 1g% na proporção de 4:1, produz resultados semelhantes aos da solução diferenciadora de hidróxido de sódio a 0,5g%. Nos preparados não corados, tratados ou não pela solução de hidróxido de sódio, as células fúngicas não são birrefringentes.

Os preparados obtidos dos casos de tuberculose que nos serviram de controle, tanto à luz comum como à luz polarizada, não mostravam nenhuma estrutura que pudesse ser confundida com o *Paracoccidioides*; as células gigantes e epitelióides coram-se muito discretamente pelo ácido pícrico, não sendo birrefringentes (Figura 4). As fibras colágenas são delicadas, tortuosas, irregulares e de brilho esverdeado, não formando figuras semelhantes ao fungo.

DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que o picro-sirius, além do colágeno, cora também o *Paracoccidioides*

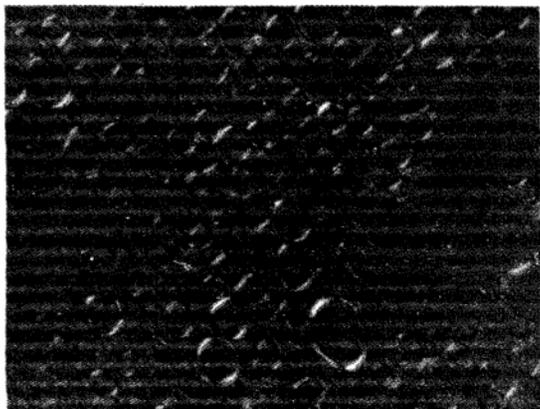


Fig. 3 - Aspecto à luz polarizada de preparado histológico de linfonodo corado durante 40 minutos com picro-sirius e posteriormente diferenciado em solução de NaOH a 0,5g%. As células do *Paracoccidioides* conservam birrefringência moderada enquanto os feixes colágenos não podem mais ser vistos. x500.

brasiliensis. As células do fungo, quando examinadas ao microscópio de luz comum, apresentam delicada faixa periférica corada em vermelho-escuro que, às vezes, está envolvida por outra faixa clara de aspecto hialino e o seu interior pode apresentar-se vazio ou conter material granuloso. Quando examinado à luz polarizada, em geral, apenas o envoltório mostra-se birrefringente sob a forma de um anel de brilho verde limão que pode ser acompanhado de mais um ou dois anéis externos, mais delgados e menos brilhantes que o primeiro. Os aspectos de birrefringência prateada, às vezes formando figuras em cruz de malta, podem representar artefatos ou um fenômeno cujo significado nos escapa. As faixas vistas com a luz comum e o anel ou anéis brilhantes vistos com a luz polarizada, devem representar componente ou componentes próprios da parede celular do *Paracoccidioides*. De fato, apesar da semelhança com o colágeno, particularmente o colágeno III que também emite brilho esverdeado, quando corado pelo picro-sirius e examinado à luz polarizada⁴, o tratamento com soluções de hidróxido de sódio mostra que o envoltório da célula fúngica e colágeno tem comportamentos divergentes. O tratamento dos cortes com hidróxido de sódio antes da coloração aumenta o brilho dos anéis do *Paracoccidioides* sem alterar de modo evidente o brilho do colágeno; por outro lado, quando os cortes corados pelo picro-sirius são diferenciados em solução de hidróxido de sódio ou de álcool-hidróxido, ocorre rápida descoloração dos colágenos que conservam apenas discreta birrefringência espontânea, enquanto as células do *Paracoccidioides* conservam seus anéis de brilho esverdeado. Como o fungo não apresenta birrefringência espontânea ou induzida pelo hidróxido de sódio, pode-se admitir que a mesma seja devida à

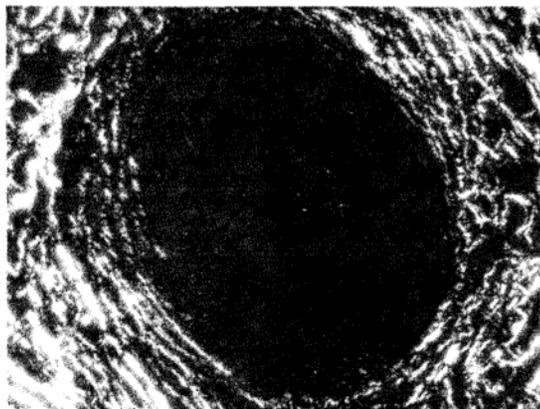


Fig. 4 - Granuloma em caso de tuberculose, corado pelo picro-sirius, visto à luz polarizada - a região das células epitelióides é praticamente sem birrefringência, sendo porém, envolvida por feixes colágenos birrefringentes, sem nenhuma estrutura que se assemelhe aos anéis brilhantes do *Paracoccidioides* x320.

fixação do corante às estruturas de sua parede. O *Paracoccidioides brasiliensis* é um fungo dimórfico com fase leveduriforme nos tecidos^{5 7 8} cuja parede tem espessura de 150 a 300 nm, apresentando, ao microscópio eletrônico, uma camada interna de baixa eletrodensidade formada por filamentos de quitina e outra externa, mais delgada e mais eletrodensa que a primeira, formada por alfa-glucan^{7 8}. É possível que os componentes polissacarídeos ou proteínas associadas sejam responsáveis pela afinidade da parede celular do fungo para o vermelho da Siria. Como na paracoccidioidomicose formam-se granulomas e áreas de conjuntivação com alguma semelhança aos da tuberculose, a utilização desta doença como controle nos permitiu verificar se estruturas do granuloma, principalmente o colágeno III que, a julgar pelas descrições existentes (brilho esverdeado, fibras delgadas), poderiam, eventualmente, formar figuras anulares passíveis de serem confundidas com o *Paracoccidioides*. Entretanto, nossas observações afastam esta possibilidade, pois as delicadas fibras são tortuosas e irregulares, facilmente distinguíveis dos anéis formados pela parede celular do fungo.

Das variações técnicas descritas, o tratamento prévio com hidróxido de sódio a 1g% seguido de permanência na solução corante por 30 a 40 minutos é a que fornece melhores resultados para identificação, à luz polarizada, do fungo.

SUMMARY

Picrosirius stain was used for *Paracoccidioides brasiliensis* in formalin-fixed human tissue. By common light microscopy the fungus shows a red peripheral band and on polarization micros-

copy, one or more birefringent green rings. Previous immersion in 1% sodium hydroxide solution enhances the staining and the birefringency of parasitic cells. The differentiation of the stained sections with 0,5% sodium hydroxide eliminates the birefringency of the collagen more rapidly than that of the *paracoccidioides*.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidiomycosis. Picrosirius. Histotechnology. Mycosis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida HO, Teixeira VPA, Gobbi H. Utilização do Bouin e do Picro-sírius para identificação do *Cryptococcus neoformans* nos tecidos humanos. *Revista Goiana de Medicina* (no prelo).
2. Constantine VS, Mowry RW. The selective staining of human dermal collagen. II - The use of picrosirius red F3BA with polarization microscopy. *Journal of Investigative Dermatology* 50:419-424, 1968.
3. Junqueira LCU, Bignolas G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy: a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal* 11:447-455, 1979.
4. Junqueira LCU, Cossermelli WS, Brentani RR. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum* 41:267-274, 1978.
5. Minguetti G, Hofmeister RM, Favoro M, Freitas OT. Ultraestrutura do *Paracoccidioides brasiliensis* II - Na fase leveduriforme. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 25:161-167, 1983.
6. Montes GS, Junqueira LCU. Biology of collagen. *Revue Canadienne de Biologie* 41:143-156, 1982.
7. San-Blas G, San-Blas F. *Paracoccidioides brasiliensis*: cell wall structure and virulence. *Mycopathologia* 62:77-86, 1977.
8. San-Blas F, San-Blas G. *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Szanislo PL (ed) *Fungal dimorphism*, Plenum, New York p. 93-120, 1985.