



UAlg ESS

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Ciências Biomédicas Laboratoriais

Métodos Cito-Histoquímicos

Aula 5

2016/17

João Furtado

jffurtado@ualg.pt

Gab. 2.06 na ESSUAlg

Sumário

Tecido Conjuntivo

- Introdução

- Matriz extracelular

- Fibras de Colagénio

- Fibras Reticulares

- Fibras Elásticas

- Membrana Basal

Evidenciação Tecido Conjuntivo

- Orceína – Giemsa

- Gordon&Sweet

- Tricrómio Masson

- Van Gieson

Tecido Conjuntivo – Colagénio, Elastina e Reticulina

Colorações histoquímicas (especiais)

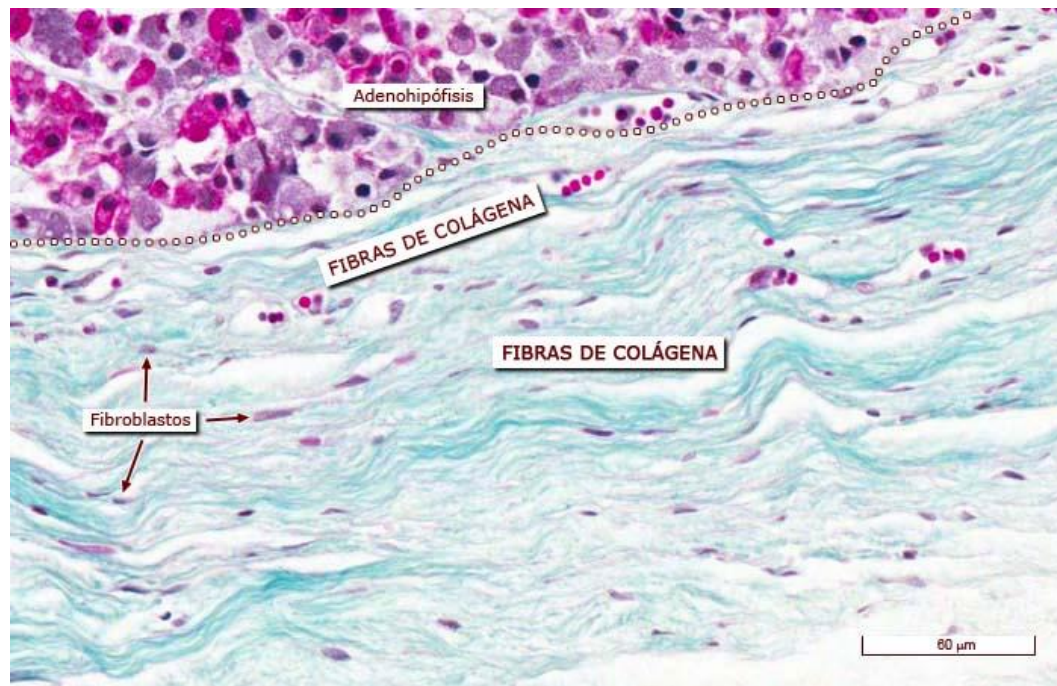
- ❑ Tecido conjuntivo é o conjunto de células que se organiza de modo a proporcionar suporte e manter íntegros os órgãos e outras estruturas do corpo humano
- ❑ Derivado da mesoderme consiste num conjunto de fibras de elastina e colagénio numa matriz de proteoglicanos
- ❑ Função: Fornecer força, elasticidade, conectar e suportar os tecidos
- ❑ Divide-se em tecido conjuntivo laxo, denso, cartilagem, tecido ósseo, sangue e linfa
- ❑ Composta por uma matriz extracelular que mantem as células unidas e também serve como um meio de trocas celulares

Matriz Extracelular

- ❑ Rede estrutural complexa não celular que rodeia e suporta as células do tecido conjuntivo
- ❑ Função: os vários componentes da matriz extracelular formam um sistema dinâmico e interativo que informa as células sobre as mudanças químicas e bioquímicas extracelulares
- ❑ **Substância fundamental:** ocupa o espaço entre as células e fibras do tecido conjuntivo. É viscosa, incolor e alto teor em água.
 - ❑ Constituída por proteoglicanos, glicoproteínas multiadesivas e glicosaminoglicanos
- ❑ **Componente fibrilar:** fibras de colagénio, reticulares e elásticas

Fibras de Colagénio

- ❑ Constituídas pela proteína colagénio
- ❑ Colagénio é sintetizado e secretado por células do tecido conjuntivo
- ❑ Proteína fibrosa que confere elasticidade aos tecidos
- ❑ Localizada na pele, ossos, tendões, cartilagem, vasos sanguíneos
- ❑ Apresentam um cor branca e em lâminas uma cor rosa (H&E – com o corante eosina)
- ❑ Vários tipos de colagénio foram caracterizados e descritos (**I, II, III, IV, V,**)



Tipos de Fibras de Colagénio

❑ Tipo I:

- ❑ 90% do colagénio total;
- ❑ Formam feixes e fibras muito resistentes.
- ❑ Encontrados nos tendões, ligamentos, derme, ossos, dentina, tecido conjuntivo laxo, entre outros.
- ❑ Sintetizado pelos fibroblastos, odontoblastos e osteoblastos.
- ❑ Coradas por corantes ácidos (eosina, picro-sirius)

❑ Tipo II:

- ❑ Encontrado na cartilagem hialina e elástica
- ❑ Formam fibrilas muito finas e produzido pelas células cartilaginosas
- ❑ Coram de vermelho (Sirius Red)

❑ Tipo III:

- ❑ Associado ao tipo I, é o que forma as fibras reticulares
- ❑ Sintetizado pelos fibroblastos e células reticulares

❑ Tipo IV:

- ❑ não forma fibras visíveis ao microscópio ótico
- ❑ Presente na lâmina basal do tecido epitelial
- ❑ Sintetizado por células epiteliais

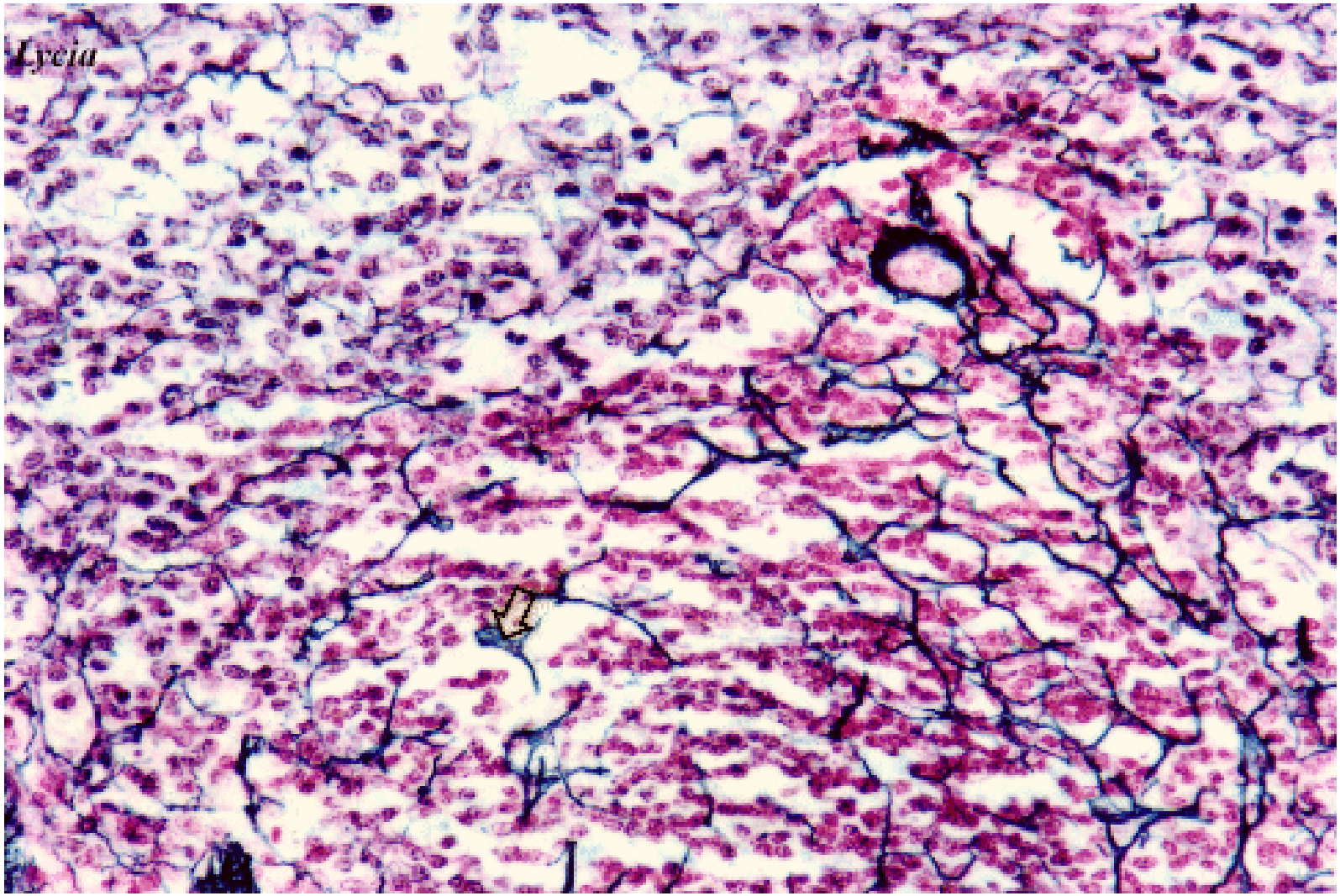
❑ Tipo V:

- ❑ Não forma fibras visíveis ao microscópio ótico
- ❑ Presente nas paredes dos vasos e artérias, assim como em várias membranas fetais
- ❑ Sintetizado por células do tecido conjuntivo, epiteliais e endoteliais

Fibras Reticulares

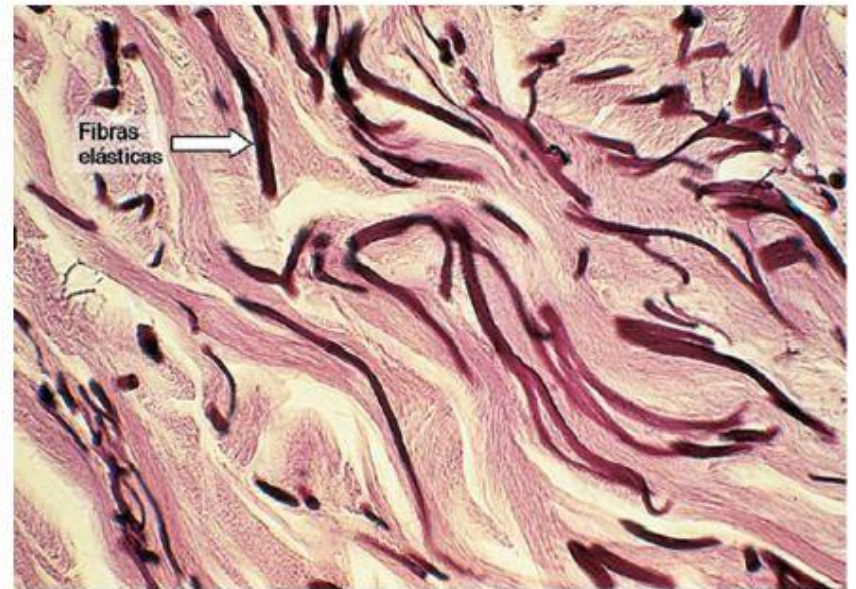
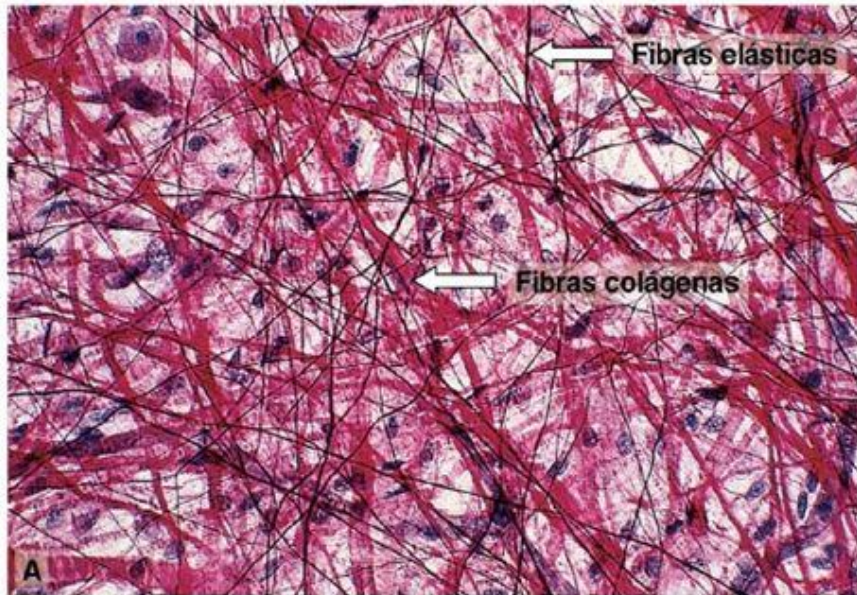
- ❑ Fornecem uma rede de suporte para os constituintes celulares de vários órgãos e tecidos
- ❑ Formam uma **rede delicada** nas células dos órgãos parenquimatosos (glândulas endócrinas) e criam uma **rede flexível** em órgãos sujeitos a mudanças fisiológicas de forma ou volume (baço, fígado, artérias)
- ❑ Abundantes no musculo liso, em órgãos hematopoiéticos (baço, rim, gânglio linfático e medula óssea vermelha)
- ❑ Compostas colagénio tipo III associado a glicoproteínas e proteoglicanos
- ❑ Visível quando coradas de preto por impregnação com sais de prata (Reticulina)
- ❑ São PAS+

Lycia



Fibras Elásticas

- ❑ Permitem responder ao estiramento e retração dos tecidos
- ❑ Coram com eosina, mas para uma melhor distinção destas fibras utiliza-se corantes especiais (Orceína, Van Gieson)
- ❑ Compostas por dois componentes estruturais:
 - ❑ Um núcleo central de elastina e um anel de microfibrilas
- ❑ Encontradas principalmente nas artérias elásticas, ligamentos vertebrais e na laringe



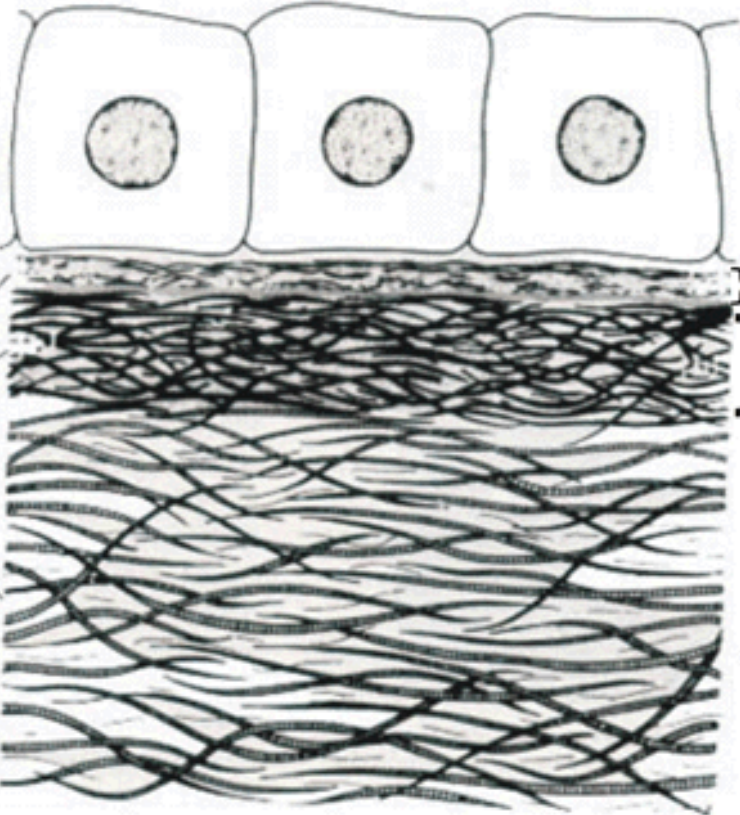
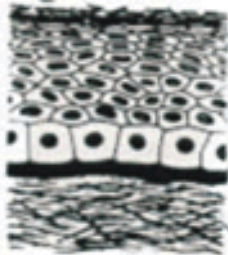
Fibras elásticas (escuras) e fibras colágenas (rosa claro) de derme da pele.
Fonte: Junqueira & Carneiro

Membrana Basal

- ❑ Função de fornecer um suporte elástico e servir de barreira filtrante
- ❑ Constituído vários tipos de proteínas, incluindo colagénio tipo IV e laminina
- ❑ Alterações na estrutura e função da membrana basal - patologias
- ❑ Difícil identificação na coloração H&E, mas dado possuir na sua constituição uma grande quantidade de hidratos carbono é PAS+

Microscopia eletrônica

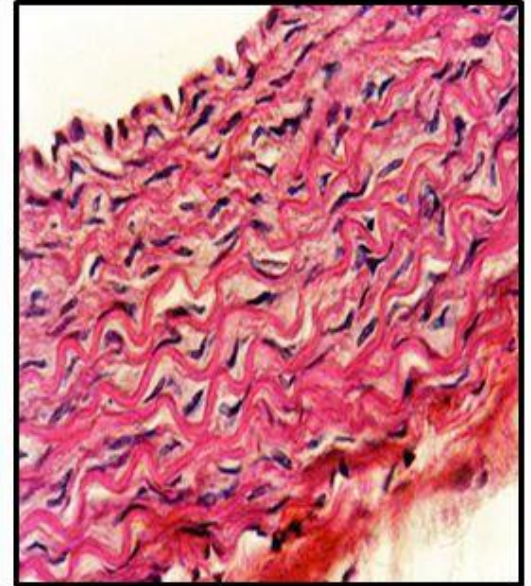
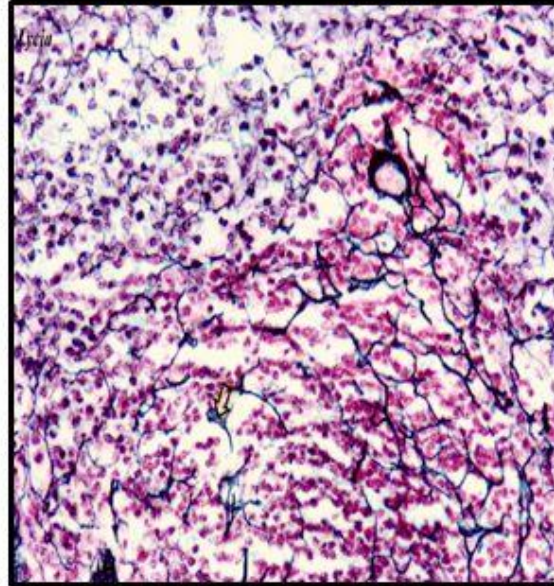
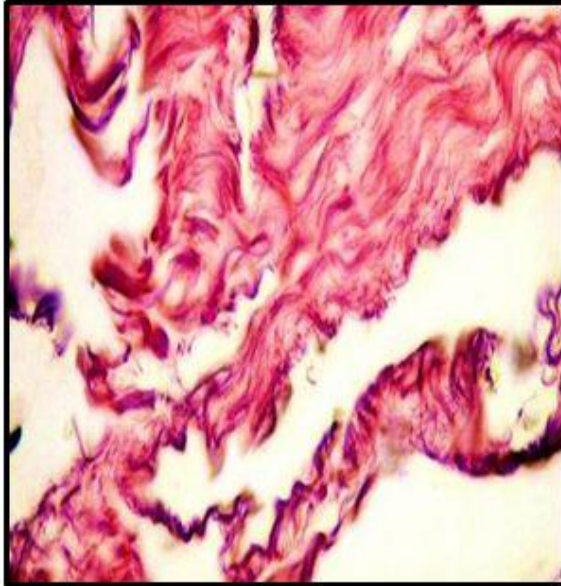
**Microscopia
óptica**



Lamina basal
Fibras reticulares } Membrana basal

Fibras Colágenas

Tipos de Fibras



Evidenciação do Tecido Conjuntivo

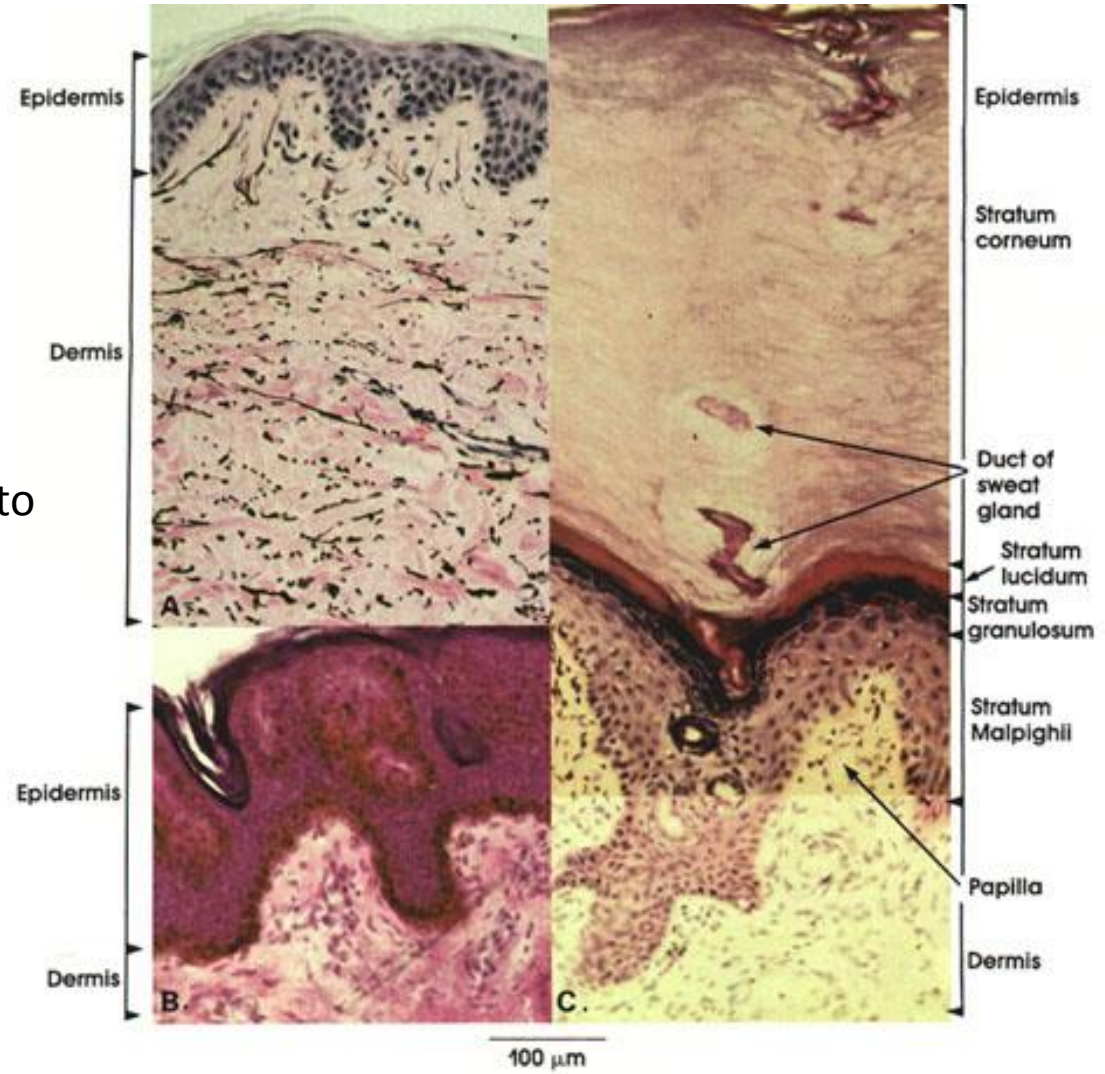
Orceína - Giemsa

- ❑ Demonstra vários componentes do tecido conjuntivo cutâneo, grânulos do epitélio cutâneo, mucinas
- ❑ Reage com os elementos sulfatados do tecido conjuntivo corando-o
- ❑ Para que a coloração das fibras de colagénio atinja a sua intensidade ideal é necessário sobrecorar os tecidos coma solução de Giemsa
- ❑ A coloração é diferenciada recorrendo ao uso de uma solução alcoólica

Protocolo Orceína - Giemsa

- Desparafinar os cortes e hidratar até ao álcool 70%
- Submergir a lâmina na solução de Orceína
- Lavagem em água corrente
- Corar na solução Giemsa ON
- Diferenciar com álcool a 95%
- Hidratar, diafanizar e montagem

Núcleos – azul escuro
Citoplasma – azul claro
Colagénio – rosado
Fibras elásticas – castanho escuro/preto



Gordon&Sweet

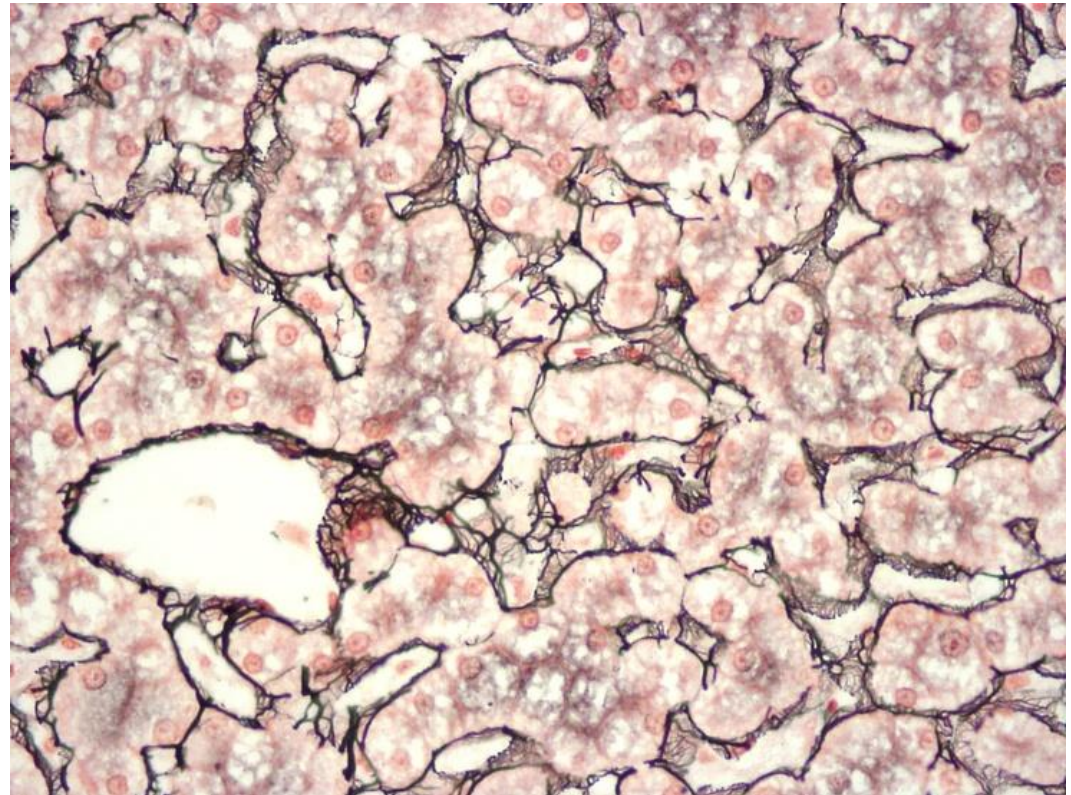
- ❑ As fibras são oxidadas com permanganato de potássio (adquirem maior afinidade com os sais de prata)
- ❑ Retira-se o excesso do oxidante com o ácido oxálico até branquear
- ❑ Aplica-se um mordente (alúmen de ferro) para preparar o tecido para a receção de sais de prata
- ❑ Aplica-se solução de cloreto de ouro (reduzida a ouro metálico promovendo a oxidação da prata metálica em iões de prata)
- ❑ Posteriormente aplica-se o tiosulfato de sódio → forma complexos de prata solúveis com prata iónica não reativa no tecido → removendo-a e reduzindo a marcação inespecífica da prata metálica
- ❑ Contrasta-se com vermelho neutro (corante nuclear – opcional)

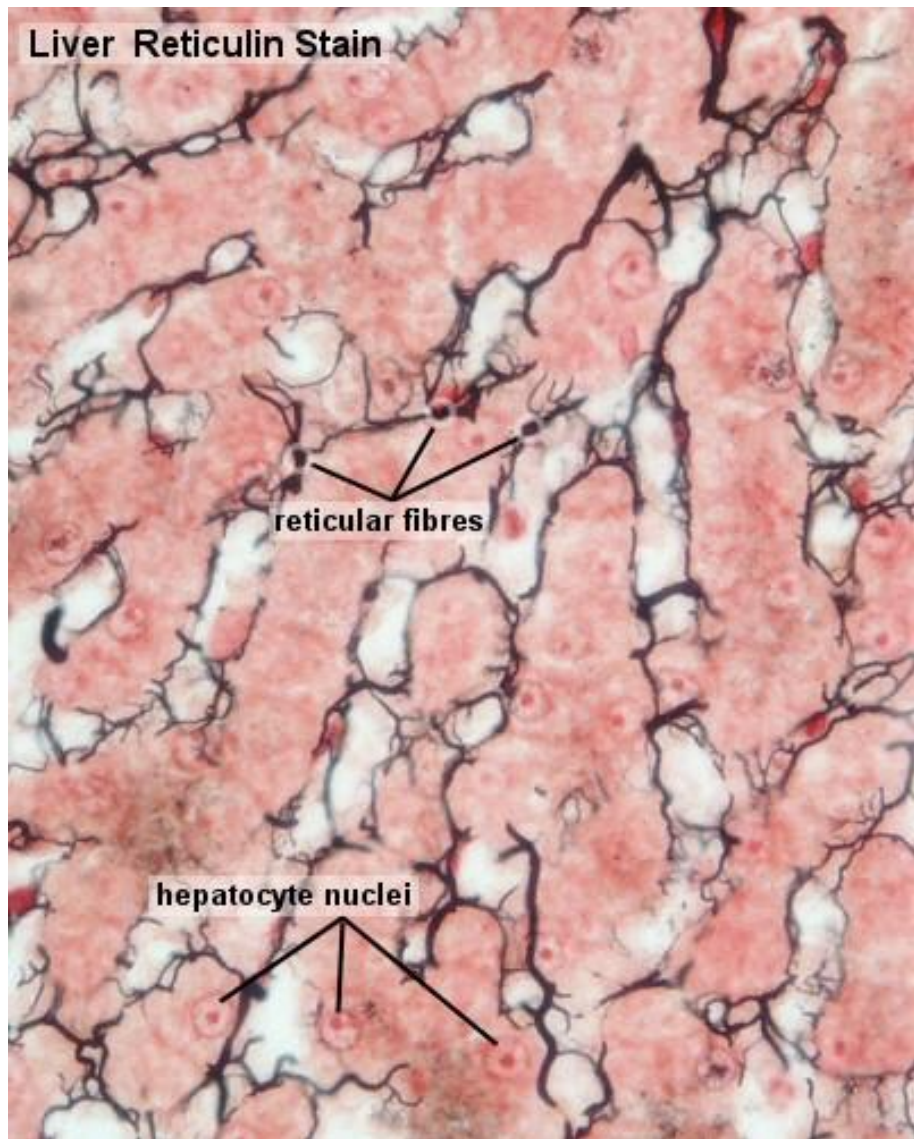
Protocolo Gordon&Sweet

- Desparafinar os cortes e hidratar
- Oxidar os cortes em permanganato de potássio
- Lavar em água destilada
- Descorar com ácido oxálico
- Lavar em água destilada
- Sensibilizar com alúmen férrico
- Impregnar com solução de prata amoniacal
- Lavagem rápida em água destilada
- Reduzir a prata com formalina
- Lavagem em água corrente
- Intensificar com cloreto de ouro
- Lavagem em água destilada
- Fixar com tiosulfato de sódio
- Lavagem em água corrente
- Contraste opcional com vermelho neutro
- Desidratar, diafanizar e montar

- ❑ Frequentemente utilizada para identificar tumores de origem mesodérmica, que produzem uma grande quantidade de reticulina (cirrose hepática, lesões renais)

Fibras Reticulares - Negro / Dourado
Núcleos - Vermelho (Opcional)



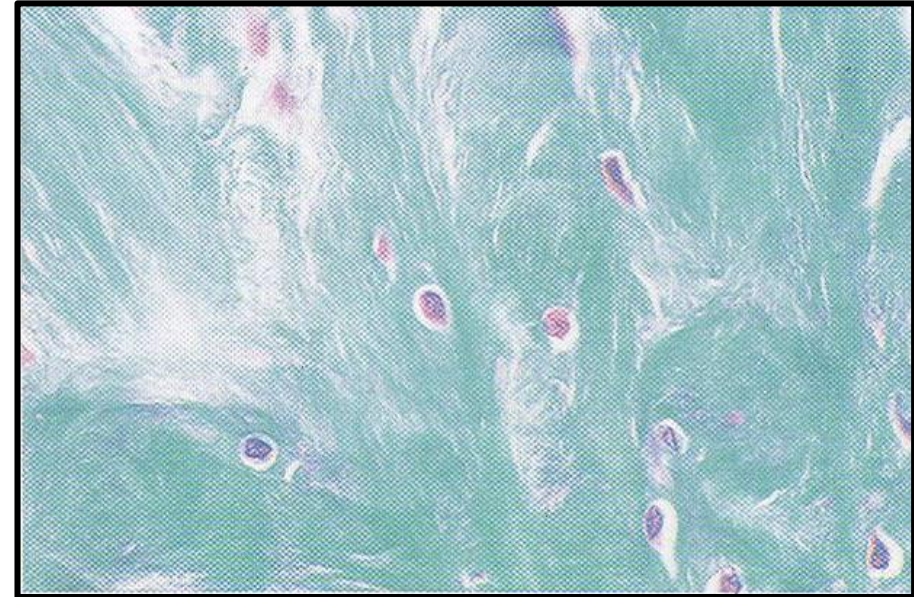
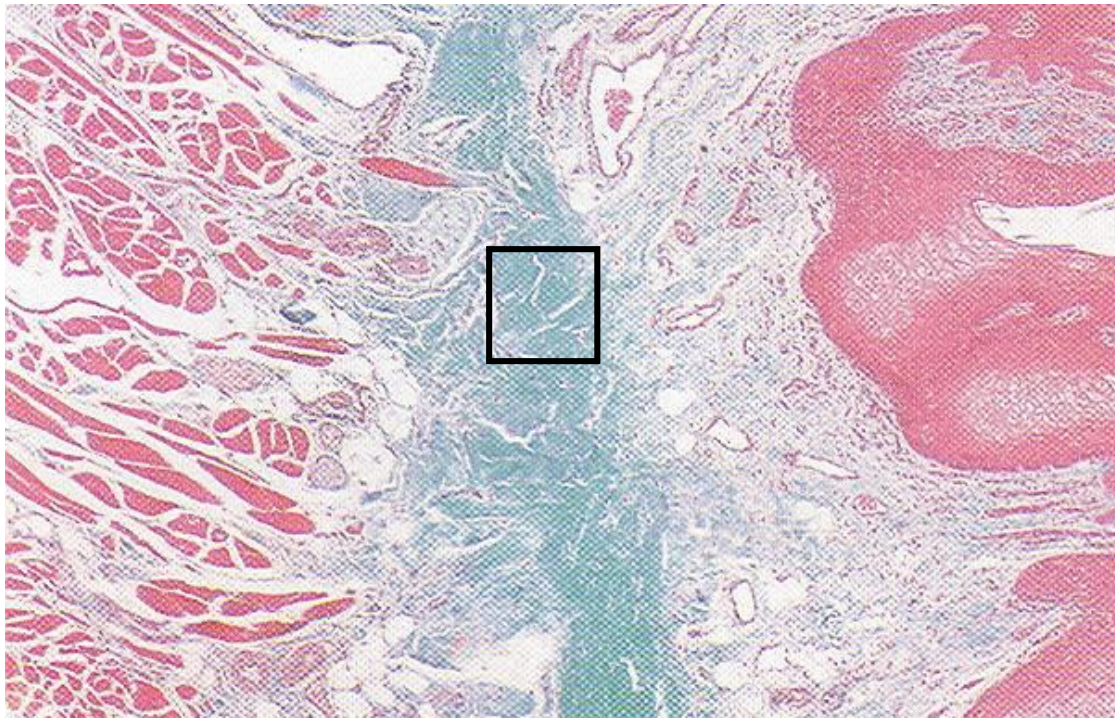


Tricrómio de Masson

- ❑ Dois corantes ácidos semelhantes que coram diferencialmente estruturas
- ❑ O 1º corante cora todas as estruturas do tecido → remove-se das estruturas não desejadas através de uma solução ácida (o que age como mordente)
- ❑ A 2º coloração é aplicada ao tecido recorrendo a um corante de elevado tamanho molecular
- ❑ Aplica-se hematoxilina férrica para conferir cor aos núcleos do tecido (mantendo-se resistente à descoloração por soluções ácidas)
- ❑ Distinção entre colagénio e musculo
- ❑ Identifica aumento do colagénio no tecido

Protocolo Tricrômio Masson

- Desparafinar os cortes e hidratar
- Sensibilizar com solução aquosa de cloreto de mercúrio
- Lavar em água corrente
- Remover o pigmento de mercúrio com solução de iodina
- Lavar rapidamente
- Descorar em tiosulfato de sódio
- Lavagem rápida
- Corar com hematoxilina verhoeff
- Diferenciar em álcool ácido
- Corar com fucsina
- Lavagem rápida
- Diferenciar em ácido fosfomolibdico
- Escorrer o ácido
- Corar com solução de verde luz
- Secar a lâmina
- Desidratar, diafanizar e montar



Núcleos – azul escuro/preto

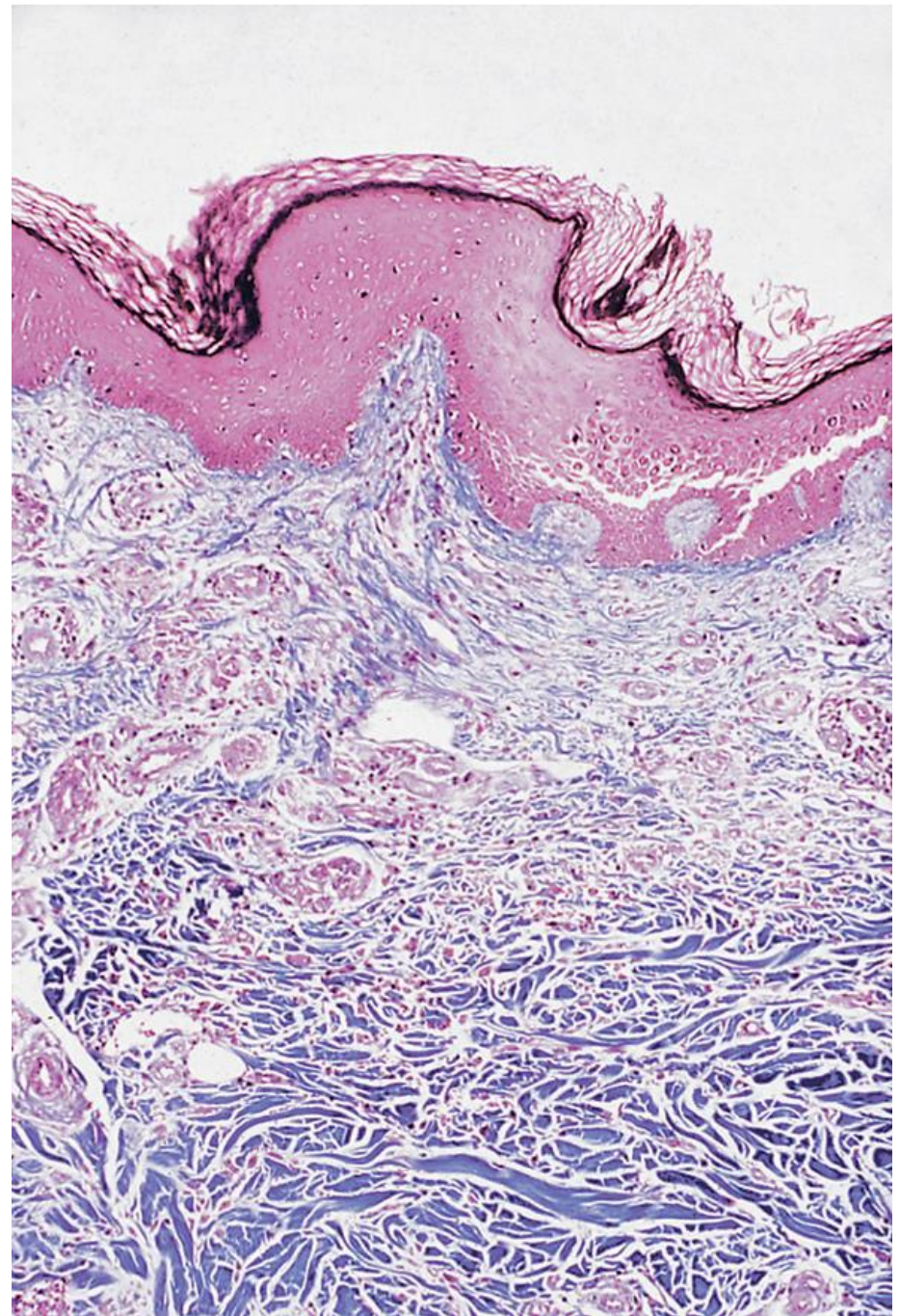
Citoplasma e Musculo - Vermelho

Colagénio, cartilagem – Verde azulado

Músculo
(rosa/vermelho)

Núcleos
(azul/negro)

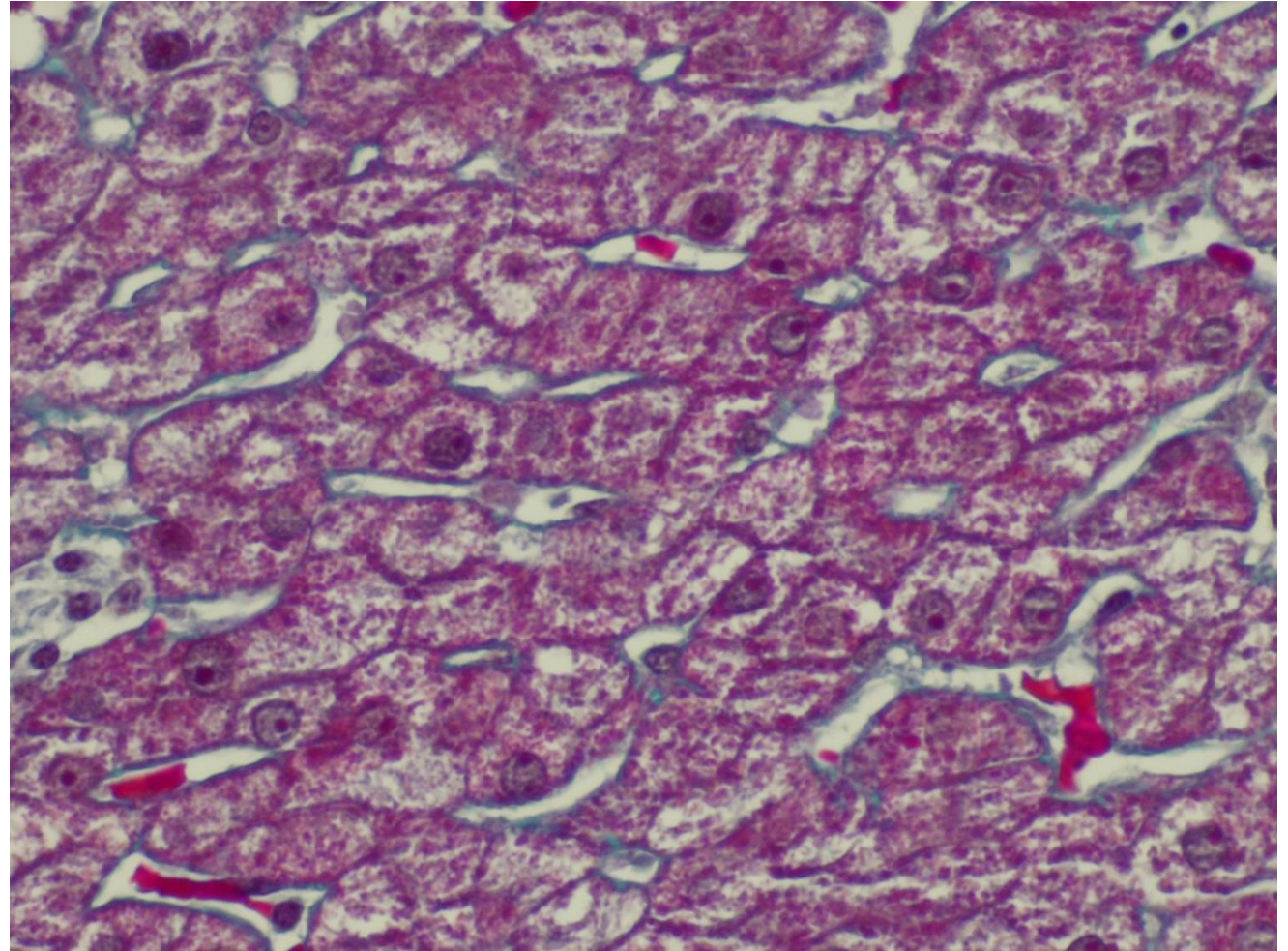
Colagénio
(azul)



Citoplasma e fibras
musculares
(rosa/vermelho)

Núcleos
(azul/negro)

Colagénio
(verde azulado)

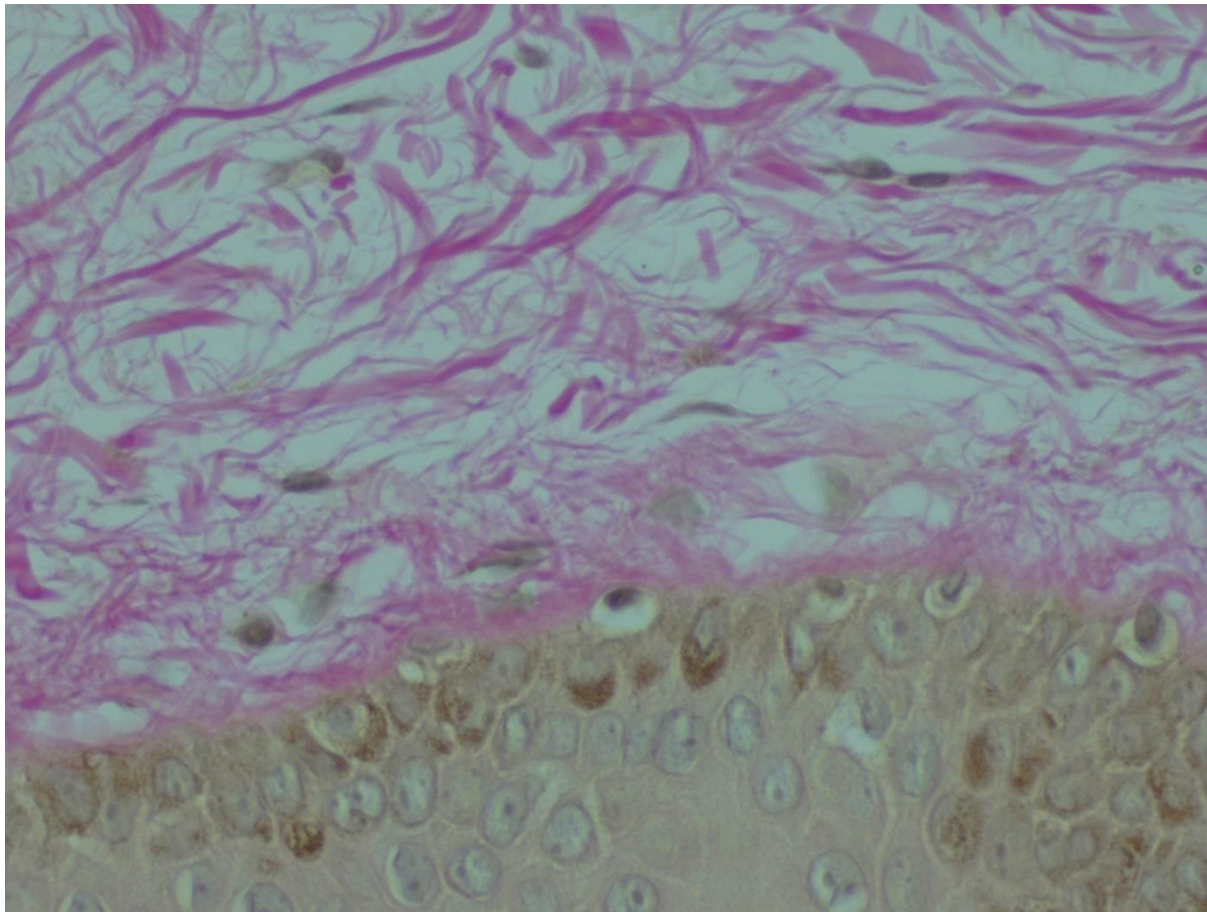


Van Gieson

- ❑ Coloração tricrômica: coloração nuclear (hematoxilina férrica), coloração citoplasmática (corante ácido – pícrico) e uma coloração seletiva de colagénio (fucsina ácida)
- ❑ A desidratação é efetuada com breve passagem em álcool a 95%, pois o Van Gieson é um corante alcoólico (não pode ser hidratado) pois poderá arrastar a coloração
- ❑ Os núcleos apresentam uma tonalidade negra, o colagénio vermelho e o citoplasma, musculo, fibrina e eritrócitos amarela
- ❑ Situação patológica: exibição distinta entre fibras de colagénio e fibras musculares em alterações fibróticas ou processos de fibrose (aumento de colagénio) – Ex: cirrose hepática

Protocolo Van Gieson

- Desparafinar os cortes e hidratar
- Corar com hematoxilina Weigert
- Lavar em água corrente
- Diferenciar em álcool ácido
- Lavar em água corrente
- Corar com Van Gieson
- Desidratar, diafanizar e montar



- ❑ Núcleos – azul escuro/ preto
- ❑ Colagénio – rosa/vermelho
- ❑ Citoplasma, musculo, fibrina e eritrócitos - amarelo