



Orientação para práticas de Laboratório

Sérgio Oliveira Silveira
Laboratório de Histologia e
Embriologia UFSM

Sumário

- Introdução	01
- Tecidos Epitelial	01
- Tecido Conjuntivo	02
- Tecido Ósseo	06
- Tecido Muscular	09
- Tecido Nervoso	13
- Técnica Básica de Histologia	17
- Obtenção das Peças	17
- Fixação	18
- Principais Fixadores	20
- Principais Soluções Fixadoras	22
- Desidratação	24
- Diafanização ou Clarificação	25
- Impregnação/ e Inclusão	25
- Microtomia	25
- Coloração	29
- Colorações Especiais	35
- Descalcificação	37
- Descalcificadores	40
- Introdução a Biologia Celular	43
- Introdução a Imunohistoquímica Básica.....	48

INTRODUÇÃO

A técnica histológica constitui o conjunto de processos a que se submetem os tecidos, neste caso de origem animal, a fim de que possam ser observados de maneira significativa e adequada permitindo o diagnóstico histológico ou patológico.

O QUE É HISTOLOGIA?

É a parte da Biologia que estuda os tecidos (do grego, hydton, tecido + logos, estudo).

MAS O QUE É TECIDO?

“Tecido é uma especialização morfológica, físico-química e fisiológica de células”(GRASSE).

“Tecido é um conjunto de células da mesma natureza, diferenciadas em determinado sentido para poderem realizar a sua função própria” (SCHUMACHER).

“Tecido é um grupo de células que apresentam a mesma função própria” (MENEGOTTO). Todos estão corretos. Os tecidos do corpo dos animais vertebrados desempenham variadas funções que por sua vez são formados por células especializadas. No corpo dos animais pluricelulares exceto espongiários, e constituído por células agrupadas e organizadas, formando os tecidos. Precisa-se de requisito para termos um tecido que seja composto de um grupo de células, que deverá apresentar a mesma função. Os tecidos fundamentais nos animais são estes: Epitelial, Muscular, Nervoso, Sangüíneo e Conjuntivo. Nos invertebrados estes tipos de tecidos são basicamente os mesmos, porém com organizações mais simples. A maioria dos tecidos além de serem compostos de células, apresentam entre elas substâncias intercelulares (intersticiais). Esses tecidos não existem isoladamente mas associam-se em proporções variáveis, para formar os diferentes órgãos e sistemas do organismo animal.

Tecido Epitelial

TM Células geralmente poliédricas, justapostas, entre as quais encontra-se pouca substância extracelular, têm vida limitada e se renovam constantemente.

TM Possuem adesão mútua, podem apresentar estruturas como vilosidades e cílios.

™ Pode ser formado por células especializadas na produção e secreção (tecido epitelial glandular)

™ Pode ser especializado na captação de estímulos provenientes do ambiente (neuroepitélios)

™ Revestem a superfície externa e as cavidades do corpo (tecido epitelial de revestimento) Esses epitélios dividem o organismo em compartimentos funcionais e têm papel importante na absorção dos nutrientes - revestimento da superfície interna do intestino.

™ Os epitélios de revestimento são divididos de acordo com critérios morfológicos, tendo em vista o número de camadas que o constitui e a forma das células na camada mais superficial:

-*Epitélio Simples Pavimentoso* - revestimento dos vasos (endotélio), da cavidade peritoneal, pericárdia e pleural (mesotélio). Função: movimentação das vísceras (mesotélio) e transporte ativo por pinocitose (endotélio).

-*Epitélio Simples Cúbico* - revestimento do ovário, intestino. Função: revestimento, proteção, lubrificação e absorção.

-*Epitélio Estratificado Pavimentoso* - revestimento da pele, boca e esôfago. Função: proteção e dificulta a perda de água.

-*Epitélio Estratificado de Transição* - revestimento interno da bexiga e parte das vias urinárias. Função: proteção.

-*Epitélio Estratificado Prismático* - conjuntiva do olho, serve para proteção.

-*Epitélio Pseudo Estratificado* - revestimentos da traquéia e brônquios. Função: proteção e transporte de partículas estranhas para o exterior.

Tecido Conjuntivo

™ Diversos tipos de células, separadas por abundante material intercelular sintetizado por elas e constituído por fibras, uma substância fundamental amorfa e pelo plasma intersticial.

™ As fibras do conjuntivo são de três tipos principais: colágenas, reticulares e elásticas.

™ As fibras colágenas são as mais frequentes e constituídas por uma glicoproteína denominada colágeno (proteína mais abundante do corpo humano), que pode ser de vários tipos. São encontrados formando tendões, ligamentos, cápsulas dos órgãos, derme, ossos, dentina, entre outros.

™ As fibras reticulares são extremamente delicadas e formam o arcabouço dos órgãos hemocitopoiéticos (baço, linfonodos, medula óssea, etc.), formam redes em torno das células musculares e das células de muitos órgãos epiteliais.

™ As fibras elásticas formam tipo uma malha irregular e têm como componente principal a elastina (proteína estrutural muito resistente).

Células do Conjuntivo:

1- *Fibroblasto* - célula mais comum e principal responsável pela formação das fibras e do material intercelular amorfo. É uma célula dotada de motilidade, porém é muito lenta. Alguns autores a dividem em fibroblastos quando são ativas (sintetizam fibras) e fibrócitos quando são inativas.

2- *Macrófago* - célula com grande capacidade de fagocitar e morfologia bastante variável conforme a sua localização e estado funcional. Apresentam movimentos amebóides ou podem estar fixos. Atuam como elementos de defesa, que penetram no organismo. Quando estimuladas (presença de substância estranha) sofrem modificações morfológicas e metabólicas, sendo denominados de macrófagos ativados e passam a ter maior capacidade fagocitária, produção de lisossomos aumentada e secretam diversas substâncias que participam do processo defensivo atraindo leucócitos e estimulando a atividade de outras células. Os macrófagos são originados dos monócitos (células do sangue que atravessam a parede dos capilares, penetram no tecido conjuntivo, onde adquirem o aspecto morfológico do macrófago. Portanto, o monócito e o macrófago são a mesma célula em diferentes fases de maturação.

3- *Mastócitos* - célula globosa, com núcleo esférico e central. Tem a função de produzir e armazenar mediadores químicos do processo inflamatório, tais como a heparina e histamina. (aumenta a permeabilidade dos vasos sanguíneos).

4- *Plasmócitos* – normalmente são encontrados em pouca quantidade no tecido conjuntivo. Tem seu número aumentado em regiões sujeitas a penetração de bactérias e onde há processo inflamatório crônico. São células de formato ovóide com grande

quantidade de R.E. e Aparelho de Golgi. Tem como função sintetizar e secretar anticorpos (proteínas específicas denominadas imunoglobinas).

5- Célula Adiposa – célula especializada no armazenamento de gordura. Será descrito posteriormente.

6- Leucócitos – São constituintes normais do tecido conjuntivo, porém são oriundos do sangue. Os leucócitos mais freqüentes no tecido conjuntivo são os neutrófilos, os inófilos e os linfócitos. Serão detalhados posteriormente.

Substância Fundamental Amorfa

™ Substância incolor e transparente que preenche o espaço entre as células e as fibras. É constituída de proteínas (proteoglicanas, glicoproteínas adesivas).

™ Encontrada em abundância em recém-nascidos.

Variedades do Tecido Conjuntivo

Há diversas variações do tecido conjuntivo, formado pelos componentes básicos (fibras, células e substância amorfa) e que refletem o componente predominante, ou a organização estrutural do tecido. Tem como função a sustentação, preenchimento, armazenamento, transporte, defesa e reparação.

Tecido Conjuntivo	Tecido Conjuntivo Propriamente Dito	Frouxo
		Denso
	Tecido Conjuntivo de Propriedades Específicas	Tecido Adiposo
		Tecido Elástico
		Tecido Reticular
		Tecido Mucoso
	Tecido Cartilaginoso	
	Tecido Ósseo	

Tecido Conjuntivo Frouxo – mais comum, preenche espaços entre as fibras e feixes musculares serve de apoio para o tecido epitelial e forma camada em torno dos vasos sanguíneos e linfáticos. É um tecido delicado, flexível e pouco resistente às trações.

Tecido Conjuntivo Denso – tecido menos flexível e mais resistente, encontrado formando tendões.

Tecido Conjuntivo Elástico – pouco comum e é encontrado nos ligamentos da coluna vertebral.

Tecido reticular – muito delicado, forma rede para sustentar células especializadas. Encontrado na medula e órgãos linfáticos.

Tecido Mucoso – tecido que constitui o cordão umbilical, é formado com grande predominância de substância fundamental amorfa.

Tecido Adiposo – O tecido adiposo é o maior depósito de energia (sob a forma de triglicerídeos) do corpo. Além da reserva energética, tem função de modelar a superfície, forma coxins absorventes de choques, principalmente na planta dos pés e das mãos, contribui para o isolamento térmico e preencher os espaços. As células do tecido adiposo se originam no embrião e não se dividem após o nascimento, o “crescimento” do tecido se deve ao acúmulo de lipídios nestas células.

Tecido cartilaginoso – É uma forma especializada de tecido conjuntivo de consistência rígida. Desempenha a função de suporte dos tecidos moles, revestimento de superfícies celulares onde absorve choques, facilita o deslizamento e é essencial para a formação e crescimento dos ossos longos. O tecido cartilaginoso não possui vasos sanguíneos, sendo nutrido pelos capilares do conjuntivo que o envolve (pericôndrio). É desprovido também de vasos linfáticos e de terminações nervosas. Suas propriedades dependem da estrutura da matriz intercelular, que é constituída por fibras colágenas e elásticas em associação com macromoléculas de proteoglicanas (proteínas + glicosaminoglicanas). A firmeza da cartilagem se deve às ligações entre fibras e as proteoglicanas.

Este tecido é formado de três tipos de cartilagem, que são:

1) *Cartilagem Hialina* - É o tipo mais freqüente encontrado no corpo humano. Sua matriz possui delicadas fibrilas constituídas principalmente por colágeno tipo II. Forma o primeiro esqueleto do embrião, que posteriormente é substituído pelo esqueleto ósseo. Entre a parte afinada (diáfase) e a extremidade dilatada (epífise) do osso longo em crescimento, observa-se o disco epifisário, responsável pelo crescimento do osso em extensão, que é constituído de cartilagem hialina. É encontrada também na parede das

fossas nasais, traquéia e brônquios, na extremidade ventral das costelas e recobrimo as superfícies das articulações.

Todas as peças de cartilagem hialina, exceto a cartilagem articular, são envolvidas pelo pericôndrio, que além de ser fonte de novos condrócitos (denominação das células de cartilagem) é responsável pela nutrição, oxigenação e pela eliminação dos refugos metabólicos de cartilagem, pois neles estão localizados os vasos sangüíneos e linfáticos. Devido, provavelmente, à sua irrigação limitada, a cartilagem é muito sujeita à degeneração e quando sofre lesão regenera-se com dificuldades e, freqüentemente, de modo incompleto, salvo em crianças de pouca idade.

2) *Cartilagem Elástica* - É encontrada no sistema auditivo interno e externo, na epiglote e na laringe. Basicamente, é semelhante à cartilagem hialina, porém inclui, além das fibrilas de colágeno, abundante rede de fibras elásticas finas. É menos sujeitas a degenerações que a hialina.

3) *Cartilagem Fibrosa* - É encontrada nos discos intervertebrais da coluna, nos pontos em que alguns tendões e ligamentos se inserem nos ossos e na sínfise pubiana. É uma cartilagem resistente as tenções e caracteriza-se pela presença de feixes de fibras de colágeno tipo I.

Tecido Ósseo

É um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Constituinte principal do esqueleto, serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos na caixa craniana e torácica. Aloja e protege a medula óssea, formadora das células do sangue, proporciona apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas contrações em movimentos úteis. Além destas funções, os ossos funcionam como depósito de cálcio, fosfato e outros íons, armazenando-os ou liberando-os de maneira controlada.

É um tipo especializado de tecido conjuntivo formado por três tipos de células, que são:

1 - *Osteoblastos*: Geralmente estão situadas na periferia do tecido ósseo já formado. Tem como função secretar a parte orgânica da matriz (fibras e proteínas).

2 - *Osteócitos*: Situados em lacunas no interior da matriz óssea (material intercelular calcificado). São osteoblastos modificados.

3 - *Osteoclastos*: São células de grande porte, moveis que participam da reabsorção do tecido ósseo, principalmente no caso de fraturas e remodelações em virtude do crescimento.

O tecido ósseo é revestido internamente e externamente por membranas de tecido conjuntivo, denominadas respectivamente de endóstio e perióstio. Estas membranas possuem células osteogênicas (células que se diferenciam nos tipos específicos do tecido ósseo). O perióstio tem importante papel no crescimento em espessura dos ossos (formam os osteoblastos) e na reparação das fraturas.

A parte inorgânica neste tecido corresponde a cerca de 50% do peso da matriz óssea, dando a característica mineralizada da matriz. Esta mineralização ocorre em virtude da deposição de íons, principalmente de fosfato e cálcio. Há também, em menores quantidades, bicarbonatos, magnésio, potássio, sódio e citrato.

Macroscopicamente, os ossos são formados por duas partes: uma parte sem cavidades visíveis, denominado osso compacto, e outra parte com muitas cavidades intercomunicantes denominado osso esponjoso. Histologicamente estas partes são iguais. Geralmente, em ossos longos, as extremidades (epífises) são formadas por osso esponjoso e a parte cilíndrica (diáfise) é quase que totalmente compacta. Em ossos curtos e em ossos chatos esta distribuição varia. As cavidades do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos são ocupados pela medula óssea.

Histologicamente existem dois tipos de tecido ósseo:

O primário ou imaturo - que possui as mesmas células e as mesmos constituintes da matriz que o secundário porém as fibras colágenas se dispõem irregularmente, sem orientação definida e contém uma menor quantidade de minerais. Apresenta também maior porcentagem de osteócitos. Este é o primeiro tecido a ser formado, sendo gradativamente substituído pelo secundário. No adulto é muito pouco freqüente, persistindo apenas próximo a suturas dos ossos cranianos, nos alvéolos dentários e em alguns pontos de inserção de tendões.

O secundário ou lamelar - apresentam as fibras colágenas organizadas em lamelas.

O tecido ósseo é formado ou por um processo denominado de ossificação intramembranosa ou pelo processo de ossificação endocondral. A ossificação intramembranosa é assim chamada por surgir a partir de membranas de natureza conjuntiva. O processo ocorre pela diferenciação das células destas membranas em osteoblastos, que irão secretar a parte orgânica da matriz, que posteriormente sofre mineralização. É o processo formador dos ossos da cabeça e dos maxilares. A palpação do crânio dos recém nascidos revela áreas moles (as fontanelas) onde as membranas conjuntivas ainda não estão ossificadas. Contribui também para o crescimento dos ossos curtos e para o crescimento em espessura dos ossos longos. A ossificação endocondral ocorre na formação da maioria dos ossos, principalmente os longos. Tem início sobre uma peça de cartilagem hialina, de forma parecida à do osso que se vai formar, porém de tamanho menor. Este tipo de ossificação ocorre basicamente em duas etapas; primeiro a cartilagem sofre modificações, havendo redução da matriz cartilaginosa e sua mineralização e a morte dos condrócitos; segundo as cavidades previamente ocupadas pelos condrócitos são invadidas por capilares sangüíneos e células osteogênicas vinda do conjuntivo adjacente. Essas células diferenciam-se em osteoblastos, que depositarão matriz óssea sobre os pontos de cartilagem calcificada. Desse modo, aparece o tecido ósseo onde antes havia tecido cartilaginoso sem que ocorra a transformação deste tecido naquele.

O crescimento dos ossos consiste na formação de tecido ósseo novo e reabsorção parcial do tecido já formado; deste modo o osso consegue manter sua forma enquanto cresce.

Os ossos chatos (da caixa craniana) crescem por formação de tecido ósseo pelo perióstio situado entre as suturas e na face externa do osso, enquanto que na face interna ocorre a reabsorção. Desta forma a caixa craniana responde ao crescimento do encéfalo.

Nos ossos longos este processo é um pouco mais complexo. As epífises aumentam de tamanho por crescimento radial da cartilagem, acompanhado da ossificação endocondral. Na diáfise, o cilindro cresce em comprimento principalmente pela atividade osteogênica dos discos epifisários e, em espessura, pela adição de tecido ósseo pelo perióstio na superfície externa, com reabsorção na superfície interna. É dessa maneira que o canal medular aumenta seu diâmetro.

O disco epifisário sofre o processo de ossificação aproximadamente aos 20 anos de idade, quando determina a parada do crescimento longitudinal dos ossos.

Tecido Muscular

Ô É responsável pelos movimentos corporais.

Ô Suas células são alongadas caracterizadas pela presença de grande quantidade de filamentos citoplasmáticos responsáveis pela contração.

De acordo com suas características morfológicas e funcionais, podem-se distinguir nos mamíferos três tipos de tecido muscular.

1) Tecido muscular liso - é formado por aglomerados de células fusiformes que não possuem estrias transversais. O processo de contração é lento e não está sujeito ao controle voluntário.

2) Tecido estriado esquelético - é formado por feixes de células cilíndricas muito longas e multinucleadas, que apresentam estriações transversais. Têm contração rápida, vigorosa e sujeitas ao controle voluntário.

3) Tecido estriado cardíaco - também apresenta estrias transversais, é formado por células alongadas e ramificadas, que se unem umas as outras por intermédio dos discos intercalares. Apresentam contrações involuntárias.

Tecido Muscular Esquelético

As células musculares são tão diferenciadas e têm características tão peculiares que seus componentes recebem nomes especiais. Sarcolema = membrana plasmática; Sarcoplasma = citoplasma; Retículo sarcoplasmático = retículo endoplasmático; e Sarcossomas = mitocôndrias.

As variações no diâmetro das fibras musculares esqueléticas dependem de vários fatores como o músculo considerado, a idade, o sexo, estado de nutrição e treinamento físico. O aumento da musculatura em função de exercício físico não é devido a multiplicação das células (divisão mitótica), que somente ocorre no tecido muscular liso. Este aumento deve-se à formação de novas miofibrilas e um aumento pronunciado no diâmetro das fibras musculares.

No músculo, as células musculares formam as fibras musculares que se agrupam formando feixes musculares, estes por sua vez agrupam-se para formar o músculo. Todas

estas estruturas são envolvidas por uma membrana externa de tecido conjuntivo. O epimísio envolve o músculo, o perimísio envolve o feixe e o endomísio envolve a fibra muscular. Este tecido mantém as fibras musculares unidas, permitindo que a força de contração gerada por cada fibra individualmente atue sobre o músculo inteiro. Este papel do tecido conjuntivo tem grande significado funcional porque na maioria das vezes as fibras não se estendem de uma extremidade do músculo até a outra. É ainda por intermédio do tecido conjuntivo que a força de contração do músculo se transmite a outras estruturas como tendões, ligamentos e ossos.

O citoplasma da fibra muscular apresenta-se preenchido principalmente por fibrilas paralelas, as miofibrilas. Estas são cilíndricas e correm longitudinalmente à célula, preenchendo quase completamente o seu interior. Ao microscópio óptico aparecem estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras. A faixa escura é denominada de Banda A, enquanto que a faixa clara é denominada Banda I. No centro de cada banda I aparece uma linha transversal escura denominada Linha Z, enquanto que no centro da Banda A, existe uma região de coloração um pouco mais clara denominada Banda H.

As miofibrilas do músculo estriado contêm quatro proteínas principais: miosina, actina, tropomiosina e troponina. Os filamentos grossos são formados de miosina e se encontram dispostos na Banda A. Os filamentos de actina são finos e estão associados com a tropomiosina e a troponina. Estão dispostos na Banda I e entre os filamentos de miosina nas extremidades da Banda A.

A actina apresenta-se na forma de filamentos em dupla hélice. A tropomiosina é uma molécula longa e fina, que se localiza ao longo do sulco existente entre dois filamentos de actina. A troponina é um complexo de três subunidades; TnT, que se liga fortemente à tropomiosina; TnC, que tem grande afinidade pelos íons de cálcio; e TnI, que cobre o sítio ativo da actina onde ocorre a interação entre a actina e a miosina. Cada molécula de tropomiosina tem um local específico onde se prende um complexo de troponina.

A miosina é uma molécula grande, tem forma de bastão. Numa de suas extremidades, a miosina apresenta um saliência globular ou cabeça, que possui locais específicos para combinação com ATP. É nesta parte da molécula que tem lugar todas as reações relacionadas com a quebra (hidrólise) do ATP. Nesta parte também se encontra o

local de combinação com a actina. As moléculas de miosina são dispostas de tal maneira que suas partes em bastão se sobrepõem e as cabeças situam-se para fora. A parte central da Banda A (BandaH) corresponde a região de sobreposição da miosina constituída exclusivamente da parte em bastão das moléculas.

O sarcômero em repouso consiste em filamentos de actina (associados a tropomiosina e a troponina) e de miosina que se sobrepõem parcialmente. Durante o ciclo de contração, os dois tipos de filamentos conservam seus comprimentos originais.

Portanto, a contração é devido a um aumento na zona de sobreposição entre os filamentos. A contração se inicia na faixa A, onde os filamentos finos e grossos se sobrepõem. Durante o ciclo de contração a actina e a miosina interagem da seguinte maneira: durante o repouso, o ATP liga-se à cabeça da miosina. Para hidrolisar a molécula de ATP e liberar energia, a miosina necessita da actina, que atua como cofator.

No músculo em repouso, a miosina não pode associar-se a actina, devido a repressão do local de ligação pelo complexo troponina-tropomiosina fixado sobre o filamento de actina. Todavia, quando há disponibilidade de íons Ca^{++} , estes combinam-se com a unidade TnC da troponina. Isto muda a configuração espacial das três subunidades desta proteína e expõe os locais de ligação da actina com a miosina. Como resultado da interação actina-miosina, o ATP é convertido em ADP + energia. Este processo leva a um aumento na curvatura da cabeça e de parte do segmento em bastão da miosina, virando para trás esta região e conseqüentemente, como a actina está ligada a ele, ela também é puxada no sentido da Banda H. Com isso, aumenta a área de sobreposição dos filamentos e conseqüentemente o músculo se contrai. À medida que as cabeças de miosina movimentam a actina, novos locais para a formação das pontes de actina-miosina aparecem. As pontes antigas de actina-miosina só se desfazem depois que a miosina se une a nova molécula de ATP; esta ação determina também a volta da cabeça de miosina para a sua posição primitiva, preparando-se para novo ciclo.

O Ca^{++} fica disponível no citoplasma da célula a partir de um estímulo, que provoca a abertura dos canais de cálcio e sua entrada pela membrana plasmática e/ou REL.

Uma única contração muscular é o resultado de milhares de ciclos de formação e destruição de pontes de actina-miosina. A atividade contrátil, que leva a uma sobreposição completa entre os filamentos finos e grossos, continua até que os íons Ca^{++} sejam

removidos e o complexo de troponina-tropomiosina cobra novamente o local de combinação da miosina.

Tecido Muscular Cardíaco

O músculo do coração é constituído por células alongadas, que também apresentam estriações transversais, mas podem ser facilmente distingüidas das células musculares esqueléticas pelo fato de só possuírem um ou dois núcleos centrais.

Essas fibras são revestidas por uma delicada bainha de tecido conjuntivo, equivalente ao músculo esquelético. Uma das características do músculo cardíaco é a presença de linhas transversais denominadas de discos intercalares, e que têm a função de adesão. A estrutura e função das proteínas contráteis das células musculares cardíacas são semelhantes às descritas no esquelético.

Logo abaixo da camada de tecido conjuntivo que reveste internamente o coração, existe uma rede de células modificadas, que têm papel importante na geração e condução do estímulo cardíaco.

Tecido Muscular Liso

É formado pela associação de células fusiformes longas que possuem um núcleo único e central. Estas células geralmente estão dispostas em camadas, sobretudo nas paredes dos órgãos ocos, como tubo digestivo, vasos sangüíneos, etc. Além desta disposição, ocorrem células musculares lisas no tecido conjuntivo que envolve certos órgãos, como a próstata e as vesículas seminais, e no tecido subcutâneo do escroto e mamilos.

As células musculares lisas são revestidas e mantidas juntas por uma rede muito delicada de fibras reticulares. A atividade contrátil característica do músculo liso está relacionada com a estrutura e organização de seus filamentos de actina e de miosina, que não exibem a mesma organização ordenada encontrada nas fibras estriadas. A célula muscular lisa apresenta feixes de miofilamentos que se cruzam em todas as direções, formando uma trama. Como acontece no músculo esquelético, a contração das células musculares lisas se inicia pela entrada de cálcio no citoplasma, porém este não se liga à troponina, liga-se a calmodulina. Esta proteína tem alta afinidade por este íon e quando forma o complexo calmodulina-Ca ativa a mudança da conformação das cabeças de miosina, resultando na contração.

Tecido Nervoso

O tecido nervoso acha-se distribuído pelo organismo, interligando-se e formando uma rede de comunicações, que constitui o sistema nervoso. Anatomicamente, este sistema é dividido em:

- 1) Sistema Nervoso Central (SNC) - formado pelo encéfalo e medula espinhal;
- 2) Sistema Nervoso Periférico (SNP) - formado pelos nervos e por pequenos agregados de células nervosas denominadas gânglios nervosos. Os nervos são constituídos principalmente por prolongamentos de neurônios (células nervosas) situados no SNC ou nos gânglios nervosos.

O tecido nervoso apresenta dois componentes principais:

- 1) os neurônios, células geralmente com longos prolongamentos; e
- 2) vários tipos de células da glia ou neuroglia, que sustentam os neurônios e participam de outras funções importantes.

No SNC há uma segregação entre os corpos celulares dos neurônios e os seus prolongamentos. Isto faz com que sejam conhecidas no encéfalo e na medula espinhal duas porções distintas, denominadas substância branca e substância cinzenta. A substância cinzenta é assim chamada porque mostra essa coloração quando observada macroscopicamente. A substância branca não contém corpos celulares de neurônios, sendo constituída por prolongamentos de neurônios e por células da glia. Seu nome origina-se da presença de grande quantidade de um material esbranquiçado denominada mielina, que envolve certos prolongamentos dos neurônios (axônio).

Os neurônios reagem prontamente aos estímulos e à modificação do potencial de ação e o estímulo pode restringir-se ao local ou propagar-se ao restante da célula, através da membrana. Esta propagação constitui o que se denomina impulso nervoso, cuja função é transmitir informações a outros neurônios, a músculos ou a glândulas.

Os neurônios através dos seus prolongamentos geralmente longos e numerosos, formam circuitos. Da mesma maneira que os circuitos eletrônicos, circuitos neuronais.

As funções fundamentais do Sistema Nervoso são:

- 1) Detectar, transmitir, analisar e utilizar as informações geradas pelos estímulos sensoriais representados por calor, luz, energia mecânica e modificações químicas do ambiente externo e interno;

2) Organizar e coordenar, direta ou indiretamente o funcionamento de quase todas as funções do organismo, entre as quais as funções motoras, viscerais, endócrinas e psíquicas. Assim, o Sistema Nervoso estabiliza as condições intrínsecas do organismo, como pressão sangüínea, tensão de O₂ e CO₂, teor de glicose, de hormônios e pH do sangue; e participa dos padrões de comportamento como os relacionados com a alimentação, reprodução, defesa e interação com outros seres vivos.

As células nervosas ou neurônios são formadas por um corpo celular ou pericárdio, que contém o núcleo, e do qual partem prolongamentos. Em geral, o volume total dos prolongamentos de um neurônio é maior do que o volume do corpo celular.

Os neurônios possuem morfologia complexa, porém quase todos apresentam três componentes:

- Dendritos: prolongamentos numerosos, especializados na função de receber os estímulos do meio ambiente, de células epiteliais sensoriais ou de outros neurônios.
- Corpo Celular ou Pericárdio: é o centro da célula e é capaz de receber estímulos.
- Axônio: prolongamento único, especializado na condução de impulsos que transmitem informações do neurônio para outras células (nervosas, musculares, glandulares).

A maioria das células nervosas possuem muitos dendritos, que aumentam consideravelmente a superfície celular, tornando possível receber e integrar impulsos trazidos por numerosos terminais axônicos.

Em geral, os dendritos são curtos e se ramificam como galhos de uma árvore. Em alguns casos tomam configurações características, como nas células de Purkinje do cerebelo, onde os dendritos formam um leque. Os dendritos apresentam pequenas projeções citoplasmáticas, os espinhos, que geralmente correspondem a locais de contato sináptico.

Cada neurônio possui apenas um único axônio, que é um cilindro de comprimento de diâmetro variáveis conforme o tipo de neurônio. Alguns axônios são curtos, mas na maioria dos casos, o axônio é mais longo do que os dendritos da mesma célula. Os axônios das células motoras da medula espinhal que inervam os músculos do pé, por exemplo, têm cerca de 1 m de comprimento.

Nos neurônios cujos axônios são mineralizados, a parte do axônio entre o cone de implantação e o início da bainha de mielina é determinada segmento inicial. Este segmento

recebe muitos estímulos, tanto excitatórios como inibitórios, de cujo resultado pode originar-se um potencial de ação cuja propagação é o impulso nervoso.

A porção final do axônio, em geral, é muito ramificada e recebe o nome de telodendro.

A transmissão do impulso nervoso de um neurônio para outro depende de estruturas altamente especializadas, as sinapses. Embora a maioria das sinapses se estabeleça entre o axônio e o dendrito (axodendríticas) ou entre o axônio e o corpo celular (axossomática), há também sinapses entre dendritos (dendrodendríticas) e entre axônios (axoaxônicas). Há uma tendência de se considerar também como uma sinapse a terminação nervosa em células efectoras, tais como células glandulares e musculares.

Nas sinapses, as membranas das duas células nervosas ficam separadas por um espaço de 20-30 nm, denominada fenda sináptica. Essas duas membranas estão firmemente aderidas entre si, e em alguns casos verificou-se a existência de filamentos formando pontes entre as duas membranas.

Sob a designação geral de neuroglia ou glia, incluem-se vários tipos celulares presentes no sistema nervoso central ao lado dos neurônios.

Nos preparados corados pela HE as células da glia não se destacam bem, aparecendo apenas os seus núcleos, espalhados entre os núcleos de dimensões maiores dos neurônios.

Calcula-se que haja no sistema nervoso central 10 células da glia para cada neurônio, mas em virtude do menor tamanho das células da neuroglia, elas ocupam aproximadamente a metade do volume do tecido. Distingue-se na neuroglia os seguintes tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos, microglia e células ependimárias.

As células da neuroglia não geram impulsos nervosos nem formam sinapses. Todavia, participam do controle da composição química do meio onde estão localizados os neurônios. As células gliais possuem na superfície receptores para moléculas neurotransmissoras, e possuem certas proteínas que existem também nos neurônios.

Ao contrário dos neurônios, as células da neuroglia são capazes de multiplicação, mesmo no adulto.

Os astrócitos são as maiores células da neuroglia, tem muitos prolongamentos e núcleos esféricos e centrais. Os oligodendrócitos são menores do que os astrócitos e apresentam poucos prolongamentos. São encontrados tanto na substância branca como na

cinzenta, apresentando-se nesta última principalmente na proximidade dos corpos celulares dos neurônios, constituindo células satélites, que formam uma verdadeira “simbiose” com os neurônios.

O corpo das células da microglia é alongado e pequeno, com núcleo denso e também alongado. A forma do núcleo destas células facilita sua identificação nos preparados pela HE, pois as outras células da neuroglia tem núcleo esférico. As células da microglia são pouco numerosas e apresentam prolongamentos curtos, cobertos por saliências finas, o que lhes confere um aspecto espinhoso. A microglia é encontrada tanto na substância branca como na cinzenta. Suas células são macrofágicas, pertencentes ao sistema mononuclear fagocitário. As células epidérmicas derivam do revestimento interno do tubo neural embrionário e se mantêm em arranjo epitelial, enquanto as demais células daí originadas se diferenciam em neurônios e em células da neuroglia. As fibras nervosas são constituídas por um axônio e suas bainhas envoltórias. Grupos de fibras nervosas formam os feixes ou tractos do SNC e os nervos do SNP. O conjunto destes concêntricos é denominado bainha de mielina e as fibras são chamadas fibras nervosas mielínicas. A condução do impulso nervoso é progressivamente mais rápida em axônio de maior diâmetro e com bainha de mielina mais espessa. No sistema nervoso periférico as fibras nervosas agrupam-se em feixes, dando origem aos nervos.

TÉCNICA BÁSICA DE HISTOLOGIA.

SACRIFICAR, DISSECAR, E SUBDIVIDIR.

O material para estudo histológico, portanto o mais normal possível, deve ser obtido com cuidados que visam rapidez, objetividade, cuidados com o manuseio.

Rapidez – Visa obter a peça desejada num tempo curto entre a coleta e a fixação. Tal cuidado atenta para os fenômenos de morte tecidual e celular que têm início imediatamente após a interrupção da corrente sanguínea.

Objetividade – Retirar primeiro as peças desejadas para que elas não sofram o processo de morte tecidual. Os diferentes tecidos tem tempos diferenciados de sobrevivência. Genericamente o tecido nervoso tem o menor tempo, e o tecido epitelial o maior tempo de sobrevivência.

Cuidados com o manuseio – Durante a dissecação, as peças devem ser coletadas por seus elementos de fixação. Em caso de impossibilidade, o manuseio da peça deve ser bastante cuidadoso.

OBTENÇÃO DAS PEÇAS.

Para obter as peças utiliza-se animais de pequeno porte como cobaias, ratos, coelhos, cães e gatos, mediante biópsia ou necrópsia.

Biópsia – Retira-se o fragmento do animal vivo mediante anestesia ou não, como no caso de punções ou esfregaços.

Necrópsia – Retirada do órgão com o animal já morto. O tempo decorrido entre a morte, a retirada da peça, e a fixação deve ser o menor possível.

OBS: A dimensão das peças é um fator de grande importância pois está relacionada com o poder de penetração do fixador, Uma peça de grande dimensão apresentará uma fixação de seus componentes apenas na sua periferia e não no centro da mesma. Recomenda-se que as peças sejam cortadas em fatias que não excedam a 3mm de espessura. Esse fatiamento pode ser efetuado imediatamente após a retirada, ou após um pequeno período de fixação.

A congelação de amostras é usada para diagnóstico rápido: colorações H.E., Sudam, Azul de Toluidina. A citologia pode ser: ginecológica, mama, tireóide, próstata, fígado, líquido amniótico, líquidos pleurais, líquidos abdominais, escarros.

FIXAÇÃO

A base para uma boa preparação histológica é a fixação completa e adequada do tecido a estudar, para tanto devemos obedecer a alguns requisitos.

Intervalo mínimo entre coleta e a fixação

Volume do fixador deverá ser no mínimo 10 vezes maior que o volume da peça.

Evitar que pequenas peças (principalmente as de punções por agulha) fiquem coladas no recipiente.

Fixadores são substâncias químicas que mantêm a integridade dos tecidos após a morte, sem qualquer alteração da estrutura celular por isso a sua função é.

-Inibir ou parar a autólise;

-Impedir a atividade e proliferação bacteriana;

-Coagular e tornar difusíveis as substâncias insolúveis.

-Preservar e endurecer os tecidos a fim de que resistam as etapas seguintes da técnica histológica;

- Para melhorar a diferenciação ótica dos tecidos;

- Facilitar a subsequente coloração.

A fixação deve começar sempre que possível na sala de cirurgia, ou na sala de autópsia, ou onde quer que seja colhido o material, e obedece a marcha progressiva da periferia para o centro, isto é as regiões superficiais são fixadas mais cedo do que as mais profundas. O tempo de fixação vai depender do fixador que estiver sendo utilizado podendo variar de 4 a 72 horas. Este material deve ser imediatamente mergulhado no líquido fixador adequado. A escolha desse fixador é de suma importância pois dele vai depender os estudos que se quer fazer como também das técnicas a serem aplicadas. Os tecidos podem ser de: Cirurgias, Biópsias, Necropsias, Camundongo, Coelho, Gato, Cachorro, Vaca, etc.

A escolha do fixador se leva em conta:

- Velocidade de penetração nos tecidos;
- Finalidade do exame a ser realizado;
- Vantagem econômica;
- Sem prejuízo a saúde.

Devemos salientar também que na fixação alguns fatores interferem para uma maior rapidez do nosso fixador.

Exemplo. Quando se deseja uma fixação rápida para casos de cortes imediatos de congelação, emprega-se a formalina aquecida a 50° durante uma hora. Este mesmo fixador a temperatura ambiente requer pelo menos 12 horas para exercer sua atividade.

A temperatura aumenta a velocidade de fixação, aumenta a penetração do fixador através do tecido, quanto mais elevada ela for, mais rápida será a penetração. Algumas preparações requerem no entanto, penetração lenta para melhor preservação estrutural. Nestes casos, recomenda-se o resfriamento entre 0 e 60°.

Os fixadores mais utilizados em histologia são: formol 10% , formalina tamponada, Bouin, Zenker, Alfac, Helly, Formol sublimado, Glutaraldeído, etc. Vantagens e Desvantagens de Alguns Fixadores: os fixadores aditivados fixam em tempos reduzidos que variam de 1 à 5 horas devido a mistura de agentes químicos. O formol é um fixador lento, seu tempo de fixação varia de 1 a 24 horas, seu custo é considerado baixo e é muito utilizado em patologia cirúrgica. A ação dos fixadores ocorre da periferia para o centro , portanto não devemos colocar muitos fragmentos no vidro, pois eles aderem-se uns aos outros, dificultando a difusão do fixador.

De acordo com sua propriedade de agir sobre as proteínas, os diferentes fixadores são classificados em: Coagulantes ou Sem Coagulação (Precipitantes.)

	Agente Fixador	Poder de Penetração
Com Coagulação:	Álcool	Moderado
	Cloreto de Mercúrio	Moderado
	Ácido Pícrico	Moderado
Sem Coagulação :	Formol	Moderado

Tetróxido de Ósmio	Lento
Ácido Acético	Rápido

É importante observar o PH nos fixadores, pois estes podem ocasionar uma retração maior no tecido, como também alterações na coloração.

O valor ótimo do PH nos fixadores é de 6,8 a 7,0.

Freqüentemente os fixadores são constituídos de um principal, associado eventualmente a outros. Quase todos os bons fixadores são ,entretanto constituídos de duas ou mais substâncias fixadoras, corrigindo uma , os defeitos da outra.

No entanto , de modo geral , por melhor que seja o fixador sempre ocorre contração e diminuição de volume (entre 20 a 40%) dependendo do fixador empregado.

PRINCIPAIS FIXADORES

Acetona:

Usada para fixação citológica, desidrata muito o tecido e o tempo normal de fixação é de 10 a 30 minutos.

Ácido Acético:

É um dos mais usados, entretanto, sempre em combinação com outras substâncias fixadoras. O ácido acético tem propriedade de corrigir a ação hidratante de outros fixadores, evitando- se desse modo artefatos de fixação .

Ele não fixa a proteína citoplasmática mas , coagula o núcleo da proteína, tendo pouco efeito fixador; não causa endurecimento, penetra bem e destrói o condrioma.

Geralmente é empregado em solução aquosa de 0,3 a 5 %.

Tempo de fixação; curto, de 10 a 15 minutos.

Ácido Pícrico:

Este fixador é empregado, associado ao formol ou ao Ácido acético. Tem ação fixadora rápida, porém de pequena penetração, possuindo leve descalsificante e provocando

edema das fibras colágenas. Após a fixação, os tecidos devem ser bem lavados em água de torneira antes da desidratação pelos álcoois, até que todo fixador seja removido.

Para o preparo da solução aquosa saturada, a que se usa geralmente, coloca-se de 1 a 1,5g em 100ml de água destilada em temperatura ambiente, deixando-se durante 12 a 24 horas ou, se prepara a solução alcoólica com álcool a 80%.

Este fixador fixa as proteínas formando picratos de proteína e a mesma combinação é observada com alguns carboidratos. Tem pequena penetração e causa endurecimento, mas não provoca retração ou distorção do tecido.

Álcool Etilico :

É usado para a fixação de pequenos fragmentos de tecido, entretanto, atualmente está sendo pouco empregado devido a numerosas contra indicações do seu uso.

A fixação é rápida (1 hora) desde que os fragmentos de tecidos tenham a espessura máxima de fixação, pois, ocorrerá contração do tecido e seu endurecimento será muito intenso. O tecido depois de fixado, deverá passar do álcool absoluto para 95% e depois a 80%. As alterações celulares observadas com a fixação pelo álcool são:

- Agregados de células tendem a se contrair, levando à formação de grupos celulares.
- O citoplasma se contrai fortemente.
- Os núcleos são distorcidos morfológicamente.
- O citoplasma se retrai e se acumula na membrana do lado oposto ao qual o fixador penetrou na célula.

Álcool Etilico Absoluto.

Ele não é bom fixador, pois ao mesmo tempo que fixa desidrata o tecido tornando-o muito duro. Além disso, tem capacidade de penetração muito pequena, de modo que os fragmentos do tecido a serem fixados devem ser pequenos. Em geral usa-se álcool 95% durante 30 minutos.

PRINCIPAIS SOLUÇÕES FIXADORAS.

Formalina Comum:

Formalina 37-40%.....100,0ml

Cloreto de Sódio..... .9,0gr

Água Comum..... 900,0ml

É um fixador muito comum, não causando excessivo endurecimento dos tecidos. Não é recomendado para uso de rotina, porém ideal para a preservação das muco-substâncias.

Formalina Neutra Tampão 10%

Formalina 37-40%.....100,0ml

Água Destilada.....900,0ml

Fosfato de Sódio Monobásico.....4,0gr

Fosfato de Sódio Dibásico (anidro)6,5gr

É o fixador recomendado para o uso de rotina.

Formalina- Acetato de Sódio.

Formalina 37-40%.....100,0ml

Acetato de Sódio.....20,0gr

Água Destilada.....900,0 ml

MATERIAL DURO

Para material mais duro se utiliza o formol Glicerinado, onde se obtém uma boa fixação e uma melhora na hora do corte.

Fórmula: Preparar um litro de formol a 10%.

Retirar desse 50ml e acrescentar 5ml de glicerina medicinal.

Ex. Muito bom para útero.

Para uma Fixação mais Rápida: (Alguns autores indicam)

No Formol a 10%, acrescentar 10% de ácido acético glacial para acelerar a nossa fixação. Fixação em média 6hs.

Bouin:(á quente para acelerar a fixação)

Colocar o Bouin com a peça por 40 minutos na estufa a 58C. Logo após fazer banhos de álcool 100 (5 minutos); 3 banhos de xilol (10 minutos); 3 banhos de parafina de (10 minutos cada). Montar o bloco.

Fixador para Mama.

Álcool Absoluto.....70ml

Formol 37-40%.....20ml

Ácido Acético Glacial.....10ml

É o mais usado na Patologia.

Carnoy:

Álcool Absoluto.....60,0ml

Clorofórmio.....30,0ml

Ácido Acético Glacial.....10,0ml

È um dos fixadores mais rápidos e penetrantes. O tempo de fixação é de em média 3 horas, e é usado geralmente para diagnósticos urgentes.

Tem sido muito empregado em citologia nos esfregaços hemorrágicos para a retirada de sangue ,pois destrói as hemáceas. Não é necessário lavagem em água após a fixação.

Bouin

Ácido picrico solução saturada.....375ml

Formalina 37-40%.....100ml

Ácido Acético glacial.....25ml

A fixação leva de 4 a 12 horas dependendo do tamanho da peça. Importante depois da fixação lavar em água corrente para eliminar o ácido picrico residual, pois este pode interferir na coloração subsequente . Excelente fixador para cromossomas ,rim e fígado.

FAA

Álcool 70°..... 85ml

Formalina 37-40 %.....10ml

Ácido Acético glacial.....5ml

Fixador muito usado na Botânica

Artefatos de fixação: quando usarmos ácido acético, devemos observar este processo, pois o tempo além do estabelecido endurece os tecidos e prejudica os procedimentos futuros. Os fixadores a base de cloreto de mercúrio precipitam nos tecidos e às vezes torna-se inviável para os procedimentos de imunohistoquímica. Em algumas situações os fixadores são específicos, por exemplo o Bouin é utilizado para estudo do glicogênio.

DESIDRATAÇÃO.

É o processo de retirada de água do interior da célula. A água além de prejudicial, não se mistura à parafina. Para se conseguir a infiltração suficiente da parafina na inclusão, é necessário que o tecido esteja completamente desidratado.

O álcool etílico é o agente mais usual empregado neste processo, sendo utilizado em uma série crescente (70%, 80%, 90% e 100%).

O volume de álcool deverá ser de 10 a 20 vezes maior do volume da peça.

DIAFANIZAÇÃO OU CLARIFICAÇÃO.

Consiste na infiltração dos tecidos por um solvente da parafina, que seja ao mesmo tempo desalcolizante. A parafina não se mistura com água nem com álcool. Ambos devem ser completamente removidos para que a parafina possa penetrar eficientemente no tecido.

O solvente mais usado é o xilol, e destina-se à completa retirada de água, álcool e também da gordura por ventura existente no material.

A denominação clarificação, refere-se ao processo de desalcolização e infiltração do solvente da parafina é devida ao índice de refração dos líquidos empregados para este fim. O tecido, ou melhor as peças assim tratadas tornam-se semi-translúcidas, ou quase transparentes.

Entre os reagentes mais usados na fase de diafanização, podemos citar os seguintes:

XILOL

TOLUOL

CLOROFÓRMICO

ÓLEO DE CEDRO

BENZOL OU BENZENO

ÉTER DE PETROLEO

e outros.

IMPREGNAÇÃO

O processo de impregnação dos tecidos se faz por meio da parafina. A parafina é um dos vários produtos da destilação (refinação) do petróleo, sendo uma mistura de carbonetos saturados.

A finalidade da impregnação é eliminar completamente o xilol contido no material e a total penetração da parafina nos vazios deixados pela água e a gordura, antes existentes no tecidos. Este processo serve também para preparar o material par cortes, removendo o clarificante, endurecendo-o e dando-lhe a consistência adequada para que possa ser cortado.

Também podemos citar como agentes de infiltração ou impregnação a celoidina, a goma arábica, parafina plástica, polietino glicol, parafina esterificada e carbovax..

INCLUSÃO.

A parafina é o meio de inclusão mais usado. Este método é o de menor custo e o que oferece algumas vantagens, entre outras, a possibilidade de conservar os blocos indefinidamente. A inclusão é feita em caixas apropriadas, em uma temperatura de 60°C. Usando-se parafina em temperatura muito alta prejudica-se o material.

É importante, transferir o material diretamente do último banho de parafina para o molde de inclusão, o mais rápido possível para evitar que se forme vácuo em volta do material e que este venha se soltar durante o processo de corte.

MICROTOMIA.

Para se obter cortes de material incluído em parafina ou por congelação é necessário um instrumento especial :o micrótomo

Os micrótomos variam com os fabricantes e tem como fundamento duas peças principais :o suporte ou mandril e a navalha.

Os micrótomos de acordo com a sua fabricação podem funcionar com a peça fixa e a navalha móvel (micrótomo para celoidina) ou com a navalha fixa e a peça móvel (micrótomo para parafina).

A microtomia é imprescindível porque há necessidade de transparência do tecido. A observação microscópica depende de um bom corte, ou seja bem distendido, sem ranhuras , dentes,e dobras. Os cortes são feitos em micrótomo rotativo com navalhas descartáveis perfil C com espessura de 4 a 6 micrometros.

Mas se sabe que nem sempre é fácil tirar cortes perfeitos ,e o que mais surgem são problemas e dificuldades para conseguirmos bons cortes. Sendo assim para cada problema identificado vamos adotar um determinado procedimento que irá auxiliar na sua correção.

Os micrótomos devem passar por uma revisão anual, para ajustes de seus componentes.

-Cortes comprimidos ou apinhados.

- Navalha sem fio ;use outra parte da navalha.

- Ambiente demasiadamente quente ;resfria a navalha e o bloco.
- Parafina muito mole; use parafina de ponto de fusão mais alto.
- Material infiltrado com parafina mais dura e em blocado com parafina mais mole.
- **Cortes alternadamente grossos e finos.**
- O porta bloco ou a navalha estão soltos ;Fixe bem todos apertando os parafusos.
- Ângulo da lâmina incorreta; reajustar a inclinação da navalha.
- Bloco quente ; esfrie o bloco uniformemente.

- Fita com rachaduras ou falhas

- A lâmina têm dentes ; use outra parte da navalha e ou uma nova.
- Ângulo de corte incorreto; procure o ângulo certo.
- Partículas duras na parafina; reinfiltre o material com parafina filtrada.
- Resíduos no bordo da navalha; limpe com o dedo ou com pano embebido em xilol.

- Cortes com dificuldade de ser distendido em banho maria

- Fazer o corte com 5 ou 6 micras e colocar primeiro para distender em água com temperatura ambiente, logo após pesca-se e colocamos em banho maria. Distende bem e não fica com arte fato.
- Temperatura muito alta do banho maria; observar sua regulagem.

- Cortes se desfazem e o material se separa da parafina

- Material insuficientemente desidratado e mal infiltrado; se for álcool no material é de difícil correção; se for xilol repetir a infiltração com parafina.
- Material mantido com muito tempo na estufa e tratado com parafina muito quente .
- Material duro demais; amaciá-lo em água e incluir em outro tipo de meio.
- Material muito mole, esponjoso, mal desidratado e incluído, correção quase impossível, inclua em outro meio (ex: resina) .

- Cortes aderem a lâmina

- Lâmina suja; limpar com gase embebido em xilol.

- Lâmina sem fio.
- Ângulo do corte muito grande; reajuste a inclinação da navalha.
- Passar na navalha silicone, inclusive no fio, depois secar bem com gase que a navalha fica lustrosas corte não adere a navalha.

- Cortes aderem ao bloco

- Formação de carga eletrostática devido ao ar muito seco; umedeça o ar .
- Fio da navalha suja; limpá-lo com xilol.
- Ângulo de espaço livre insuficiente; reajuste a inclinação da navalha.

- Lâmina faz ruído ao subir e passar diante do bloco

- A parte basal da navalha não tem espaço livre ao passar; reajuste o ângulo da navalha pois está incorreto.

- Navalha de perfil muito fino contra um material muito duro; amoleça o material com água e use uma navalha de perfil correto;

- Material demasiadamente duro; infiltre em outro material (ex. resina);
- Preservação e durabilidade da navalha;

- Adequar o emblocamento com o tamanho da peça, ou seja, quanto menor for o bloco de parafina menor será a superfície da navalha utilizada, com isso diminuímos a área de atrito da mesma com a parafina onde há maior perda de fio.

- Para amolecer material duro

- Quando o material não estiver emblocado
- Preparar formol glicerinado;
- Preparar um litro de formol 10%;
- Retirar 50ml deste formol e acrescentar 50,1 de glicerina medicinal;
- Deixar por 12 horas e proceder o emblocamento normal.

- Quando o material já estiver emblocado

- Se tivermos um bloco no qual a peça ficou endurecida, desbastamos este e depois mergulhamos o bloco em solução de detergente neutro, ou seja, algumas gotas deste em

uma gase umedecida. Deixe o bloco por aproximadamente 3 a 5 minutos e proceda normalmente.

- Outro método consiste em realizar o processo inverso, ou seja, desparafinar na estufa e em seguida desparafinar em xilol. Reidratar e fixar em formol glicerinado (12 horas) e realizar o processo de emblocamento normal.

-Material ósseo difícil de cortar

Uma maneira para melhorar os cortes de ossos que não ficaram bem descalcificados é a seguinte:

- Desbaste o bloco até o material ficar exposto;
- Mergulhe o bloco numa solução de hidróxido de Amônio a 5% por 10 a 15 minutos, e depois lave em água corrente por 5 a 10 minutos.
- Enxugar e cortar.

Outro método é desbastar o bloco e cortar este numa solução de 50% de água e 50% de glicerina medicinal. Deixar por 1 ou 2 horas. Esses dois métodos podem ser empregados para qualquer outro tipo de material mais duro, ou também quando o tecido está se fragmentando. (ex. Fibromas uterinos).

COLORAÇÃO

Devemos ter sempre em consideração, que bons resultados de uma coloração devem-se a vários fatores, dentre eles temos que reconhecer a valia de um bom aliado, nosso eterno companheiro “O Corante”. Mas além disso devemos observar o seguinte.

O mecanismo das colorações está relacionado a dois fatores igualmente importantes:

- **Os corantes**
- **Elementos a corar.**

Corantes: São substâncias coradas, capazes de transmitir a sua cor a outros corpos, empregados com o fim de tornar mais visíveis e distintos uns dos outros elementos

integrantes da célula, ou tecido, para que os resultados possam ser comparados ou estudados.

Corantes naturais: São corantes extraídos de produtos animais ou vegetais. Ex. Carmim, Hematoxilina, etc..

Corantes artificiais: São todos de natureza sintética.

Para haver coloração é necessário que o material corante se fixe sobre o tecido, para isso devemos ter por um lado um material bem processado e na espessura ideal, e por outro o corante deverá estar dissolvido nas proporções indicadas e no solvente ideal. Os corantes se classificam também em ácidos e básicos. Ao corantes básicos (com elemento ativo básico) coram os elementos ácidos do tecido, como o núcleo que denominamos basófilos.

Os corantes ácidos atuam de maneira inversa, coram os elementos básicos por meio dos seus ácidos, e esses elementos são denominados de acidófilos.

Exemplos de corantes básicos: Verde de Metila, Violeta Cresil, Tionina, Azul de Toluidina, Hematoxilina etc.

Exemplos de corantes ácidos: Orange G, Eosina.

A coloração pode ser progressiva e ou regressiva, a primeira não necessita de diferenciação e a Segunda necessita.

A coloração é considerada o método mais certo de probabilidade, para um bom diagnóstico, agora, se ela é falha, são sempre responsabilizados do fracasso, os corantes ou o método utilizado. Mas às vezes, esse tipo de acusação torna-se severo demais, já que outros problemas podem ser os causadores do fracasso.

O método é importante, o corante também, mas uma má fixação, parafina muito quente, ou uma desidratação incompleta podem trazer como resultado uma coloração deficiente.

Não existe uma coloração completa e de uso rotineiro que satisfaça todas as exigências para um bom resultado. Muito pelo contrário, as colorações possuem algo em

particular que as diferenciam umas das outras. Algumas são vantajosas para certos elementos e desvantajosas para outros. Num mesmo corte, também determinadas colorações exigem um fixador em particular para por em evidência algumas estruturas. Por isso, um estudo aprofundado na microtécnica requer diferentes colorações e métodos. Como foi mencionado, anteriormente, não só o corante é o responsável por algum fracasso, devemos observar e ter em conta o seguinte:

Origem do material: em tecidos muito compactos, possuidores de rico componente epitelial, há tendência de uma coloração mais rápida e mais provável do que nos tecidos pobres em células.

Espessura do corte: Nos cortes finos, logicamente, não haverá uma sobrecoloração como nos cortes grossos, mas também não existem técnicas que exigem um corte grosso para evidenciar elementos tissulares, por exemplo, reticulina e fibras elásticas. Para uma boa técnica nuclear, os cortes grossos não trariam benefício algum.

Tempo de fixação e qualidade do fixador: De relevante importância, a cada coloração corresponde um fixador adequado, por isso a permanência prolongada de material num fixador oxidante retira parcialmente a aptidão tintorial a certos corantes. Quando formos utilizar corantes anílicos, temos que observar que a preparação tenha sido fixada por um fixador apropriado. Temos, por exemplo, se utilizarmos o líquido de Fleming, que é difícil corar com hemateína, bons resultados com a safranina e hematoxilina férrica. Também a permanência exagerada no álcool diminui a colorabilidade do material.

Qualidade do corante: Sempre que começarmos uma nova coloração temos que investigar a procedência do corante, bem como a marca. Existem muitos produtos, dentre os quais achamos os de boa e os de má qualidade. O grau de perfeita purificação é de relevante importância nos bons resultados da técnica. Um dos maiores problemas é a má qualidade dos corantes. Poucas marcas reúnem as perfeitas condições de purificação e estudos demonstram que muitos corantes tinham misturas como sais ou dextrina.

A forma ideal de melhorar a qualidade do corante é diluir a quantidade a ser utilizada com álcool absoluto, misturar bem, e deixar evaporar. Uma vez evaporado o líquido, o material que ficou seco será utilizado para a mistura definitiva.

Outra maneira de observar se o produto é puro ou não é obter o máximo de informações a seu respeito, como as citadas a seguir:

- Nome
- Composição química
- Massa molar
- Descrição (líquido ou pó)
- Utilidades (Ex: histotecnologia, citologia, farmacologia)
- Certificado de pureza
- Verificar o aspecto e uniformidade e, principalmente, a umidade.

Qualidade da água destilada: temos que levar em consideração que a água a ser utilizada no preparo das soluções corantes ou para lavar lâminas deve ser pura e básica. Não deve ficar turva na presença de Nitrato de Prata nem vermelha com a fenolftaleína.

Química da coloração: geralmente os tecidos se colorem no mínimo por dois tipos de corantes em forma sequencial, primeiro o básico e depois o ácido. Os tecidos corados básicos são denominados basófilos e os com ácido são os acidófilos.

A grande maioria dos basófilos unem-se às cores azul e púrpura e os acidófilos às róseas. Devido a isso, com uma coloração de hematoxilina e eosina teremos o primeiro basófilo e o segundo acidófilo.

É muito diversificada a quantidade de corantes que dispomos no mercado. Porém, são poucos os utilizados de forma corriqueira, já que as propriedades corantes da maioria deles são similares, salvo pequenas diferenças na cor.

Tendo como base a classificação dos corantes anílicos feita por EHRLICH, do ponto de vista dos químicos, teremos:

Acidocromos: tem como princípio corante ácido, por exemplo Eritrosina, Vermelho Congo, Light Green S.F., Fucsina, Fucsina Ácida.

Basocromos: são formados por uma base corante e um ácido indiferente, por exemplo Pardo de Bismark, Tionina, Azul de Toluidina.

Anfocromos ou Neutros: resultam da união de uma base corante e um ácido corante

A metacromasia deve-se ao fato de que certos elementos captam as moléculas livres da base corante, formadas por hidrólise nas soluções aquosas.

Em rotina o método utilizado é do H.E (hematoxilina e eosina). Ele é composto da retirada de parafina da lâmina, ou melhor, desparafinização com posterior hidratação. Para isso deverá passar por uma série de xilóis, álcoois e água destilada, que é a bateria mais usada, dando-se a seguir o corante nuclear. Este deverá ser escolhido de acordo com as necessidades; se progressivo basta lavar bem em água, se regressivo diferencia –se e lava-se bem, esta lavagem ou viragem consiste em oxidar o corante na cor desejada. O corante de contraste deverá obedecer ao seu preparo.

Por exemplo, se for alcoólico, passar em álcool antes de entrar no corante, após este estágio os cortes sofrerão um processo de desidratação que é o inverso da desparafinização sendo que ao chegar ao xilol sofrerá o processo de montagem. Esta será feita pela adição de uma lamínula sobre o corte, tendo como intermediário (lâmina/Lamínula) uma substância não muito viscosa, portanto fluida que permitirá o corte ser examinado com uma transparência total, sem desvio dos raios luminosos. Habitualmente usa-se com intermediário o bálsamo do Canadá, o Entellan, e as resinas sintéticas, etc.

-Preparação dos Corantes

Hematoxilina de Harris.

- 1gde hematoxilina
- 10mlde álcool absoluto
- 20gde alúmen de potássio
- 200mlde água destilada
- 0,5 gde óxido de mercúrio amarelo.

Dissolver o alúmen na água com o auxílio de calor , e a hematoxilina no álcool. Juntar as duas soluções no calor (usa -se o erlenmeyer no fogão) e quando a solução estiver

em ebulição adiciona-se óxido de mercúrio. Esfrie o recipiente com água fria abundante. Filtrar antes do uso e adicionar algumas gotas de ácido acético glacial.

Eosina

Solução Estoque.

- 10gEosina Y

-25mlÁgua Destilada

-475mlÁlcool Etilico

Eosina Solução de Trabalho

-50mlEosina solução estoque

-150mlÁlcool 95%

-4mlÁcido Acético Glacial

-200mlÁgua Destilada.

Se quando passou pela Hematoxilina e ficou muito corada a lâmina usamos o álcool ácido para descorar um pouco. (Coloração regressiva)

-Álcool Ácido

-0,5mlÁcido Clorídrico concentrado

-99,5mlÁlcool 70%

Lavar rapidamente e observar no álcool ácido e após água corrente.

Depois levar até a água de Amônia.

-Água de Amônia.

-1mlHidróxido de Amônio 28°

-100mlÁgua Destilada

Logo após lavar um pouco em água corrente e seguir a coloração normal

Tricrômico de Goldner.

Goldner A

-0,2g Ponceu de Xilideno

-0,1g.....Fucsina Ácida

- 0,1g.....Orange G
- 300ml.....Água destilada Acética a 0,2%

Solução de Ácido Fosfotúngstico a 5 %

Goldner B

- 0,2mg.....Light- green SF , ou Verde Luz.
- 100ml.....Água destilada Acética a 0,2 %

Solução Água Destilada Acética a 0,2 %

Usada para fazer rápidas lavadas entre os corantes Goldner A e B e o Ácido Fosfotúngstico.

COLORAÇÕES ESPECIAIS.

Picrosirus. (Resina)

- 100ml.....Sol. Saturada de Ác.Pícrico
- 0,1g.....Sírus Red F3Ba
- Corar por 45 min, em estufa a 60° na solução Picrosirus.
- Lavar em água destilada
- Hematoxilina por 2 minutos, secar e montar
- Resultados; Vermelho- Fibras colágenas:

Amarelo- Fibras elásticas, musculares,epitélio,hemáceas

Tricrômicode Mallory (Parafina)

Solução A

- Fucsina Ácida.....0,5g
- Água Destilada.....100ml

Solução B

- Azul de Anilina solúvel em água..0,5g
- Orange G.....2g
- Ácido Fosfotúngstico.....1g
- Água Destilada.....100ml

Técnica.

Desparafinar ,hidratar,corar na Hematoxilina e lavar em água corrente.

Corar na Sol. A por 5min.

Escorrer e passar diretamente para a Sol. B de 10 a 30 min.

Lavar em 3 banhos de álcool a 95%

Clarificar e montar.

Resultado; núcleo roxo, fibras colágenas em azul, citoplasma róseo e hemáceas em amarelo.

Tricrômico de Gomori (Tecido Conjuntivo)

Fixador; Formalina Neutra Tamponada

Solução Tricrômica.

Cromotrope 2R	0,6g
Verde Luz, SF	0,3g
Ác. Fosfotungstico	0,8g
Água Destilada	100ml

Solução de Água Acetificada a 0,5%

Ácido Acético Glacial	0,5ml
Água Destilada	100ml

Desparafinar, e hidratar os cortes

Corar pela hematoxilina férrica de Weigert 10min.

Lavar em água corrente

Solução Tricrômica por 15 a 20min.

Água acetificada por 2min.

Lavar em água Destilada

Desidratar em 2 álcoois 95% rapidamente

Clarificar, e montar.

Resultados;

Vermelho; fibras musculares; verde colágeno, azul a negro núcleos.

OBS.:

- Depois de pronta a lâmina com a lamínula, se esta estiver com resíduos de entelã ou bálsamo passa-se um bom bril seco que esta fica em perfeitas condições.
- Água sanitária: se ficar resíduos de coloração na lâmina após colocarmos a lamínula, colocamos em um rápido mergulho neste produto que retirará a coloração excedente.

DESCALCIFICAÇÃO

Para que se possa examinar o tecido ósseo ou tecido com áreas de descalcificação, deve-se antes de processar, fixar, incluir, e cortar o material.

A descalcificação do tecido ósseo baseia-se na propriedade dos minerais contidos nos ossos tornarem-se solúveis em ácidos diluídos. Qualquer ácido capaz de fornecer sais de cálcio solúveis em água, poderá ser utilizado no processo.

Os ossos ou outros materiais calcificados devem ser cortados em pequenos pedaços (cerca de 4 mm) com serra adequada, antes da fixação, pois quanto menor o tamanho mais rápido será a descalcificação. **Só depois de completada a fixação é que se coloca a solução descalcificadora,**

Como agentes descalcificadores são empregados geralmente os ácidos: nítrico, fórmico, tricloracético, clorídrico, pícrico, sulfossalicílico, EDTA, etc. O ácido nítrico possui uma ação duas vezes mais rápida do que o ácido fórmico, mas este último preserva melhor o tecido para a coloração posterior. A Dulcia Tônica é um agente descalcificador muito usado na patologia, a qual é encontrada no mercado como um líquido para permanente de cabelo (da marca Loreal) que no laboratório serve como agente descalcificador de unha e ajuda no amolecimento de blocos duros.

O Bouin, EDTA e ácido nítrico 1% são geralmente usados na descalcificação de medula óssea. Quando usado o ácido nítrico deixa-se o material neste por 12 horas, em

seguida neutraliza-se com sulfato de sódio 4% em 30 minutos, depois lava-se (rápido) e coloca-se em álcool com glicerina por 1 hora o processo normal.

Durante o processo de descalcificação, vai-se formando o ácido fosfórico. Este ácido tem um ph em torno de 6 a 7. Enquanto o cálcio está sendo removido, o ácido fosfórico formado torna a solução descalcificadora em uma solução tampão. Com este ph ele faz com que a solução mantenha suas propriedades e não danifique as estruturas celulares do tecido exposto ao processo.

Tão logo o cálcio seja removido o ph se altera e por conseguinte começa a alterar as propriedades corantes na solução, os núcleos perdem 10% de suas propriedades corantes. Chama-se a esta alteração de “destruição da basofila nuclear”.

O importante, no processo de descalcificação é fazer com que o “gás carbônico” que também é produzido, seja removido. Por isso a solução deve ser agitada regularmente. A agitação ou movimento do líquido, ou da peça, e também a descalcificação a vácuo são extremamente úteis para acelerar o processo de descalcificação. Porém muitos autores não recomendam o uso do processo de vácuo.

O líquido descalcificador deve ser renovado freqüentemente e a solução descalcificadora não deve ser saturada para que se obtenha a descalcificação no menor espaço de tempo possível. O volume do descalcificador deve ser no mínimo 40 vezes maior do que o volume da peça.

Segundo alguns autores não é recomendável aquecer a solução descalcificadora. Caso se aqueça, não deve ultrapassar a 37 C. Quando se aquece a solução não se acelera o processo e sim acelera-se a formação de gás carbônico e as proteínas presentes no tecido podem sofrer deformação. Porém outros autores afirmam que se a descalcificação for feita na estufa a 37 C, por 1 hora e logo após forem feitas trocas periódicas de 2 em 2 horas e emblocados no máximo em 24 horas, o processo descalcificador é acelerado.

O ácido usado, deve ser completamente removido do tecido depois de finda a descalcificação, pela lavagem abundante e cuidadosa em água corrente ou álcool, conforme o descalcificador empregado. Esta lavagem deve ter no mínimo a duração de 4 horas (quando se usa ácido fórmico com citrato de sódio) até 24 horas. Não existe uma solução descalcificadora ideal, a única diferença entre as várias soluções, é que umas agem mais rápido do que as outras. Tudo depende do tempo em que se retira o material dessa solução.

Conforme alguns autores não é recomendado lavar a peça que acabou de ser descalcificada, já outros indicam que deve se colocar no sulfato de sódio.

Eventualmente uma área de calcificação poderá ser encontrada e, tecido incluídos no momento do corte pelo micrótomo. Neste caso é melhor mergulhar o bloco no descalcificador por aproximadamente 1 hora, tempo suficiente para descalcificar o tecido necessário para o exame. Esta medida é menos prejudicial ao tecido do que inverter o processo. Mas vale salientar que o processo somente é eficaz para a preservação do tecido ósseo.

No final, quando já se tem a lâmina pronta, se for detectado um borrão na basofilia, motivo fixação, para que se recupere esta lâmina (coloração), corta-se novamente e faz-se a fase inicial até a água destilada. Depois trata-se essa lâmina com ácido periódico a 0,5% por 20 minutos e segue-se normalmente a coloração.

Quando nota-se que a lâmina ficou opaca é bom utilizar solução de iodo alcoólico.

O tecido ósseo é um material comum no laboratório; seu preparo exige muito cuidado. A princípio, ele é fixado e depois descalcificado: utiliza-se vários descalcificadores como ácido tricloracético, ácido nítrico e outros. Devemos tomar muito cuidado, o excesso de descalcificação prolongada, destrói a basofilia dos tecidos, conseqüentemente a coloração é ruime dificulta a interpretação do diagnóstico. Quando isto ocorrer, devemos fazer um tratamento com ácido periódico a 0,5% por uma hora, depois corar pelo método desejado. Este método melhora a coloração.

A descalcificação da medula óssea pode ser realizada com ácido nítrico a 1% em overnight. Este processo não prejudica as estruturas celulares. Após a descalcificação da medula e de outros tecidos ósseos, devemos neutralizá-los utilizando carbonato de cálcio a 4% por 15 minutos, depois lavá-los bem por 30 minutos em água corrente. A lavagem não deve ser em excesso. A diafanização dos ossos também deve ser menor que outros tecidos, a permanência por muito tempo no xilol provoca endurecimento excessivo.

DESCALCIFICAÇÃO DE OSSO

Procedimento:

- Deixar de molho na água ou colocar o material que se queira estudar enterrado (por alguns dias);
- Deixar descalcificar por 72 horas (dependendo de descalcificador);
- Lavar em água corrente pelo menos 12 horas (facultativo);
- Colocar no fixador (à escolha) e dar continuidade no processo.

DESCALCIFICAÇÃO DE DENTE

Deixar no ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20% por aproximadamente 90 dias.

DESCALCIFICADORES

-Ácido nítrico (HNO₃):

Vários autores enaltecem as propriedades do ácido nítrico como descalcificador. Ele não causa o entumescimento dos tecidos, e as melhores colorações (mais nítidas) são obtidas em cortes de materiais por ele descalcificados, provavelmente devido ao seu elevado potencial de oxidação.

Ácido nítrico a 5:

*ácido nítrico concentrado.....5 ml

* água destilada.....95ml

Colocar os fragmentos fixados no descalcificador, trocando a solução diariamente. Após a descalcificação lavar em água corrente por 30 minutos e em seguida neutralizar em solução de formalina 10% (adicionada de carbonato de cálcio ou magnésio em excesso) pelo menos por 5 horas, lavando após em água corrente, durante á noite. Evitar descalcificação excessiva.

OBS: A 7,5% bom para descalcificar ossos do crânio, face e fêmur.

-Ácido fórmico (HCOOH):

É

empregado em solução a 5% ou alcoólica, ou em mistura com o formol a 10-20%. A descalcificação é obtida dentro de 3 a 5 dias. Costuma-se usar também com soluções tampões como o citrato de sódio dá melhores colorações que o método de descalcificação com o ácido cítrico.

OBS: Ácido fórmico a 20% é bom para descalcificar dentes que estão no fixador há vários dias.

-Ácido fórmico – citrato de sódio:

Solução A:

Água destilada.....250ml

Citrato de Sódio.....50g

Solução B:

Água destilada.....125ml

Ácido fórmico puro.....125ml

No instante do uso juntar partes iguais da solução A e B.

Este descalcificador preserva bem a morfologia de tecido embora seja muito lento, é recomendados para fragmentos de tamanho pequeno.

-Ácido clorídrico (HCL):

É um dos reativos mais usados para a descalcificação. Mesmo em soluções muito diluídas, sua ação é rápida mas tem o inconveniente de causar um entumecimento apreciável dos tecidos. Isto, pode ser resolvido adicionando a ele tampões, ou soluções tampões, como por ex.: sulfato de sódio a 5% ou 10%, ou ainda, usá-lo diluindo em álcool combinado com ácido crômico.

-Ácido tricloracético (CCl₃COOH):

É geralmente usado na percentagem de 5% em mistura com o líquido fixador (formal 10%).
A lavagem subsequente deve ser feita em álcool.

Ácido tricloracético 5%:

* água destilada.....95ml

* ácido tricloracético.....5ml

OBS: O ácido tricloracético a 10% em água destilada é um bom descalcificador para medula óssea e ossos sem muita dureza (12h)..

-Bouin: Usado na descalcificação de ossos de crescimento primário.

* ácido pícrico solução saturada (alcoólica).....375ml

*formol 40%.....120ml

*Ácido glacial.....25ml.

Descalcificador usado no Dep. de Anatomia Patológica do Hospital de Massachusetts e no L.A.P. Unicamp:

EDTA, Tetrasódio.....7g

Tartarato de Sódio e Potássio.....80g

Tartarato de Sódio.....1,4g

Ácido Clorídrico.....1200ml

Água destilada.....9000ml

A escolha das marcas das drogas deste descalcificador tem que ser criteriosa na qualificação.

Todo tecido tem que estar fixado e recortado no tamanho correto, preferencialmente fixado durante a noite.

Submeter o tecido ao descalcificador em no máximo 8 horas, sendo conforme tamanho e concentração de cálcio no fragmento o tempo pode variar de 2,4,6,8 horas ou ainda ser necessário mais tempo, e neste caso nunca deixe o fragmento no descalcificador durante a noite, repita a operação durante o dia.

Teste os fragmentos com um alfinete ou uma lâmina de bisturi, se ao penetrar no tecido ranger revelando textura vítrea continue o processo.

Concluindo o processo de descalcificação lave em água corrente por uma hora, não deixe lavando durante a noite, conserve em álcool 70%

INTRODUÇÃO A BIOLOGIA CELULAR

A biologia celular (antiga citologia) é a parte da Biologia que estuda todas as organelas celulares e seus componentes. Procura diferenciar as células tanto animais como vegetais, observando também as grandes semelhanças.

Histórico

1590: Invenção dos microscópios pelos holandeses Francis e Zacarias Janssen, fabricantes de óculos. Seu microscópio aumentava a imagem de 10 a 30 vezes e foi usado pela primeira vez para observar pulgas e insetos.

1665: Robert Hooke, em seu trabalho Micrografia, relatou pequenas cavidades (“cells”) em cortes de cortiça, de onde se originou o termo célula.

1674: Leeuwenhoek observou diversas estruturas unicelulares: espermatozóides de peixes, hemácias. Um dos maiores colecionadores de lentes da época foi o primeiro a observar os micróbios.

1831: Robert Bown pesquisando células de orquídeas descreveu o núcleo celular.

1838 - 1839: Schwann emitiram a Teoria Celular: “Todos os seres vivos (animais e vegetais) são formados por células”.

Tamanho e forma das células

As dimensões das células variam de espécie, contudo a maioria tem tamanho inferior ao do poder de resolução do olho humano. Em geral, as células oscilam entre 0,1 micron e 1 mm.

As células podem ser:

- Microscópicas: a absoluta maioria
- Macroscópicas: Alga Nitella, fibras de algodão, células de urtiga, fibras de linho. Os exemplos são pouco numerosos. A forma é muito variada.

Leis celulares

Lei da constância do volume celular ou lei de Driesch:

“ O volume é constante para todas as células de um mesmo tecido, em todos os indivíduos da mesma espécie e mesmo grau de desenvolvimento (ou seja, mesma idade)”.

De acordo com essa lei, o volume celular independe do tamanho do indivíduo. De fato, analisando-se células hepáticas de um anão e de um gigante, pode-se verificar que , nos dois casos, o volume das células é o mesmo. Isso significa que a diferença no tamanho dos órgãos deve-se ao número de células que, no gigante, é muito maior. A lei de Driesch não se aplica as chamadas células permanentes.

Classificação de Bizzozero

Conforme a sua duração no organismo, as células podem ser classificadas em:

Células lábeis: células dotadas de ciclo vital curto. Continuamente produzidas pelo organismo, permitem o crescimento e a renovação constante dos tecidos onde ocorrem. Exemplos: glóbulos brancos (leucócitos), glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e células epiteliais (revestimento).

Células estáveis: células dotadas de ciclo vital médio ou longo, podendo durar meses ou anos. Produzidas durante o período de crescimento do organismo essas células só voltam a ser formadas em condições excepcionais, como na regeneração de tecidos (uma fratura óssea, por exemplo). Dentre as células estáveis, podemos citar: osteócitos (ósseas adultas), hepatócitos (células do fígado), células pancreáticas, muscular lisa, etc.

Células permanentes: células de ciclo vital muito longo, coincidindo, geralmente, com o tempo de vida do indivíduo. São produzidas apenas durante o período embrionário. Na eventual morte dessas células, não há reposição, uma vez que o indivíduo nasce com o número completo e necessário de suas células permanentes. Essas células simplesmente aumentam de volume (exceção à lei de Driesch), acompanhando o crescimento do indivíduo. Como permanentes, podemos citar as células nervosas (neurônios) e as células musculares estriadas.

Observação de células

Os instrumentos que permitem uma visualização da célula são ditos microscópicos.

- In vivo: Observação de células em seu estado natural.
- Supravital: observação da célula após tratamento com substâncias químicas que não decomponham as células, deixando-as vivas.
- Post-mortem: observação de células fixadas, isto é, substâncias que provocam a morte da célula, sem perda de sua arquitetura normal.

Geralmente após fixadas as células são coradas

- Corantes: Substâncias portadoras de grupos químicos coloridos, utilizados somente em microscopia óptica, que identificam determinada estrutura celular.

Principais corantes

- DNA – Feulgen
- Verde Janus Beta – mitocôndrias
- Hematoxilina – centríolos, retículo endoplasmático
- Sais de Ag⁺, Os, U – complexo de Golgi

- Reativo de Schiff – polissacarídeos (técnica de PAS)
- Sudam III – gorduras

Vírus

Não são células, mas dependem delas para sua multiplicação. São formados por apenas um dos ácidos nucléicos (DNA ou RNA). Quando fora de organismos possuem a forma de cristais (matéria bruta).

Células procariontes

Não possuem envoltório nuclear nem sistema de endomembranas.

Células Eucariontes

Possuem carioteca e sistema de endomembranas.

Bactérias

São unicelulares e heterótrofos. Alguns são importantes no ciclo do nitrogênio e outros são agentes patogênicos.

Estruturas celulares:

Membrana Plasmática - É visível somente ao microscópio eletrônico. Em cortes extremamente finos, apresenta uma estrutura tríplice, sendo constituída por duas faixas densas, cada qual com aproximadamente 20 Angstroms de espessura, e uma faixa central clara com 35 Angstroms de espessura. Elástica e lipoprotéica, atua selecionando as substâncias que entram ou saem da célula (permeabilidade seletiva), de acordo com suas necessidades. A membrana celular também reveste estruturas celulares: carioteca, lisossomos, complexo de Golgi, cloroplasto, mitocôndria, retículo endoplasmático; que são formadas por membranas idênticas à membrana plasmática.

Parede celular - Ocorre na célula vegetal e é um reforço externo, formado geralmente por celulose. Nos fungos a parede celular é formada de quitina.

Efeitos da osmose em células animais e vegetais

Glóbulos vermelhos colocados em solução de baixa concentração (hipotônica) ganham água e acabam por romper a membrana plasmática (hemólise). Se colocada em solução hipertônica, perde água por osmose e murcha, ficando com a superfície enrugada ou crenada: o fenômeno é chamado crenação.

As células vegetais, quando imersas em soluções fortemente hipertônicas, perdem tanta água que a membrana plasmática se afasta da parede celular, acompanhando a redução do volume interno. Esse fenômeno é denominado plasmólise e as células nesse estado são chamadas de plasmolisadas. Se for mergulhada a célula em meio hipotônico, ela volta a absorver água, recuperando assim, a turgescência, fenômeno denominado desplasmólise. A existência da parede celular geralmente impede o rompimento da membrana plasmática da célula.

Hialoplasma ou citoplasma fundamental - É um material viscoso, amorfo, no qual estão mergulhados os orgânulos. Quimicamente, o hialoplasma é constituído por água e moléculas de proteína, formando um colóide. Em observações ao microscópio eletrônico, o hialoplasma é um meio heterogêneo que apresenta filamentos, estruturas granulares e microtúbulos. Sendo um colóide, a consistência do hialoplasma pode variar, passando de gel ou bastante denso a muito fluido ou sol.

Movimento Browniano

Micelas são as partículas coloidais em dimensões entre 0,1 e 0,001 μ m de diâmetro. Devido a choques com moléculas de água e à própria repulsão provocada por cargas elétricas idênticas, adquirem movimento desordenado, dando estabilidade ao colóide onde estão contidas.

Ciclose

A ciclose é um movimento do hialoplasma, de maneira a formar uma corrente que carrega os diversos orgânulos e a distribuir substâncias ao longo do citoplasma. Nesse movimento, são arrastados os cloroplastos para um local de maior intensidade luminosa da célula. A ciclose pode ser bem observada no endoplasma de muitas células vegetais.

Efeito Tyndall

Fazendo-se passar um feixe de luz através do hialoplasma, com a ajuda do microscópio eletrônico, pode-se observar um desvio dos raios de luz (difração), devido ao batimento dos raios nas partículas de micelas que apresentam movimento desordenado.

Cílios e Flagelos

São estruturas móveis encontradas tanto em unicelulares como em organismos mais complexos. Os cílios são geralmente curtos e numerosos; os flagelos, longos, existindo apenas um ou poucos em cada célula. Essas formações vibráteis têm um papel fundamental: permitir a locomoção da célula ou do organismo no meio líquido. Em função de sua origem em centríolos, tais orgânulos apresentam, em certa extensão do seu eixo central, nove conjuntos de trincas de microtúbulos protéicos. Mais adiante, ao longo de seu trajeto, apresenta nove conjuntos de duplos microtúbulos, como um par central.

Na base do cílio ou flagelo, encontra-se a organela que lhes dá origem, denominada corpo basal ou cinetossomo (antigo centríolo).

Imunohistoquímica básica

É necessário um conhecimento básico de alguns princípios de imunologia (antígeno, anticorpo) para compreensão mais adequada dos métodos de imunoperoxidase.

Em resumo imunohistoquímica é um conjunto de métodos de detecção de antígenos em cortes histológicos altamente dependente do processo de fixação.

- Estudo poderoso para detecção de estruturas bioquímicas e sequências ao nível celular.
- Localização de antígenos em células utilizando anticorpos específicos.
- O produto da reação é visível ao microscópio.

Reúne as seguintes disciplinas:

TMImunologia. Estuda o sistema imune, incluindo reação antígeno-anticorpo.

TMHistologia. Estuda células e tecidos.

TMQuímica. Estuda as reações químicas.

Importância da imunohistoquímica:

Na patologia a imunohistoquímica assume papel de fundamental importância.

As neoplasias são neoformações teciduais (benignas ou malignas) que apesar de se originarem em tecidos normais, muitas vezes perdem sua capacidade de diferenciação celular (no caso das malignas) tornando impossível um diagnóstico morfológico (baseado nas características de forma de lesão).

Daí a necessidade da imunohistoquímica para elucidar a origem tecidual e portanto o diagnóstico da lesão.

Processo de coloração de tecido utilizando anticorpo.

Utiliza a reação antígeno-anticorpo para localizar um antígeno.

-Antígeno

É uma substância estranha no organismo que estimula a formação de um anticorpo específico e que reagirá com este anticorpo específico.

O termo antígeno se dá a qualquer molécula que possa ser reconhecida pelos elementos do sistema imune adaptativo, quer dizer, células T, células B ou ambas.

Os antígenos são capazes de reagir especificamente com os anticorpos induzidos, possuem áreas restritas em sua molécula que determinam a especificidade, denominadas determinantes antigênicos ou epítomos,

Isto quer dizer que em uma mesma molécula de antígeno podem existir vários determinantes antigênicos e que, quando inoculada em um animal, provocará a produção de vários anticorpos com especificidade para cada um dos epítomos.

Para que uma molécula tenha a capacidade antigênica esta deve cumprir alguns requisitos:

TMTamanho da molécula. Em geral, a molécula deve ser maior que 10 kD. Para que uma molécula menor se torne antigênica, deve ser inoculada com moléculas adjuvantes ou formar complexos com proteína de seu hospedeiro.

TMPresença de grupos químicos ativos. Mesmo tendo um peso molecular adequado à capacidade antigênica das moléculas, dependem da presença de determinados radicais químicos ácidos ou básicos e grupos aromáticos como anéis benzênicos.

TMEstrutura conformacional do determinante antigênico. Nos antígenos protéicos é tão importante o tipo de aminoácido que formam a macromolécula como a sua disposição nela. As cadeias de polipeptídeos lineares são menos antigênicas que as cadeias ramificadas, levando-se em conta o mesmo peso molecular.

-Aplicação do anticorpo no tecido.

-Sob condições ideais a reação antígeno-anticorpo acontece rapidamente.

-Se o antígeno está comprometido o estado de equilíbrio pode demorar para se estabelecer.

-O objetivo é adquirir uma marcação forte sem coloração de fundo.

Métodos

Direto: Emprega um anticorpo primário já marcado com uma enzima.

Indireto: Já foi conduzido um anticorpo secundário.

ABC: Sistema indireto onde aumenta o sinal da reação.

Strepto Avidina e Biotina marcados (aplicação de anticorpo primário e secundário marcado com biotina).

Polímero marcado

Método Strepto Avidina Biotina (LSAB)

3 etapas (métodos) :

TMAplicação do anti primário

TMAplicação do anti secundário marcado com biotina

TMAplicação da Streptavidina marcada com uma molécula de enzima

A molécula de enzima pode ser peroxidase ou fosfatase alcalina.

Vantagens da Imuno

TMMorfologia preservada;

TMIdentifica uma única proteína;

TMAuxilia no diagnóstico;

TMPode ser considerada como outra coloração especial no arsenal diagnóstico.

Limitações:

Especificações do anticorpo

Geralmente não é um método quantitativo.

Método complexo, caro, trabalhoso.

Imaginação do histotécnico é o limite.

Histoquímica (utiliza corantes)

Identifica os componentes químicos das células e dos tecidos;

Utiliza corantes, tinturas que reagirão com o tecido e o produto final é visível.

Coloração por tingimento é uma reação química entre ácidos (eosina) e básicos (azul de toluidina)

Imunocitoquímica (proteínas)

Torna visível proteínas de interesse em preparação de tecido ou células mantendo seu contexto anatômico.

Uso de um anticorpo (proteína) para detectar um antígeno (proteína) determinada no tecido.

Deve ser estabelecido uma forma de ligação para formar um complexo estável entre a proteína e o anticorpo.

Imunocitoquímica, o que é necessário:

Bom anticorpo

Antígeno Condições químicas de fixação do tecido.

Preservar o antígeno na localização original, impedir sua destruição e preservar o acesso ao anticorpo.

Sistema de detecção do complexo antígeno-anticorpo.

Hibridização In Situ.

Histoquímica

Permite a detecção de moléculas de RNA ou DNA nas células de origem.

Ligação entre RNA/ DNA presente a uma “sonda” externa formando um híbrido.

Deve ser estabelecido uma ligação para formar um complexo estável.

Vantagens:

-Quantitativo

-Método mais avançado para entender biologia celular no contexto anatômico

-Pode detectar moléculas de RNA para célula.

Limitações:

-Método caro, trabalhoso.

-Requer conhecimento de biologia.

- Resumo do Impacto da fixação e processamento
- A forma do antígeno pode ser afetado pela fixação. Importante: tempo da fixação.

Fixação:

- Preservar a morfologia tal qual o estado natural
- Preservar antígenos e seus sítios antigênicos para o necessário reconhecimento.

A fixação é um dos aspectos mais críticos da coloração de imunohistoquímica, portanto, as seguintes condições devem ser observadas:

TMAs amostras do tecido não podem ficar completamente secas, e devem ser colocadas no fixador o mais rápido possível. Esfregaços celulares devem ser fixados o mais rapidamente possível a fim de garantir a preservação do antígeno.

TMPequenos blocos de tecido, de no máximo 2 cm de comprimento por 4 mm de espessura devem ser colocados em um mínimo de 200 mL de fixador. Pedacos maiores de tecido impedirão a penetração completa do fixador, o que resultará em uma coloração inespecífica.

TMApós a fixação, as amostras de tecido devem ser rigorosamente lavadas para eliminar excessos de fixador que possam causar artefatos de coloração.

O fixador mais prático e provavelmente o melhor para diversas finalidades é a formalina tamponada a 10 %, devido a sua característica de ligações cruzadas.

Temperatura

- Alta: aumenta a velocidade de fixação e também de decomposição

-Processamento

Após a fixação, as amostras de tecido devem ser desidratadas, limpas e inclusas de acordo os procedimentos de rotina de processamento. Para se obter os melhores resultados em imunohistoquímica, as amostras devem ser inclusas em parafina pura pois esta pode ser completamente e facilmente removida do tecido no momento da coloração. O plástico contido em alguns meios de inclusão é frequentemente de difícil remoção, e pode causar coloração inespecífica além da inibição da coloração específica. Visto que muitos

laboratórios utilizam rotineiramente meios de inclusão que contém plástico, certas precauções devem ser tomadas:

TM Se o meio de inclusão for aquecido a temperatura acima de 62 °C, os plásticos começarão a formar polímeros. Estes dificilmente serão removidos do tecido, e também podem causar danos à navalha. Consequentemente, banhos de parafina devem ser mantidos a uma temperatura máxima de 60 °C para impedir a polimerização.

TM Para auxiliar a remoção completa dos meios de inclusão, as lâminas devem ser colocadas em uma estufa a 60 °C durante 20 minutos antes da desparafinação. Para impedir a desnaturação do antígeno e danos a morfologia celular, a temperatura não deve ultrapassar 60 °C.

TMFixação do tecido

TMRecuperação antigênica

TMProcessamento e inclusão

TMBloqueio de ligações inespecíficos.

TMCorte e adesão do material.

TMAnticorpo primário (puro ou marcado)

TMDesparafinação

Anticorpos

É uma proteína sérica que é formada em resposta à exposição de um antígeno e reage especificamente com esse antígeno formando imunocomplexos quer no próprio organismo ou em condições laboratoriais.

Anticorpos pertencem a um grupo de proteínas conhecidas como imunoglobulinas (Ig). estão divididas em cinco classes: IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Cada imunoglobulina é composta por duas cadeias pesadas idênticas (H) e duas cadeias leves (L) idênticas (fig. 1). As cadeias pesadas diferem em antigenicidade e propriedades estruturais determinando, portanto, classe e subclasse das imunoglobulinas. As cadeias levessão do tipo Kappa ou Lambda. A maioria dos anticorpos empregados em imunohistoquímica pertence a classe IgG de imunoglobulina e apenas alguns são da classe IgM.

Os anticorpos são obtidos através da imunização de animais com antígenos específicos e podem ser classificados em poli e monoclonais.

Cada anticorpo possui sua própria estrutura

A imuno marca a proteína e a hibridização em sítio marca somente o RNA e o DNA.

Usualmente produzidos na classe IgG.

Mais abundante

Resposta imune tardia

Isótopos inclusos: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4.

CD15 é exceção, pois é produzido com classe IgM.

Imunoglobulina

Produzidos pelos linfócitos B em resposta a uma agressão.

IgG: é a maior e mais longa resposta do organismo

A resposta é encontrada no leite, na saliva, etc.

IgG expressa-se durante reações antigênicas.

Classes de Imunoglobulina

IgG: resposta imune secundário

IgA : encontrada nos componentes de secreção do leite, saliva. Secreção respiratória e intestinal

Anticorpos Policlonais. (de espécies diferentes de animais)

Antígeno sintético ou natural é infectado no coelho

Coelho produz anticorpos contra agente invasores

Linfócitos B são células que produzem os anticorpos IgG e IgM

Vantagens dos policlonais

Maior sensibilidade

Mais resistentes

Títulos altos

Limitações

Impurezas

Variações lote a lote
Reatividade de cruzado com outros
antígenos similares

Porque utilizamos os policlonais.
Alguns policlonais apresentam melhores colorações.

Como exemplo o anticorpo HER2 C-ERB2 (policlonal) cora apenas a membrana das células tumorais.

CB11 (monoclonal) cora membrana e citoplasma.

Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais são produzidos, IN VITRO, por clones de células plasmáticas importalizadas. Ao contrário dos policlonais reagem apenas com uma molécula (epitopo) presente no antígeno. podem ser produzidos em larga escala pois a célula imortalizada é normalmente expandida em meio de cultura.

Vantagens dos monoclonais:

- ™ Alta especificidades
- ™ Baixa reatividade cruzada.
- ™ Não há variação lote a lote.
- ™ Fornecimento ilimitado.
- ™ Alta reprodutibilidade lote a lote.
- ™ Altamente homogêneos

Limitações

- ™ Colorações menos intensas que com os policlonais
- ™ Alguns podem apresentar baixa afinidade por antígenos que sofreram fixação. (só em reatividade se for por congelação, se fixas ele não reconhece.).
- ™ Os epítomos alvos devem sobreviver após a fixação do tecido. Em alguns casos o antígeno pode ser identificado pelo uso de policlonais porém se o epítopo em questão não

resistiu à fixação o monoclonal não irá reagir. O mesmo vale para condições subótimas de fixação.

™O epítopo alvo deve ser único para um determinado antígeno. Uma das maiores vantagens do uso de anticorpos monoclonais, a especificidade, será perdida caso o mesmo epítopo esteja presente em diferentes antígenos. A reatividade cruzada de um anticorpo policlonal pode ser absorvida e evitada mas o mesmo não é possível para o monoclonal.

™Existem anticorpos para parafina e para congelação. CD 30 existe para os dois.

Pré tratamento e identificação de coloração de fundo. (Recuperação antigênica)

Atualmente a panela a vapor e o banho-maria são os meios mais efetivos e seguros para a realização e recuperação antigênica, uma vez que permite que o calor seja uniformemente distribuído por todo o tecido.

Há diferentes métodos de recuperação antigênica:

Digestão enzimática.

Após o corte hidratado, se utiliza a tripsina, proteinase K, etc.

Aquecimento por calor.

Microondas, panela a vapor, etc.

Digestão enzimática.

Vantagens:

Rápida, pode ser utilizada em automação

Limitações:

Alguns anticorpos não apresentam bons resultados.

Verifique o que diz a bula que acompanha o produto.

Microondas.:A vantagem que é rápido.

Limitações:

-Aquecimento não é homogêneo.

-Buracos frios (no microondas há áreas que não bate calor).

-Morfologia pode ser afetada.

Panela a vapor

Vantagens:

Protocolos padronizados.

Processamento de muitas lâminas simultaneamente.

Temperatura constante

Limitações:

Dificuldade para calibração.(Há um desgaste no termostato e há certa dificuldade em manter a temperatura exata pelo tempo indicado).

Banho – Maria

Vantagens:

Temperatura constante.

Resultados reprodutíveis.

Limitações:

Muito tempo para atingir a temperatura de equilíbrio.

Coloração de fundo

O que é verdadeiro e o que é falso

Imunoglobulinas Endógenas.

Pode ser reconhecida pela coloração inespecífica de vasos e células plasmáticas.

Desaparece quando o anticorpo secundário

Recuperação antigênica pode aumentar a coloração de fundo.

Colorações tricromicas

TMpH (1,5 - 3,0) aumenta a afinidade dos corantes ácidos pelo colágeno.

TMÉ importante observar a água destilada (melhor a água deionizada).

TMNa coloração quando for fixado na formaleína, chegando na água destilada deixar 1 hora no ácido pícrico solução saturado.

TMTodo o corante levado na estufa que se despreza não se usa mais.

TMNa hematoxilina (básica) sempre deixar um tempo maior em relação aos corantes ácidos.