



HIDRATOS DE CARBONO

Prof. Carina Ladeira

Março de 2008



Hidratos de Carbono - Generalidades

- Componentes distribuídos de forma generalizada em animais e plantas
- Também designados de açúcares

- Classificação bioquímica
- Classificação histoquímica



Hidratos de Carbono – Classificação bioquímica

- Monossacarídeos
- Dissacarídeos – por hidrólise originam 2 moléculas iguais ou diferentes de monossacarídeos



Hidratos de Carbono – Classificação bioquímica

- **Polissacarídeos** – por hidrólise originam + de 2 moléculas de monossacarídeos

Subdividem-se em:

- **Homoglicanos** – tipo único de produto de hidrólise
- **Heteroglicanos** – mistura de substâncias como resultado de hidrólise



Hidratos de Carbono – Classificação histoquímica

- A classificação dos hidratos de carbono é complexa e algo controversa, fundamentalmente devido ao facto de poderem surgir habitualmente associados a proteínas e/ou lípidos



Hidratos de Carbono – Classificação histoquímica

- Polissacarídeos – Glicogénio
- Mucossubstâncias neutras
- Mucossubstâncias ácidas (sulfatadas e não sulfatadas)
- Mucoproteínas (gradiente HC > 4%)
- Glicoproteínas (gradiente HC < 4%)
- Mucolípidos



Classificação histoquímica

Glicogénio

- Polissacarídeo simples constituído por 2 tipos de cadeias de glucose: lioglicogénio (solúvel em H₂O) e o desmogliogénio (insolúvel em H₂O e forma ligações com proteínas)
- Intracitoplasmático: músc. cardíaco e esquelético, fígado, folículos pilosos, retina, epitélio vaginal, componente secretora do endométrio, megacariócitos e leucócitos



Classificação histoquímica

Mucossubstâncias

- Mucinas
- Consistência gelatinosa do tecido conjuntivo deriva da presença de glicosaminoglicanos

Classificação histoquímica

Mucossubstâncias neutras

- Mucinas epiteliais



Moléculas proteicas acopladas a oligossacarídeos por ligação amino-açúcar

- Sem radical ácido reactivo e com grupos hexose livres
- Ex.: glicoproteínas com elevada % de manose
- Localização: mucosa gástrica, glândula prostática e nas células de Goblet



Classificação histoquímica

Mucossubstâncias ácidas

Podem ser:

- Sulfatadas
- Carboxiladas
- Sialomucinas sulfatadas

Mucossubstâncias ácidas Sulfatadas

Tecido conjuntivo

- Proteoglicanos (excepto o sulfato de queratan)
- Reagem a pH baixos (0,5) com corantes catiónicos
- PAS –
- Localização: pele, cartilagem, osso, endotélio dos vasos sanguíneos, cordão umbilical
- Ex.: sulfato – 4 – condroitina, sulfato – 6 – condroitina, sulfatos de condroitina A e C, sulfato de dermatan, sulfato de heparan, sulfato de queratan

Tecido epitelial

- Origem epitelial
- Reagem com corantes catiónicos
- PAS +
- Localização: glândulas serosas brônquicas

**FORTEMENTE
ÁCIDAS**



Mucossubstâncias ácidas Sulfatadas

Mucinas fracamente ácidas

- Origem epitelial
- Coram com corantes catiónico a pH 1,0
- Localização: células Goblet na mucosa do cólon

Mucossubstâncias ácidas Carboxiladas

Sialomucina N - acetil

- Origem epitelial
- Moléc. de ácido siálico reagem com corantes catiónicos a pH = ou abaixo a 2,0
- Ligação aos grupos carboxílicos
- Extracção pela enzima sialidase
- PAS +
- Reage com azul de alciano
- Localização: glândulas salivares e brônquicas

Sialomucina N- acetil– O-acetil

- Origem epitelial
- Sialomucinas resistentes à extracção por sialidase
- PAS –
- Reage com azul de alciano
- Localização: glândulas do cólon

Ácido hialurónico

- Origem no tecido conjuntivo
- Glicosaminoglicano
- PAS –
- Reage com azul de alciano a pH 2,5
- Localização: cordão umbilical



Mucossubstâncias ácidas

Sialomucinas sulfatadas

- Grupo controverso
- Reagem como mucinas sulfatadas e também são extraídas pela silidase
- Coram com corantes catiónicos a pH 1,0
- Localização: tumores prostáticos, sinovioma maligno e cólon de ovelha



Mucoproteínas

- Glicoproteínas típicas de secreções mucosas
- A molécula mucopolissacarídea é o grupo predominante, e a proteína corresponde apenas a uma pequena percentagem do peso total
- Proteínas conjugadas nas quais os mucopolissacarídeos são combinados com proteínas
- Úteis para avaliar a evolução da doença se é tipo necrótico ou inflamatório, em particular de processos reumáticos



Glicoproteínas

- **Glicoproteínas são compostos de proteínas simples combinadas com algum grupo de carboidrato**
- **As glicoproteínas são proteínas que formam o muco de tecidos e secreções**
- **Ex. de glicoproteínas: proteínas de humor vítreo, do líquido sinovial, fluido do cordão umbilical, certas proteínas bacterianas, proteína da mucina gástrica e outros sucos digestivos, globulinas do ovo, tiroglobulina, proteínas de cartilagem, hormona da urina de grávida, entre outros**



Mucolípidos

- Moléculas constituídas por uma parte mucopolissacarídea e por uma parte lipídica



Técnicas de evidencição

- Periodic Acid Schiff – PAS
- Carmin de Best
- Mucicarmin
- Alcian Blue - AB



Periodic Acid Schiff

- Shiff 1866, modificação por McManus em 1946
- Técnica que permite a evidenciação de várias estruturas, nomeadamente hidratos de carbono



PAS - Protocolo

1. Ácido periódico
2. Reagente Shiff
3. Lavagem sulfurosa (opcional)
4. Água corrente
5. Contraste



PAS - Princípio

1. **Reacção de Malaprade (1928)**

Oxidação dos cortes pelo Ácido periódico, obtendo-se como resultado do processo de oxidação grupos aldeídos por quebra das ligações C-C

2. Grupos aldeídos recentemente formados são detectados pelo Reagente Shiff, produzindo inicialmente uma reacção incolor

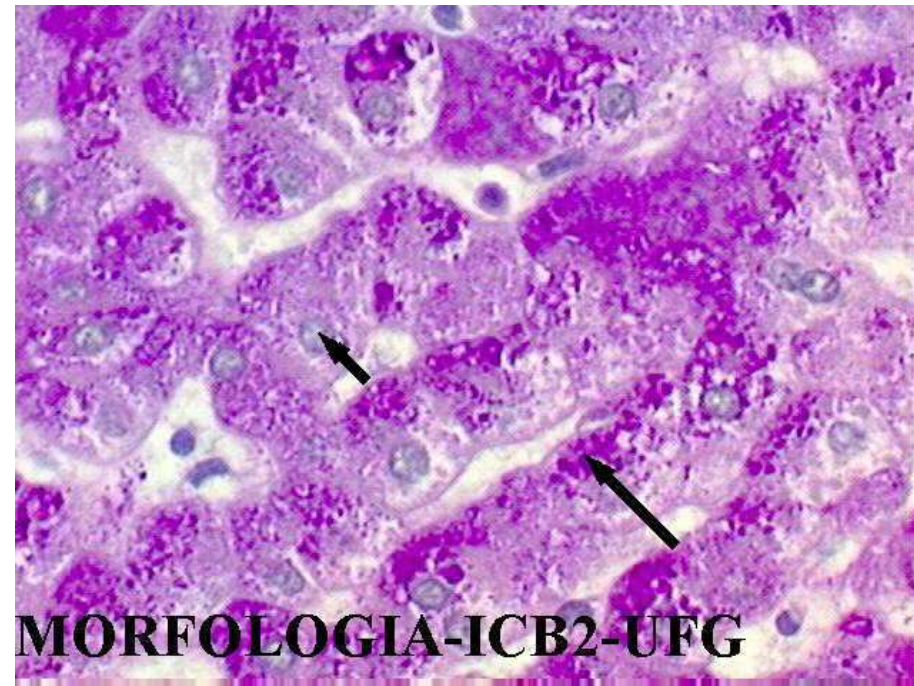
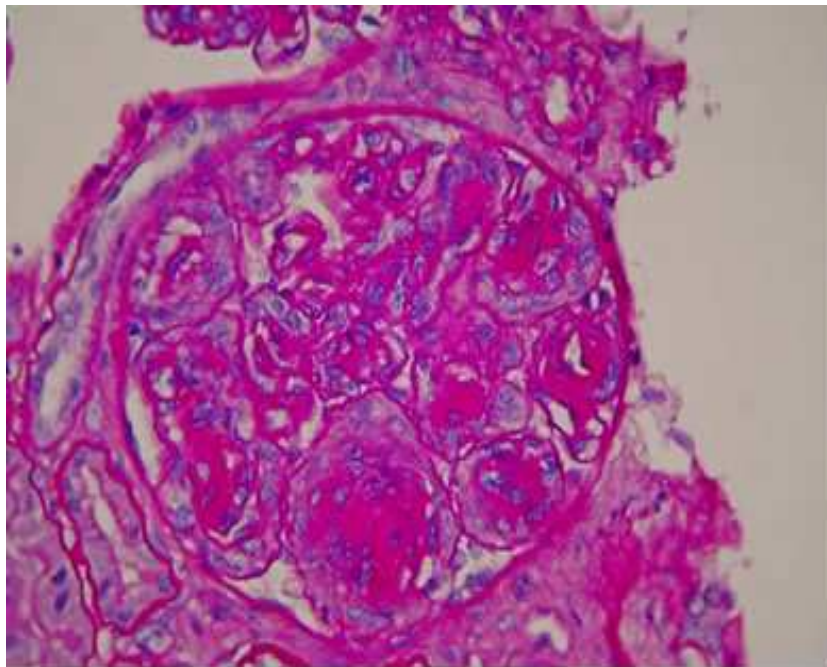


PAS - Princípio

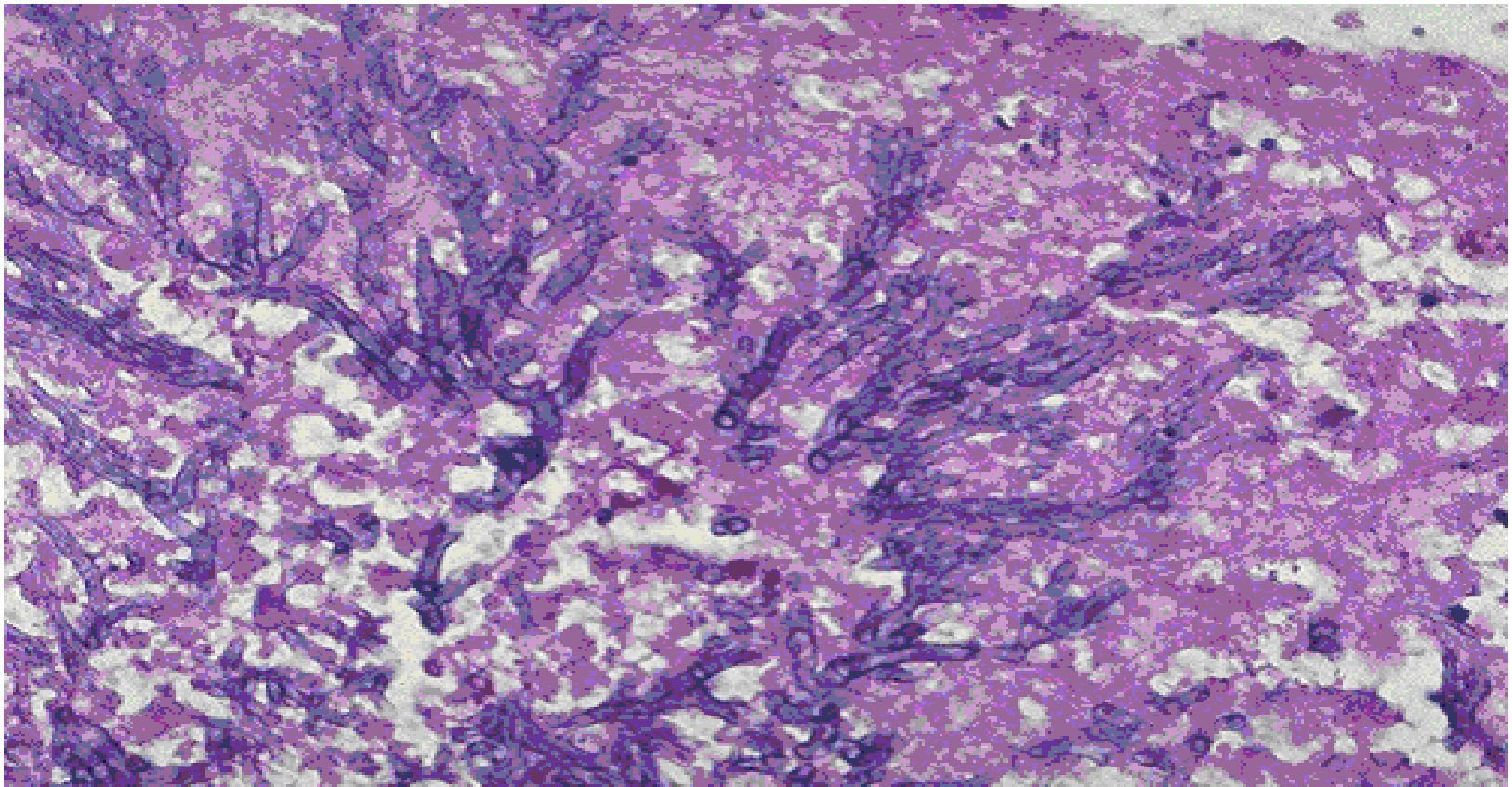
3. Restauro do grupo cromóforo ao fim de 5 a 10 min. – Cor **rosa**
4. Lavagem sulfurosa tem como objectivo a remoção do excesso de corante e evitar a falsa pigmentação resultante da oxidação por exposição ao ar do reagente Shiff
5. Passagem por água corrente a fim de intensificar a tonalidade magenta
6. Contraste com hematoxilina (Mayer ou Harris)

PAS - Resultados

- Substâncias PAS +: magenta, rosa púrpura
- Núcleos: azuis a roxo



PAS - Resultados



Pulmão com fungos



Substâncias PAS +

Membrana basal	Colagénio	Mielócitos
Quitina	Fibrina	Reticulina
Elastina	Lipofuscinas	Fibras tipo Z do músc.
Fungos	Megacariócitos	Corpos amiláceos
Mucinas neutras	Neutrófilos	Grânulos pancreáticos
Glicogénio	Sialomucinas (N-acetil)	Céls. Gástricas produtoras de muco
Corpos de Russel	Amilóide	<i>Mycobacterium avium intracellulare</i>
Grânulos de céls. Paneth	Cerebrosídeos	Celulose
Colóide	Fibrinóide	Plasmócitos



PAS - Aplicação diagnóstica

- Demonstração de substâncias PAS+ e glicolípidos (cerebrosídeos) em certos estadios de patologias
- Diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma secretor (PAS+) e carcinoma escamoso indiferenciado (PAS-)
- Demonstração de fungos
- Demonstração de mucossubstâncias neutras secretadas por céls. epiteliais de vários órgãos



PAS - Aplicação diagnóstica

- É importante identificar a presença de mucinas num infiltrado neoplásico numa área de tecido conjuntivo, pois isso pode identificar uma metástase de carcinoma
- Essa identificação é possível devido ao diferente tipo de intensidade que as mucinas adquirem (+ forte) em relação aos mucopolissacáridos, quando coradas pelo PAS



PAS – Diastase e Amilase

- No caso de se pretender identificar o glicogénio utiliza-se em simultâneo com a lâmina e estudar pelo PAS outra idêntica onde se executa o D-PAS
- Por comparação, procura-se as substâncias PAS+ e PAS- e que são grupos de glicogénio



PAS – Diastase e Amilase

- A diastase e a amilase actuam sobre o glicogénio despolimerizando-o, originando unidades + pequenas
- A digestão deverá ocorrer a cerca de 37°C durante 1H em meio pré-aquecido
- Utilização das enzimas de forma comercial ou saliva humana, antes do Ácido periódico



Carmin de Best

- Best 1906
- Técnica altamente selectiva para a demonstração de glicogénio



Carmin de Best - Protocolo

1. Hematoxilina de Harris
2. Lavagem em água corrente
3. Solução de trabalho de Carmin
4. Diferenciação
5. Passagem rápida em etanol 80%



Carmin de Best - Princípio

1. Coloração nuclear pela hematoxilina de Harris
2. Passagem em água corrente para diferenciar a coloração nuclear
3. Formação de ligações de hidrogénio entre grupos OH do glicogénio e H₂ da moléc. de carmin
4. Diferenciação por etanol 80%



Carmin de Best - Resultados

- Glicogénio – rosa a vermelho
- Núcleos – azuis a roxos



Carmin de Best - Aplicação diagnóstica

- O glicogénio pode ser demonstrado num n.º de lesões e é de diagnóstico importante em determinados tumores, tais como:
- Carcinoma da bexiga, rim, fígado, ovário, pâncreas e pulmão
- Sarcoma de Ewing's, rabdomiossarcoma
- Seminoma, mesotelioma



Mucicarmin

- Mayer, 1896 modificado por Southgate em 1927
- Técnica específica para evidenciação de mucinas



Mucicarmin - Protocolo

1. Hematoxilina de Weigert
2. Lavagem em água corrente
3. Solução de Mucicarmin
4. Lavagem em água destilada
5. Contraste com amarelo de metanilo
6. Lavagem com água destilada

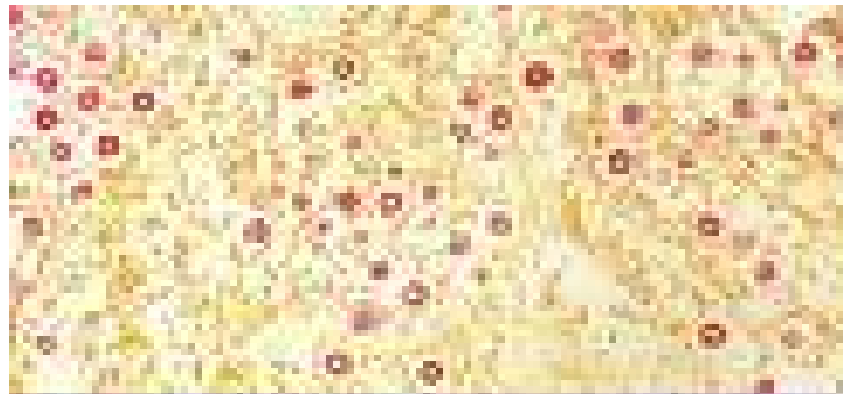


Mucicarmin - Princípio

1. Coloração nuclear pela hematoxilina de Weigert
2. Passagem em água corrente para diferenciar a coloração nuclear
3. Formação de um complexo carmin-mordente (sais de alumínio) com as mucinas carregadas negativamente
4. Maior rapidez se for colocada na estufa a 37°C com controlo microscópico

Mucicarmin - Resultados

- Mucinas – púrpura a vermelho
- Núcleos – negros
- Outros elementos - amarelos



Nódulo pulmonar



Mucicarmin - Aplicação diagnóstica

- *Cryptococcus neoformans*
- Mucinas neutras (coloração fraca)
- Mucinas sulfatadas
- Ácido hialurónico (reacção muito forte)
- Mucinas ácidas



Azul de Alciano

- 1ª aplicação histoquímica por Steedman, 1950
- Corante básico polivalente, solúvel em água, cuja cor azul é conferida pela presença de cobre na sua molécula
- Reage com compostos que contenham grupos aniónicos
- A sua utilização pode ser feita mediante a variação de pH ou ainda da concentração electrolítica

Azul de Alcian pH 2,5 - Protocolo



1. Ácido acético a 3%
2. Azul de alcian
3. Lavagem em água corrente
4. Contraste com Kernechtrot (opcional)
5. Lavagem com água corrente



Azul de alcião - Princípio

1. Preparação do tecido com ácido acético de forma a conferir o pH ácido
2. Formação de ligações com os radicais sulfato e carboxilo das mucinas ácidas; os radicais fosfato dos ácidos nucleicos não reagem
3. Lavagem com água corrente para retirar o excesso de corante
4. Contraste com Kernechtrot ou outro



AB – Variação de pH

- pH 2,5: mucinas e mucossubstâncias ácidas
- pH > 2,5: mucossubstâncias ácidas carboxiladas e sulfatadas
- pH < 2,5: mucossubstâncias ácidas sulfatadas

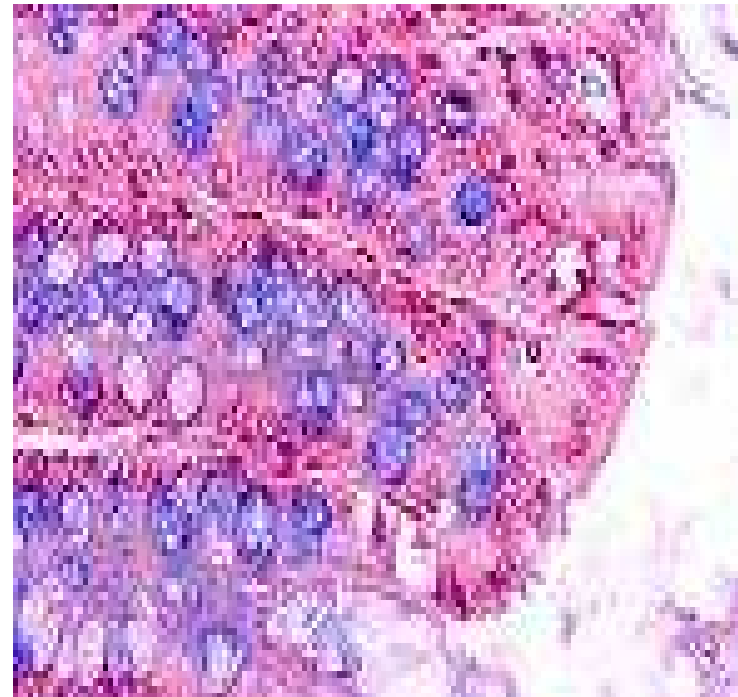
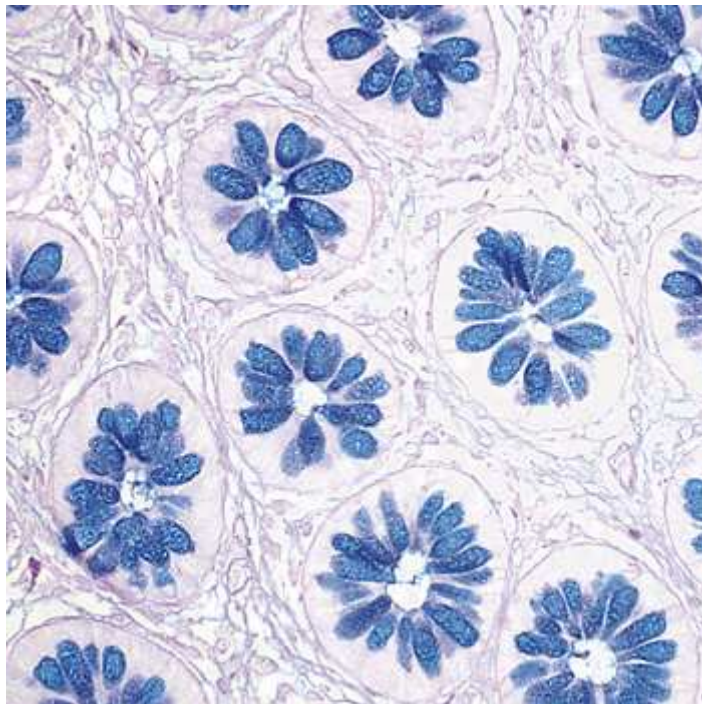


AB – Variação de [] electrolítica de MgCl₂

- 0,06M: mucossubstâncias carboxiladas e sulfatadas
- 0,2/0,3M: mucossubstâncias ácidas sulfatadas
- 0,5/0,6M: mucinas ácidas sulfatadas, sulfato de heparina e queratan
- 0,7/0,8M: sulfato de heparina e de queratan
- 0,9/1,0M: sulfato de queratan

Azul de alciano - Resultados

- Núcleos - roxos
- Mucinas ácidas - azul





AB/PAS

- Mowry, 1956
- Técnica útil para distinguir entre mucinas ácidas e neutras numa única preparação



AB/PAS - Protocolo

1. Ácido acético a 3%
2. Azul de alciano
3. Lavagem em água corrente
4. Ácido periódico
5. Reagente Shiff
6. Água corrente
7. Hematoxilina de Harris (opcional)



AB/PAS - Princípio

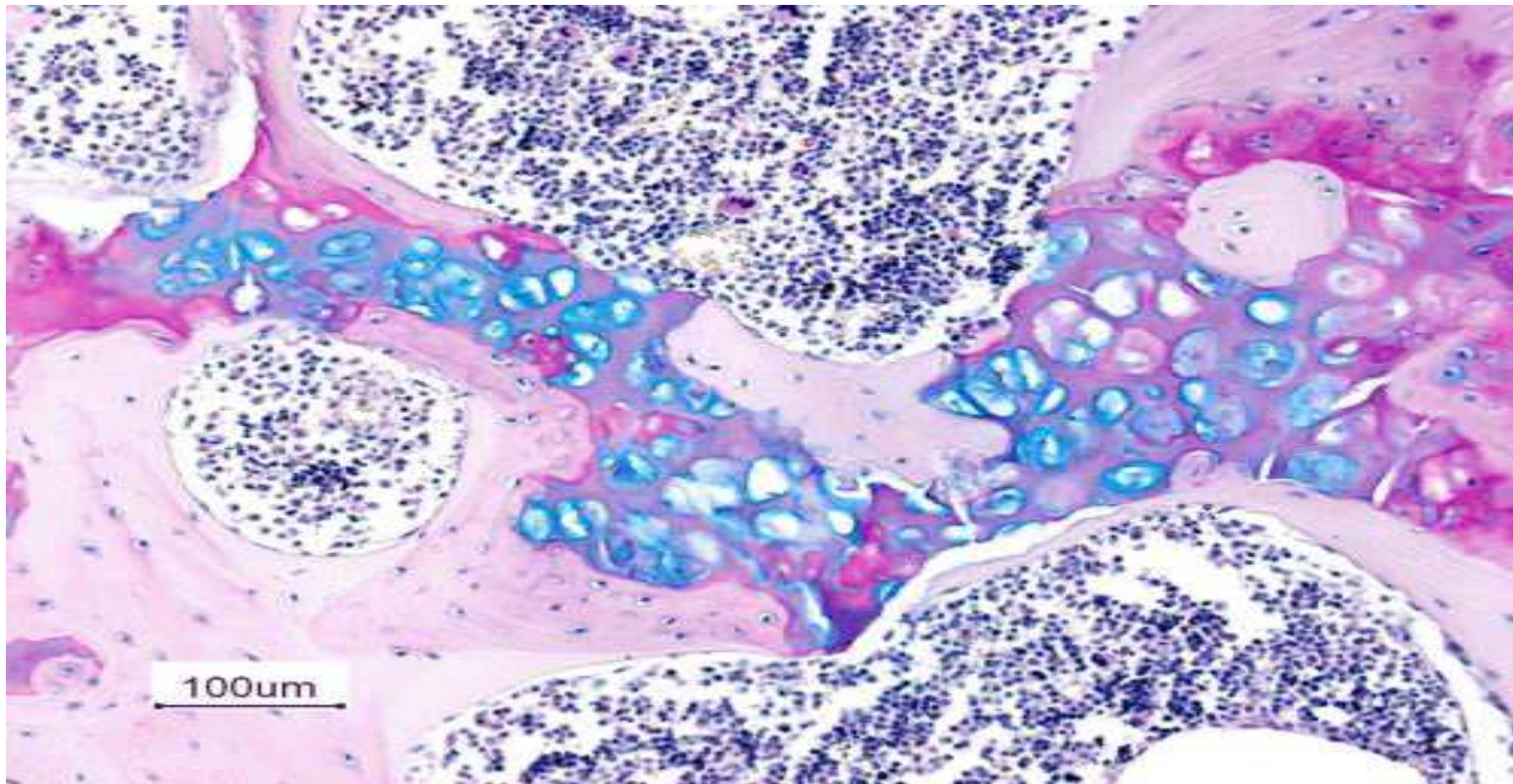
1. As mucinas ácidas devem ser 1.º coradas com o azul de alcião
2. Inactivação das mucinas ácidas para corarem pelo PAS
3. As mucinas neutras e carboidratos como o glicogénio são corados pelo PAS



AB/PAS - Resultados

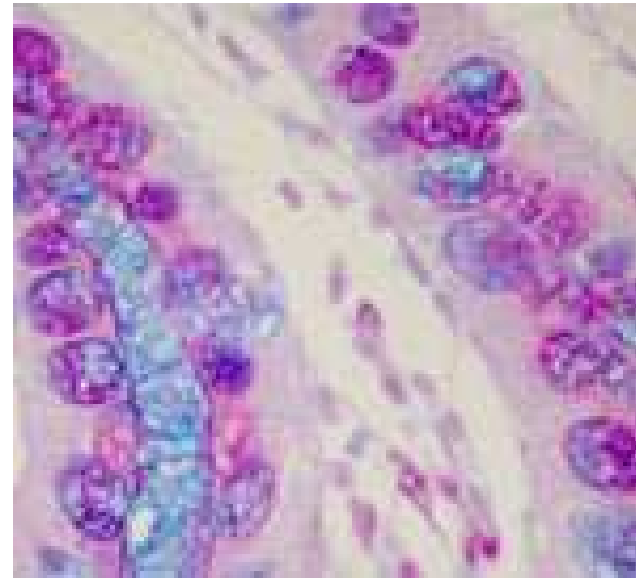
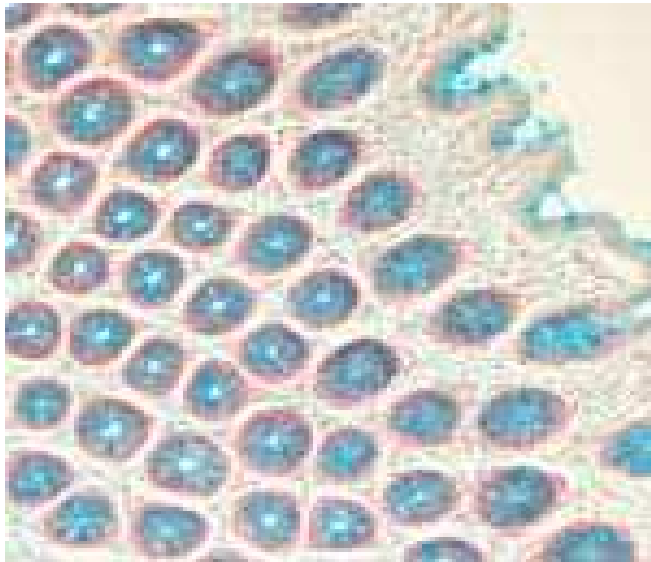
- Mucinas ácidas – azuis
- Mucinas neutras – magenta
- Glicogénio - magenta
- Núcleos – roxos
- Diferentes tipos de mucinas, mucinas mistas – púrpura

AB/PAS - Resultados





AB/PAS - Resultados





AB/PAS - Aplicação diagnóstica

- Secreção simultânea de mucossubstâncias neutras e ácidas ao nível do epitélio glandular



RESUMO

- Hidratos de carbono – generalidades
- Classificação bioquímica e histoquímica
- Técnicas de evidenciação:
 - PAS
 - Carmin de Best
 - Mucicarmim
 - AB
 - AB/PAS