

VII JORNADAS DE DIFUSIÓN DE LA INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN – FCV-UNL

RESUMEN EXTENDIDO

APLICACIÓN DE COLORACIONES ESPECIALES EN EL DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO: TINCIÓN TRICRÓMICA DE MASSON

Cruz NRN¹, Sacco SC^{2,3}, Belotti EM^{2,3}, Chiaraviglio J², Gauchat LM³,
Bandeo J², Salvetti N², Ortega HH².

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus Jaboticabal, São Paulo, Brasil

² Centro de Medicina Comparada (CMC), Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), Universidad Nacional del Litoral (UNL) / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

³ Cátedra de Patología Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias del Litoral, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Esperanza, Santa Fe, Argentina.

* Correspondencia: Sacco SC. E-mail: ssacco@fcv.unl.edu.ar

Editado por: R. Sobrero, V. Matiller, C. Baravalle

APPLICATION OF SPECIAL COLORATIONS IN HISTOPATHOLOGICAL DIAGNOSIS: MASSON'S TRICHROMIC STAIN

SUMMARY.

Masson's trichrome (MT) is a three-color staining protocol used in histology. MT allows to show and quantify changes such as tissue repair (healing) and collagen deposition. Also, it can be used to quantify blood vessels, in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. The objective of this work is to describe the MT staining technique and to exemplify some applications of this technique in routine veterinary histopathological diagnosis. Archived histologic sections were selected from the records of the histopathology laboratory. Tissues were selected in base on their structures and lesions that could be evaluated with MT: a rabbit lung with a chronic suppurative bronchopneumonia; a bovine liver with lesions of Echinium plantagineum poisoning; and a bovine eyelid with a squamous cell carcinoma. The TM was able to show fibroplasia in the pulmonary interstitium and confirm the presence of a chronic respiratory process, and clearly revealed an abundant fibrovascular tumor stroma, with profuse connective tissue and neovascularization between the tumor cells in deep dermis. In the liver, extensive and marked fibroplasia was confirmed. MT represents a complementary coloration to routine hematoxylin and eosin stain (H&E) and provides accurate information from several pathological processes, mainly those related to fibrovascular proliferation and scarring.

Palabras clave: Histopatología Veterinaria, Tricrómico Masson

Keywords: Veterinary Histopathology, Masson's Trichrome.

La técnica de tinción Tricrómica de Masson (TM) fue desarrollada en 1929 como una tinción especial para diferenciar simultáneamente numerosas estructuras tisulares mediante tres coloraciones: hematoxilina férrica de Wiegert, para teñir los núcleos en violeta, marrón o negro; fucsina ácida-escarlata de Biebrich para colorear los citoplasmas, la fibrina, y fibras elásticas en rosa, y en rojo la queratina, fibras musculares y la hemoglobina de los eritrocitos; y azul de anilina o fast

green que colorean de azul o verde, respectivamente, el mucus y las fibras colágenas (Caputo et al., 2012). Aunque la hematoxilina-eosina (HE) es la coloración de rutina diagnóstica para la identificación y descripción de procesos patológicos en todos los laboratorios de histopatología del mundo; la TM también se utiliza como coloración de rutina en evaluación de algunos órganos como el hígado y el riñón. La TM permite evidenciar y cuantificar cambios específicos como la reparación

tisular (cicatrización) y depósito de colágeno (Suvyk y Effendy, 2012). Además, puede utilizarse para cuantificar vasos sanguíneos en muestras de mucosa oral, en displasia epitelial y carcinoma de células escamosas (Cáceres et al., 2017). También facilita la diferenciación entre el colágeno y el músculo liso en neoplasias, a nivel renal en la evaluación de lesiones glomerulares, en lesiones cardíacas de neovascularización y fibrosis, en distrofias musculares, así como en injurias tóxicas crónicas hepáticas y fibrosis pulmonar. El objetivo del presente trabajo es describir la técnica de coloración TM optimizada en el Centro de Medicina Comparada (CMC) y ejemplificar algunas de las aplicaciones de esta técnica en la rutina de diagnóstico histopatológico veterinario.

Se seleccionaron casos de archivo en los cuales se evidenciaban estructuras y lesiones factibles de ser evaluadas con esta técnica: un pulmón de un conejo neozelandés con una lesión de bronconeumonía supurativa crónica; un hígado de un bovino Holando argentino (HA) con lesiones de intoxicación por flor morada (*Echium plantagineum*); y un párpado de bovino HA con un carcinoma de células escamosas. Las muestras de bovinos fueron obtenidas a campo para ser utilizadas como controles y generar un banco de casos con lesiones típicas de patologías en esa especie. Los tejidos fueron procesados mediante la técnica de inclusión en parafina y se realizaron cortes seriados de 4 micras de espesor con un microtomo rotativo Leica (RM 2245). Posteriormente, se realizó la técnica de Masson (Suvyk y Effendy, 2012), con modificaciones como se describe a continuación: los cortes fueron desparafinados para lo cual se colocaron en estufa 15 min a 60°C, en xilol 15 min y 10 min, luego fueron hidratados en alcohol 100° 2 min y 2 min y luego en alcohol 96° 2 min y 2 min, alcohol 70° 2 min y fueron lavados con agua destilada 5 min, posteriormente los cortes fueron sumergidos en solución de Bouin overnight, se lavó 5 min en agua corriente, 5 min en agua destilada y se coloreó con hematoxilina férrica de Weigert 10 min, Fucsina Ácida-escarlata de Biebrich 20 min, la diferenciación se hizo con solución de ácido fosfotúngstico con ácido fosfomolibdico por 20 min, tinción con azul de anilina 15 min, y la decoloración con ácido acético al 1% por 2 min. Posteriormente, se realizó la deshidratación en series crecientes de alcohol, aclarados en xilol y finalmente los cortes fueron montados con bálsamo de Canadá. Además, los mismos cortes se colorearon con la coloración de rutina de Hematoxilina-Eosina (HE).

El diagnóstico morfológico de la lesión pulmonar evaluada mediante HE fue una bronconeumonía necrotizante y supurativa difusa, subaguda a crónica, activa, severa. El tejido mostró zonas con marcada proliferación de células fusiformes de núcleos grandes y aguzados distribuidos en una matriz compacta de fibras eosinófilas. Mediante la TM se confirmó la proliferación de tejido conjuntivo intersticial, los núcleos de los fibroblastos se colorearon violeta oscuro y las fibras de colágeno se tiñeron en color celeste o azul claro. Además, pudo hacerse evidente la presencia de abundante mucus coloreado celeste ocupando los

lúmenes bronquiolares y alveolares, y entremezclado con el exudado leucocitario. Mediante la histopatología con HE del hígado se arribó al diagnóstico morfológico de degeneración, necrosis y pérdida hepatocelular, difusa, severa, con fibrosis severa en puente portal y marcada medio zonal y centrolobulillar, con severa hiperplasia de conductos biliares y megalocitosis. La TM confirmó la extensa y marcada fibroplasia mediante la coloración azul claro y en otras zonas azul intenso de los puentes de fibrosis formados entre los espacios portales y separando los hepatocitos coloreados de color rosa a rojizo. La HE permitió el diagnóstico de un carcinoma de células escamosas indiferenciado del tercer párpado. La TM mostró un marcado estroma fibrovascular en la masa neoplásica, evidenciándose numerosos vasos sanguíneos en una fuerte matriz de colágeno de color azul claro entre las hileras o nidos de células tumorales de color gris azulado.

Mediante la TM se pudo evidenciar la fibroplasia en el intersticio pulmonar y confirmar la presencia de un proceso respiratorio crónico. Por otra parte, el abundante exudado mucoso que no se había evidenciado claramente en la HE, fue fácilmente reconocible mediante la TM. La TM permite la marcación de todos los tipos de colágeno y la intensidad azul está relacionada a la maduración del colágeno, siendo las fibras más inmaduras de color claro y las maduras azul más intenso. Por lo cual, en la TM de hígado es posible que las zonas de color azul más claro sean sugerentes de la presencia de colágeno inmaduro tipo III y las más intensas correspondan a colágeno tipo I, maduro. Sin embargo, para poder clasificar el colágeno en sus diversos tipos se requieren coloraciones específicas como Picrosirius red o inmunohistoquímica. La utilización de la TM permitió evidenciar claramente un abundante estroma fibrovascular tumoral, con profuso tejido conjuntivo y neoformación de vasos sanguíneos entre las células tumorales en la dermis profunda. El estroma es un componente fundamental para el crecimiento de las células neoplásicas y su evaluación es esencial como criterio de malignidad. La TM representa una coloración complementaria a la HE de rutina, su precio no es muy elevado, es relativamente sencilla y rápida; además, aporta información certera en relación a diversos procesos patológicos, fundamentalmente aquellos relacionados a proliferación fibrovascular y cicatrización. Por ello, la TM debería contemplarse como tinción complementaria para el diagnóstico en todo laboratorio veterinario.

Bibliografía

Cáceres F, Herrera, G, Fernández A, Fernández J, Martínez R, Carvajal D, Haidar ZS. 2017. Utilidad de tinción de tricómico de masson en la cuantificación de densidad media vascular en mucosa oral normal, displasia epitelial y carcinoma oral de células escamosas. *Int. J. Morphol.*, 35,4, 1576-1581.

Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. 2012. Técnicas histológicas. En: Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde, v. 2. Rio de Janeiro: FIOCRUZ (Ed). cap. 3, 157 – 159.

Suvik A, Effendy AWM. 2012. The use of modified Masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian Journal of Veterinary Reserach*, 3, 1:39-4
