



# INTRODUÇÃO À HISTOQUÍMICA

Prof. Carina Ladeira

Fevereiro 2008



# HISTOQUÍMICA

- Técnica histoquímica que tem por objectivo a identificação da natureza química de constituintes celulares
- Consiste na coloração específica desses constituintes, recorrendo basicamente a substâncias que, reagindo com os componentes celulares, dão origem a produtos corados
- Esta técnica contrasta com a coloração histológica comum, na medida em que esta se baseia na absorção, pelas estruturas, de substâncias coradas (os corantes), enquanto que na histoquímica, as cores são propriedade de produtos que se formam *in situ*



# Conceitos gerais de coloração

- A necessidade de corar os tecidos surge porque os constituintes celulares e o material intracelular são habitualmente transparentes
- Distinguem-se por diferenças nos índices de refração



# CORANTE

- Substância cujas moléculas absorvem num determinado intervalo de comprimento de onda no espectro do visível, emitindo/reflectindo uma determinada cor



# Modificações de cor – c.d.o. Absorvidos e reflectidos

<b>Cor absorvida</b>	<b>c.d.o. (nm)</b>	<b>Cor reflectida</b>
Violeta	400-430	Verde-amarelo
Azul	430-490	Amarelo
Azul-verde	490-510	Laranja
Verde	510-570	Vermelho
Amarelo	570-600	Violeta – azul
Laranja	600-620	Azul-verde
Vermelho	620-750	Verde-azul



# Modificações de c.d.o.

- O c.d.o. absorvido por um determinado composto pode ser alterado por conjugação com outros elementos químicos:

- Se passar a absorver um c.d.o. + pequeno



Efeito hipsocrómico

- Se passar a absorver um c.d.o. maior



Efeito batocrómico



# CLASSIFICAÇÃO DE CORANTES

- Geral
- Origem
- Grupo Cromóforo
- Grupo Auxócromo
- Modo de transmissão da cor



# Classificação Geral

- Podem-se classificar em:
  - Genéricos
  - Específicos
  - Impregnações por metais pesados



# Classificação Geral Genéricos

- Utilizados quando se pretende visualizar a arquitectura geral do tecido
- Podem utilizar 1, 2 ou 3 corantes
- **Objectivo**: diferenciar núcleo e citoplasma e diferentes tipos de tecidos
- Exemplo: HE



# Classificação Geral Específicos

- Utilizados quando se pretende demonstrar especificamente em elemento constituinte do tecido, podendo ser úteis no auxílio do diagnóstico de algum tipo de patologia
- Ex.: técnicas histoquímicas que utilizam corantes



# Classificação Geral

## Impregnações por metais pesados

- Consiste na deposição de um metal
- Visualiza-se a estrutura por conversão do sal do metal na sua forma iônica
- Não se trata de uma coloração uma vez que não existe penetração de corante nas células, mas sim a deposição do metal na superfície celular



# Classificação quanto à origem

- Podem-se classificar em:
  - Naturais
  - Artificiais



# Classificação quanto à origem Naturais

- Escassos
- Obtêm-se a partir de plantas ou animais
- Ex.: Hematoxilina (*Haematoxylon campechianum*), Orceína (líquens), Carmim (Cochonilha), Anil/índigo (papilionácea anileira)



# Classificação quanto à origem Artificiais

- Sintetizados por processos químicos
- Provenientes de derivados do petróleo (benzeno)
  
- Maioria dos corantes: Azul de alcião, Verde Luz, Azul de anilina



# Suporte químico dos corantes

- A maior parte dos corantes naturais e a totalidade dos corantes artificiais possuem anéis aromáticos
- Ligações duplas não fixas permitem a reordenação e, conseqüentemente, a diversidade



# Suporte químico dos corantes

- Hidrocarbonetos aromáticos são originalmente incolores
- Absorção da radiação no espectro do visível
- Fixação das ligações duplas dentro do anel permite a absorção de radiação e demonstração de cor



# Suporte químico dos corantes

- Os corantes possuem um suporte químico fundamental:
  - Cromóforo
  - Cromogénio



# Suporte químico dos corantes

## Cromóforo

- Radicais químicos responsáveis pela modificação molecular a que se deve o aparecimento da cor



# Principais grupos cromóforos

Radicais:

- Etileno ( $< C = C <$ )
- Tiazólico ( $< C = S$ )
- Imino ( $< C = N$ )
- Azóico ( $- N = N -$ )
- Nitroso ( $- N = O$ )
- Nitro ( $- NO_2$ )



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes nitrados e nitrosados

- São nitro (- NO<sub>2</sub>) ou nitroderivados (- N = O) do benzeno ou naftaleno com alguns grupos hidroxilo, amino entre outros
- + conhecido: Ácido pícrico (2, 4, 6-Trinitrofenol)  
– obtido por nitração do fenol
- A presença dos 3 grupos nitro aumenta o carácter ácido do grupo fenólico



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes azóicos

- Cromóforo –  $N = N$  – ligado a anéis adjacentes derivados do benzeno
- No geral são corantes ácidos, mas também existem neutros e básicos
- Podem ser mono ou diazóicos



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados da antraquinona

- Obtidos a partir de oxidação do antraceno para constituir anéis quinónicos
- A quinona deveria ser considerada como 1 molécula rica em grupos cromóforos e está na base da cor de numerosos corantes



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados da acridina

- Contêm o grupo cromóforo  $< C = N$
- Corantes de natureza fluorescente



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados de iminas quinónicas

- Possuem 2 grupos cromóforos e em função destes classificam-se em:
- Derivados oxacínicos, tiacínicos e acínicos



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados do di e trifetilmetano

- Grupo cromóforo  $> C = NH$
- Os corantes deste grupo podem ser ácidos ou básicos dependendo dos grupos auxócromos ligados à molécula



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados do xanteno

- Cromóforos variáveis entre os quais se encontram a pironina, a rodamina e a sulfaftaleína



# Classificação dos corantes segundo o grupo cromóforo

## Corantes derivados das ftalocianinas

- Contêm 2 a 4 grupos de isotiourónio em torno de um átomo de cobre



# Suporte químico dos corantes

## Cromogénio

- Complexo formado pelo grupo cromóforo e pelo anel aromático
- Não é sinónimo de corante, pois apesar de possuir de cor por si só, não apresenta afinidade para a célula ou tecido
- Facilmente removido por processos mecânicos (ex.: lavagem)



# Suporte químico dos corantes

## Cromogénio

- A conversão de cromogénio em corante está relacionada com a adição de uma molécula aromática, de outros grupos atómicos, que confere a propriedade de dissociação electrolítica ou formar sais com os tecidos



# Suporte químico dos corantes

## Auxóchromo

- Potenciadores de cor
- Promovem a ligação do corante ao tecido através da formação de sais
- Possuem carga eléctrica, podem ter carácter ácido ou básico – corante com maior ou menor afinidade para a estrutura a corar



# Suporte químico dos corantes

## Auxócromo

- Radicais de grupos auxócromos de maior importância:
- Hidroxilo (-OH)
- Carboxilo (-COOH)
- Sulfidrilo (-SH)
- Amino (-NH<sub>2</sub>)
- Alguns íões metálicos derivados do Fe, Cr, Al, entre outros

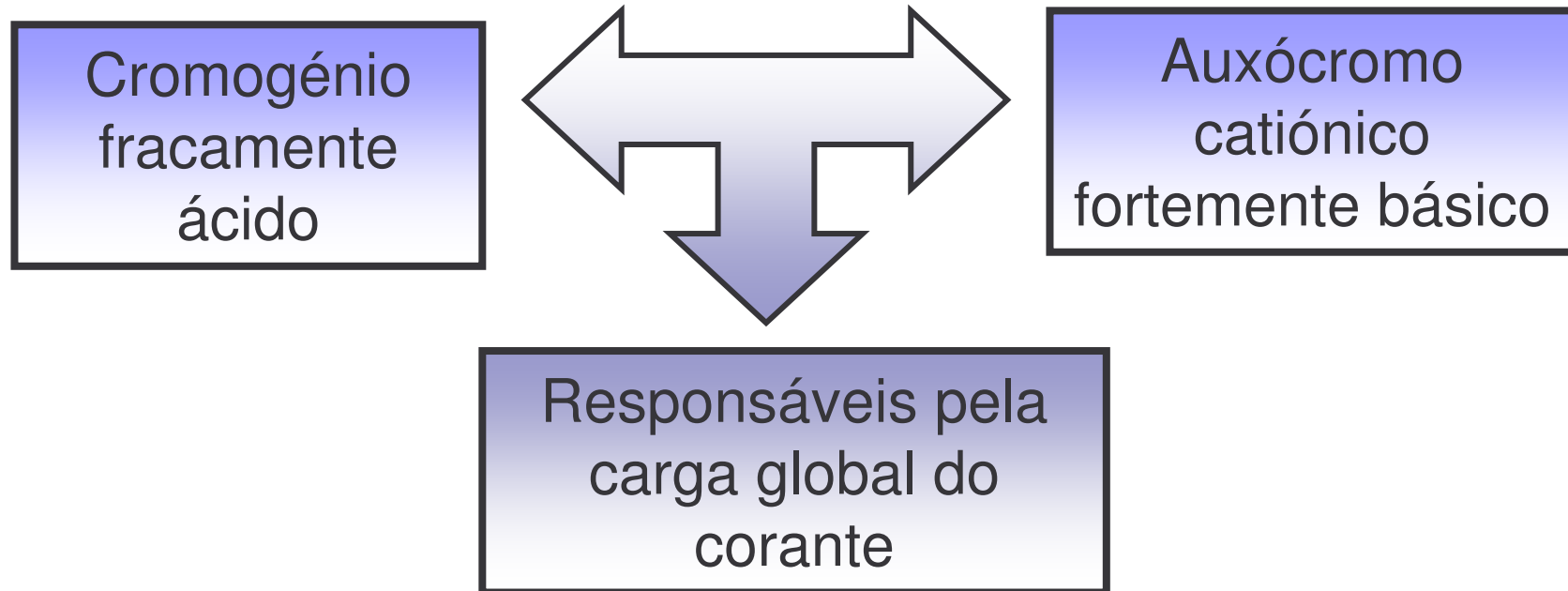


# Classificação dos corantes segundo grupo auxócrono

Podem-se classificar em:

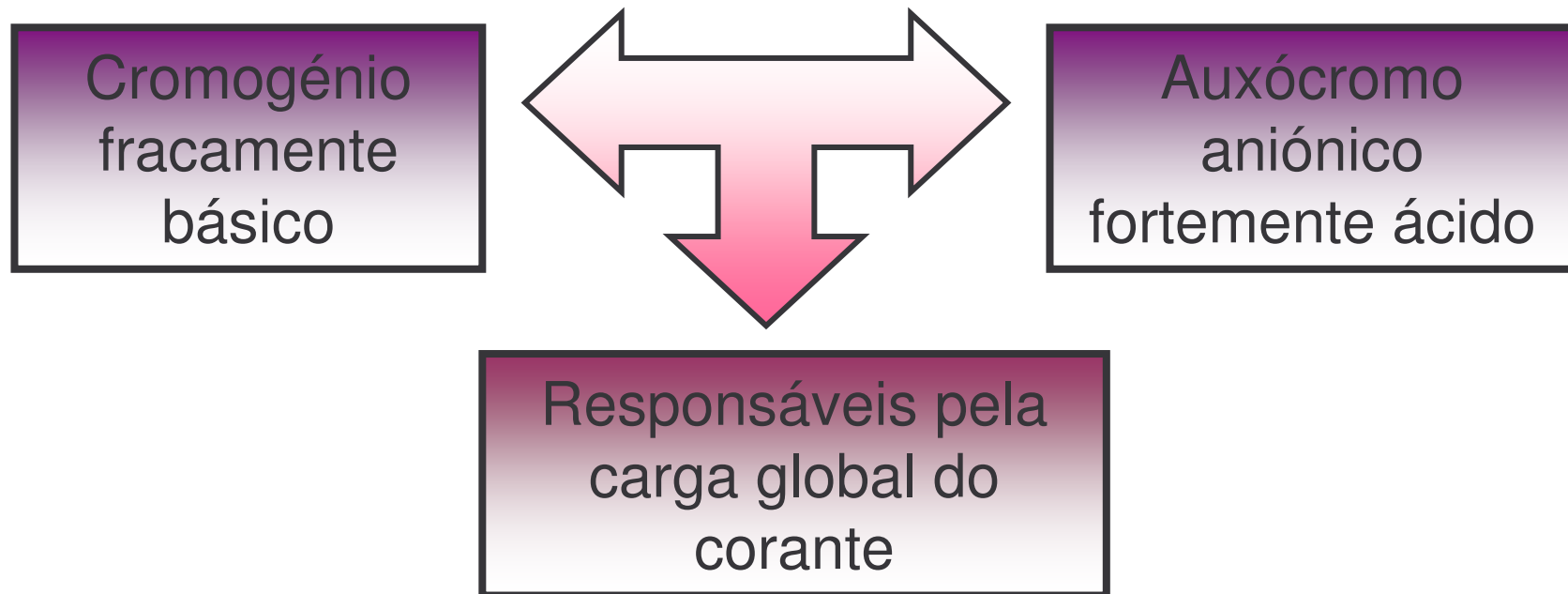
- Básicos
- Ácidos
- Neutros

# Corantes Básicos



- Utilizam-se para corar estruturas ácidas
- Ex.: Hematoxilina, Fucsina básica
- Comercializados sob a forma de sais de cloro, sulfato ou acetato

# Corantes Ácidos



- Utilizam-se para corar estruturas básicas
- Ex.: Eosina, Fucsina ácida
- Comercializados sob a forma de sais de sódio, potássio, cálcio ou amónio



# Corantes Neutros

- União de carácter salino entre corantes ácidos e básicos
- Formação de precipitado insólúvel em água e muito estável em solução alcoólica
- A carga global neutra conserva em parte a propriedade de corar, conjunta ou separadamente, diversas estruturas
- Tonalidade policromática
- Ex.: Giemsa



# Corantes Indiferentes

- Não possuem carácter ácido, básico ou salino definido, corando os tecidos por um mecanismo de impregnação física
- Ex.: Red Oil O, Sudan Black



# Classificação dos corantes quanto ao modo de transmissão de cor

Podem-se classificar em:

- Ortocromáticos
- Metacromáticos



# Corantes Ortocromáticos

- Transmitem ao tecido a sua própria cor
- Ex.: Hematoxilina, Eosina, Verde luz
- Soluções policromáticas são soluções que consistem na misturas de corantes

# Corantes Metacromáticos

- Transmitem ao tecido cor diferente da sua, por reacção química desencadeadora de efeito hipsocrómico ou batocrómico
- A metacromasia é desencadeada nos tecidos por estruturas específicas denominadas **cromotropos**

Substância amilóide  
Matriz cartilagínea  
Granulações de mastócitos



- Ex.: Azul de toluidina, Violeta de metilo, Safranina



# Nomenclatura dos corantes

Quase sempre descritiva e reflecte por ex.:

- A cor do produto (verde luz, azul de anilina)
- A sua utilização mais frequente (verde de lã)
- Um acontecimento particular (vermelho do Congo)
- Por vezes o nome do corante é seguido por várias letras e n<sup>o</sup>s que são colocados pelo fabricante para indicar ligeiras modificações nos reagentes (azul de alcião GX)



# Formas de ligação dos corantes aos componentes tecidulares

- Ligação iónica (+ frequente)
- Pontes de hidrogénio
- Ligação covalente
- Ligações por forças de Van der Waals
- Agregação de iões corantes entre si



# Para lembrar...

## **Ligações intramoleculares**

- Ligações iónicas
- Ligações covalentes

## **Ligações intermoleculares**

- Pontes de hidrogénio
- Ligações por forças de Van der Waals



# Para lembrar...

## **Ligações iónicas**

- Ligação química que consiste na atracção electrostática entre iões de carga diferente, resultantes da transferência de electrões entre átomos com electronegatividade muito diferente



# Para lembrar...

## **Ligações covalentes**

- Ligação química muito forte que ocorre entre 2 átomos com as mesmas tendências para ganhar ou perder electrões e que compartilham entre si electrões



# Para lembrar...

## **Pontes de hidrogénio**

- Atracção intermolecular relativamente forte, na qual átomos de H formam “ligações de ponte” entre átomos de elevada electronegatividade em moléculas adjacentes



# Para relembrar...

## **Ligações por forças de Van der Waals**

- Atracção intermolecular fraca resultante das flutuações momentâneas da nuvem electrónica de uma determinada molécula



# Classificação de Colorações

- Vitais – intravitais e supravitais
- Topográficas
- Citológicas
- Estruturais
- Histoquímicas



# Colorações Vitais

- Colorações efectuadas em células e tecidos vivos sem a utilização de fixadores
- Utilizadas para distinguir certas estruturas celulares com índice de refração idêntico



# Colorações vitais - intravital

- Baseia-se na injeção de um corante, no organismo vivo, que tende a fixar-se em estruturas específicas
- Pode ser captado por: sistema de depuração do organismo, estruturas teciduais



# Coloração intravital

## **Sistemas de depuração do organismo**

- O corante é reconhecido como uma substância a eliminar
- Evidenciação de células fagocitárias
- Evidenciação do aparelho urinário

## **Estruturas teciduais**

- Alguns corantes fixam-se em estruturas para as quais tem afinidade
- Ex.: Verde de Janus B (mitocôndrias)



# Coloração intravital

## **Outros corantes utilizados**

- Azul do tripano
- Tinta da China
- Não se identificam verdadeiras colorações porque na maior parte das vezes não existe ligação química específica entre corante e tecido
- O ser vivo ou tecido em estudo deverá ser posteriormente sacrificado para exame histológico



# Coloração vital - supravital

- Baseiam-se na coloração de células vivas, exteriores ao organismo, sendo o corante aplicado por imersão
- Ex.: Vermelho neutro, Verde de Janus B

## **Desvantagens:**

- Corantes tóxicos
- Preparações não definitivas
- Método de pesquisa e não de diagnóstico
- Exige um grande suporte teórico

# Exemplos de colorações vitais

Alizarina → Coloração do tecido ósseo

Azul do trípano } Demonstração de tecido linfático  
Azul do pynnol } (vascularização)  
Demonstração de histiócitos  
Estudo da excreção

Tinta de Indiana } Não são verdadeiros corantes  
Carmim de lítio }  
Carminato de amónio } Estudo de histiócitos

Azul de metileno }  
Azul de toluidina } Estudo de células nervosas




# Regras para a aplicação de colorações vitais

- Certos corantes podem ser administrados oralmente, como o azul do tripano



Resultados satisfatórios em apenas alguns invertebrados

- A toxicidade das soluções corantes implica a redução da dose administrada
- As soluções injectáveis tem de ser preparadas extemporaneamente
- Alguns casos requerem várias aplicações do corante com intervalos regulares
- O exame histológico posterior pode ser fresco ou fixado



# Diferenças entre colorações vitais e em tecidos fixados

- Nas colorações vitais o tempo de actuação do corante não pode ser controlado
- O excesso de corante não pode ser retirado por diferenciação
- Os corantes vitais tem de ser inócuos ao organismo vivo



# Colorações Topográficas

- Permitem uma visão geral da arquitectura de um tecido ou de uma lesão
- Incluem as colorações de rotina
  
- Ex.: HE



# Colorações Citológicas

- Permitem um estudo mais íntimo das estruturas celulares (grânulos secretórios, núcleos, entre outros...)
- Ex.: May-Grünwald Giemsa



# Colorações Estruturais

- Evidenciam estruturas tecidulares específicas
- Ex.: fibras elásticas (Verhoeff), fibras de colagénio (Van Gieson)



# Colorações Histoquímicas

- Colocam em evidência uma determinada estrutura química, com determinada função
- Ex.: glicogénio (Carmin de Best), ferro (Perls)



## Colorações quanto ao procedimento

- **Directas** – intervém apenas a afinidade do corante para as estruturas celulares
- **Indirectas** – é necessária a aplicação de um mordente (intermediário) para ligação do corante ao tecido



# Outra classificação das colorações

- Colorações progressivas
- Colorações regressivas



# Coloração Progressiva

- A coloração é “interrompida” no momento em que se obtém a cor desejada da estrutura celular a identificar
- Controlo feito ao M.O.C.
- O bloqueio é realizado por lavagem em água destilada (na maior partes das vezes)
- Somente aparece corada a estrutura para qual o corante tem afinidade



# Coloração Regressiva

- O corante é colocado em contacto com o tecido e permite-se que todos os elementos teciduais apareçam corados por excesso
- Seguidamente, procede-se a um processo de “descoloração” diferencial utilizando soluções específicas – os **diferenciadores**
- Diferenciação até que fiquem apenas coradas as estruturas mais específicas



# Factores que influenciam a coloração

## Químicos

- pH
- Fixação
- [ ] do corante
- Grau de pureza do corante

## Físicos

- Solubilidade do corantes nos tecidos
- Densidade das estruturas
- Permeabilidade das estruturas



# Fixação em Histoquímica

- Alguns autores defendem a utilização de fixadores específicos
- Utilização de formol 10% tamponado
- Melhor fixação, pois é eficaz e não há perda de substâncias nem derivações de pH



# Variação do tempo de coloração

## **Natureza da peça**

- Os tecidos com forte componente epitelial coram mais rapidamente que os tecidos fibrosos

## **Espessura dos cortes**

- Cortes mais grossos podem beneficiar de uma pequena sobrecoloração

## **“Amadurecimento” das soluções**

- Algumas soluções só adquirem propriedades tinturiais após algum tempo de exposição ao ar e à luz enquanto que outras possuem curtos prazos de validade (extemporâneas)



# O papel do Técnico de AP nas técnicas histoquímicas

- As técnicas de Histoquímica exigem dedicação, controlo rigoroso e execução competente por partes dos seus principais responsáveis – os Técnicos de Anatomia Patológica

## **São necessárias:**

- Pesagens rigorosas executadas em balança de precisão
- Preparação meticulosa de soluções
- Adopção de protocolos adequados
- Prática
- Destreza técnica (uniformidade de condições)
- Interesse (capacidade para evoluir e inovar)



# RESUMO

- Conceitos gerais
- Classificação de corantes
- Cromóforo e Auxócromo
- Ortocromasia e Metacromasia
- Formas de ligação do corante ao tecido
- Classificação das colorações
- Factores que influenciam a coloração



ERROR: syntaxerror  
OFFENDING COMMAND: --nostringval--

STACK:

```
( 1. Introdução à Histoquímica.ppt)
/Title
()
/Subject
(D:20080228103406)
/ModDate
()
/Keywords
(PDFCreator Version 0.8.0)
/Creator
(D:20080228103406)
/CreationDate
(caladeira)
/Author
-mark-
```