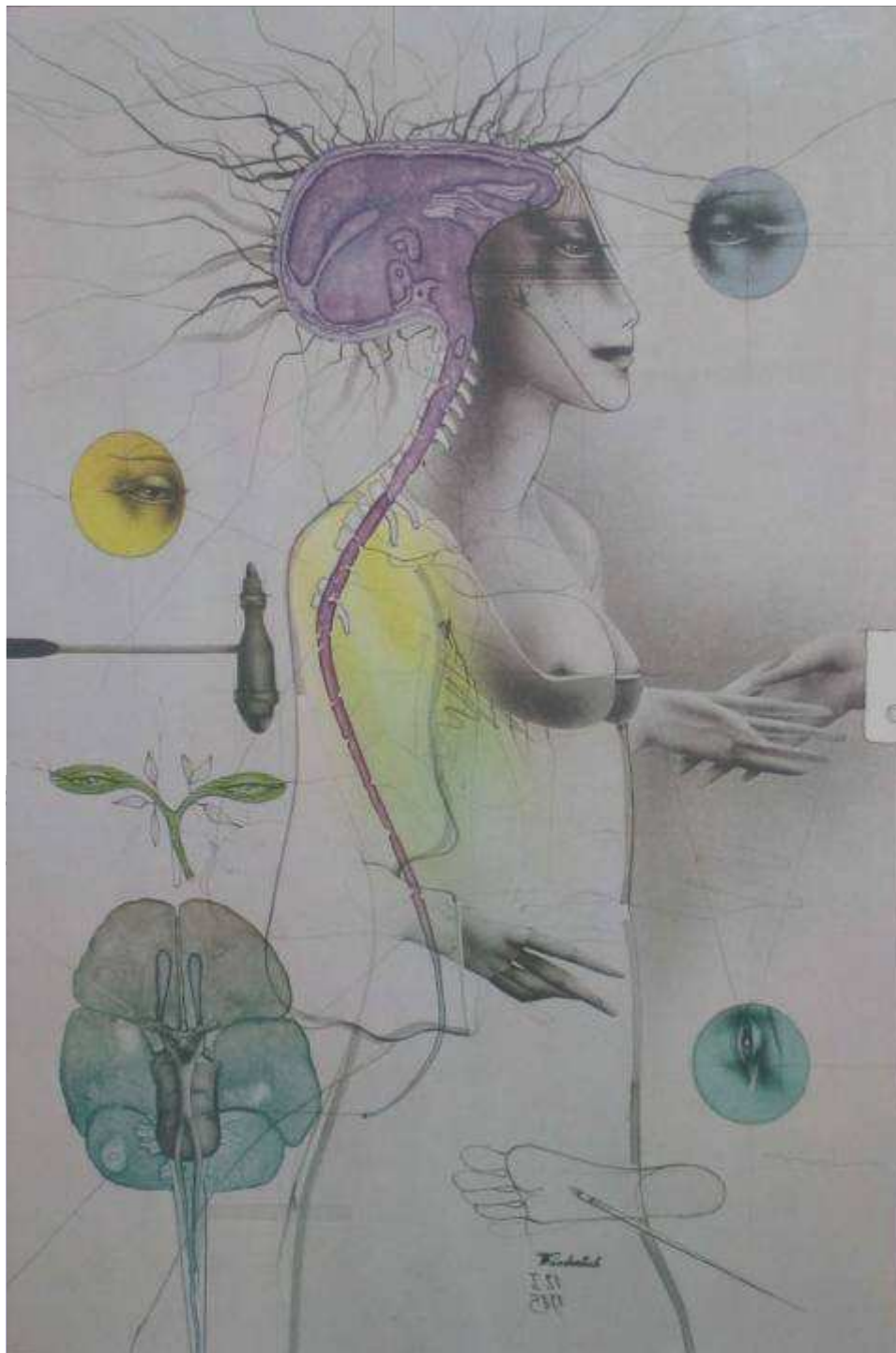




LABORATÓRIO DE NEUROPATOLOGIA

Serviço de Neurologia
Hospital de Santa Maria



Escola Superior de Tecnologia da
Saúde de Lisboa

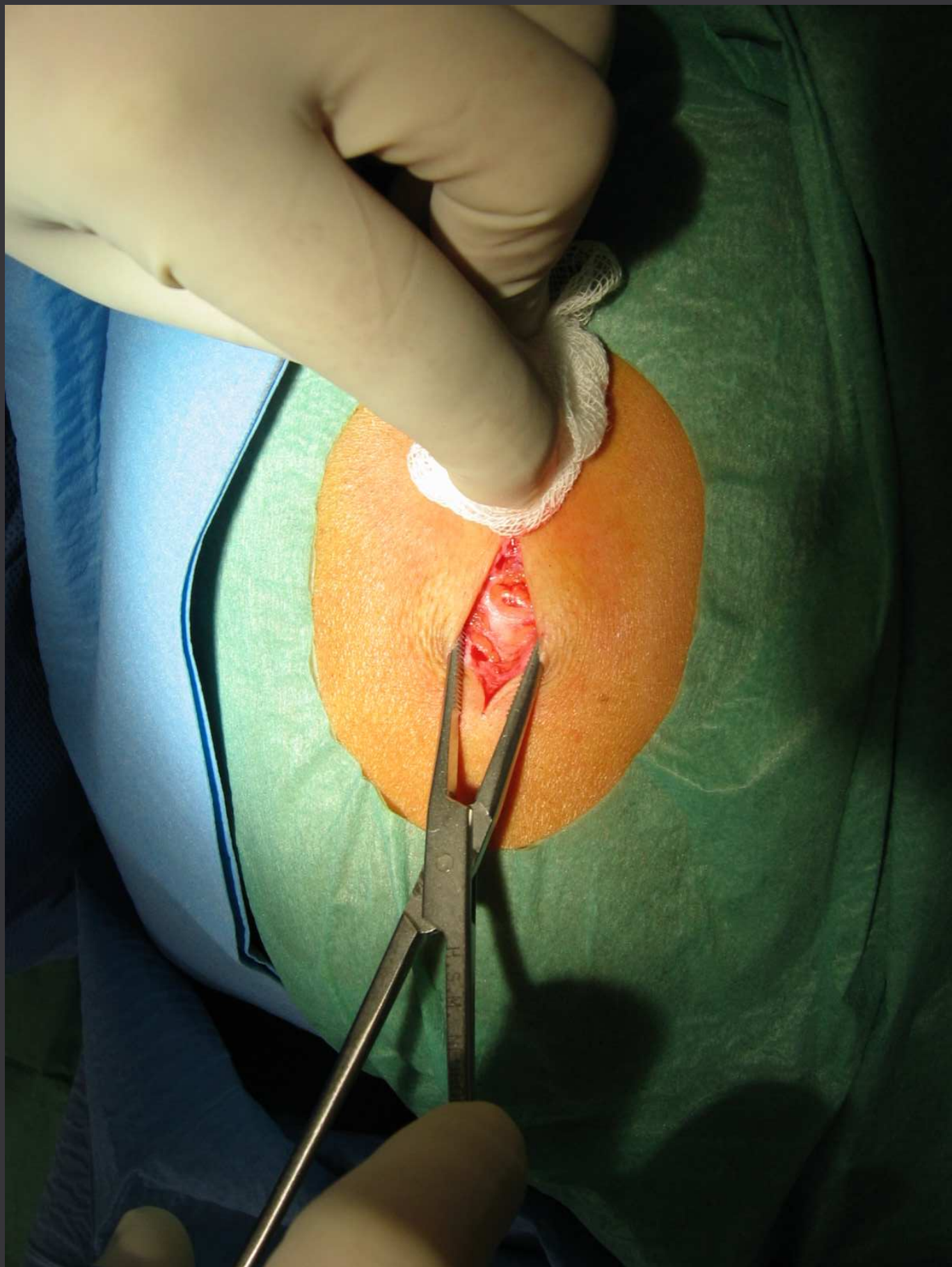
Lisboa 8 de Maio de 2008

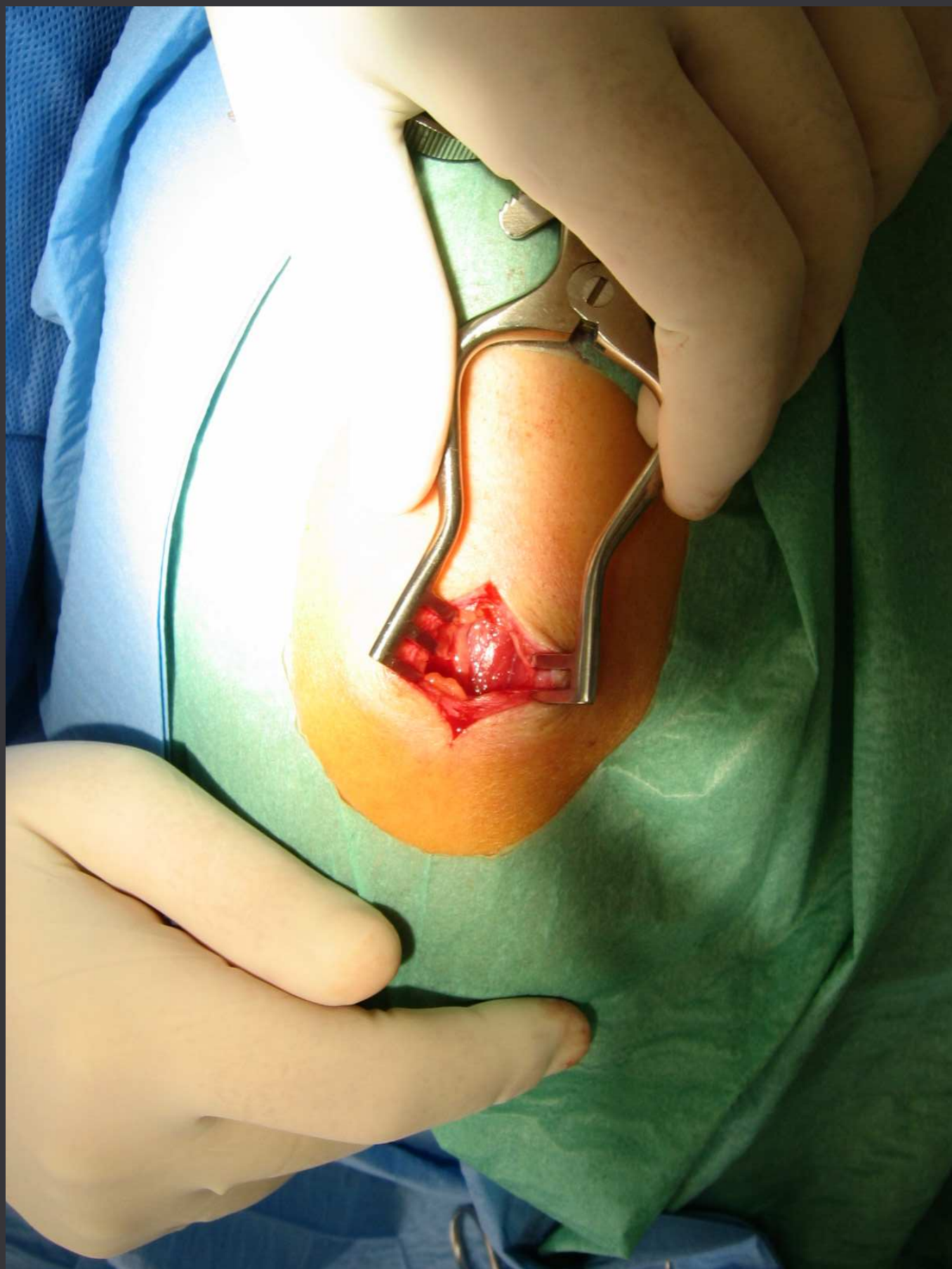
Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

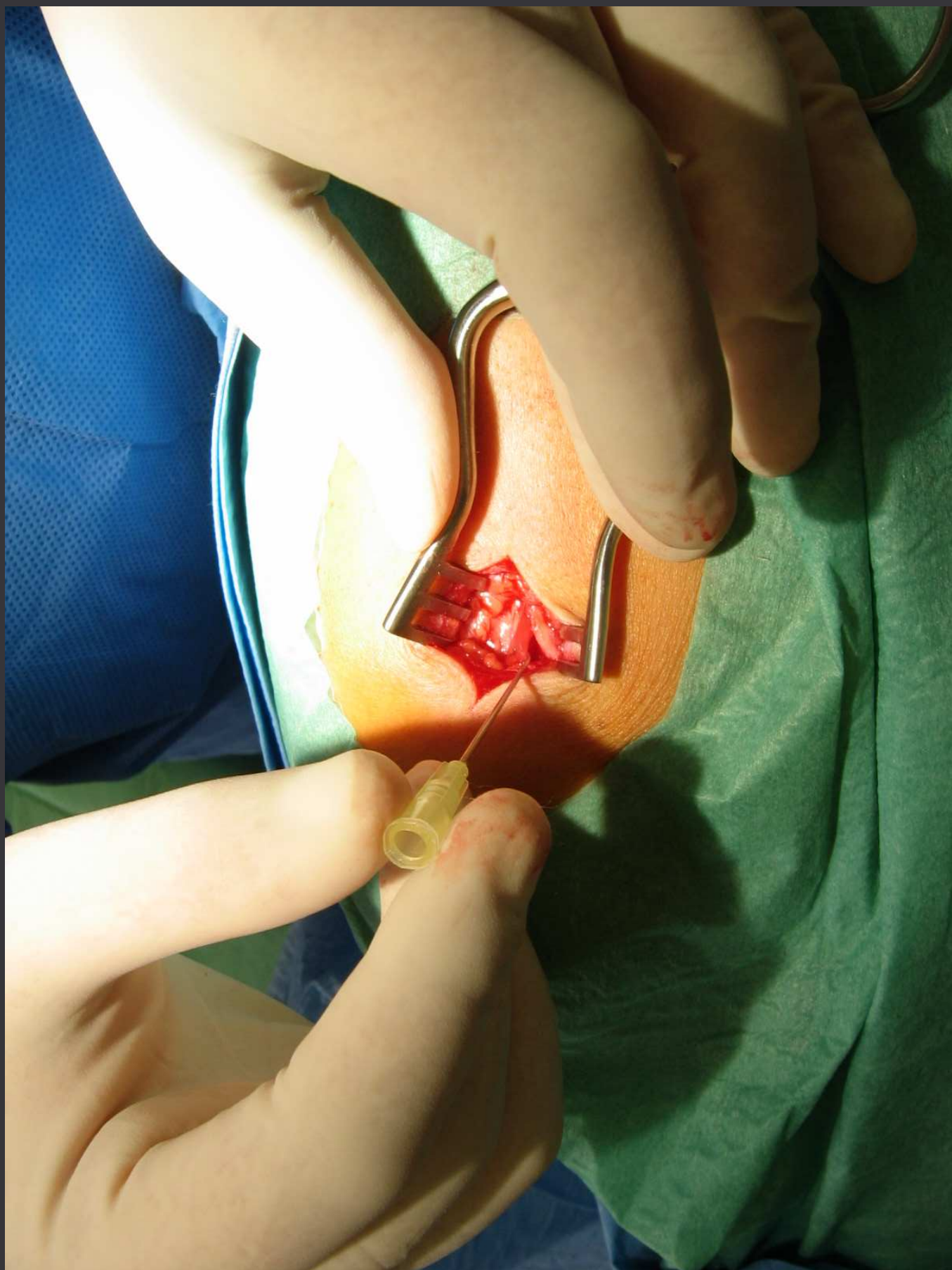
Colheita de biópsias

Músculo Deltóide Esquerdo









Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Colhem-se 4 amostras de músculo



Microscopia Electrónica

Instituto de Genética Médica
Jacinto Magalhães (Estudo da
cadeia respiratória mitocondrial)

Histoquímica + Histoenzimologia + Imunohistoquímica







Goma Adragante

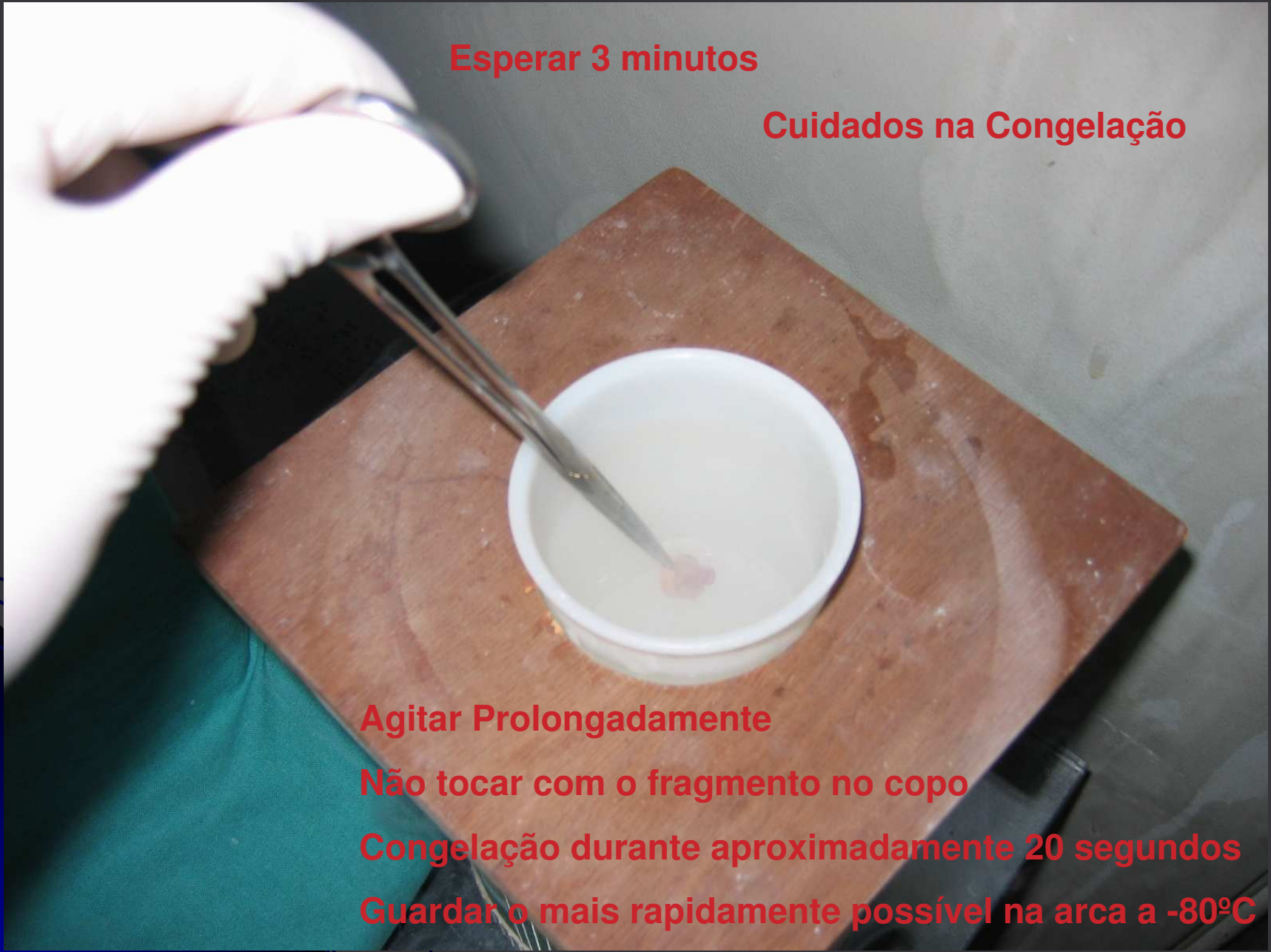
Eppendorfs

Tubos de Congelação

Cortiças

Pinça Hemostática

Pinça e estilete



Esperar 3 minutos

Cuidados na Congelação

Agitar Prolongadamente

Não tocar com o fragmento no copo

Congelação durante aproximadamente 20 segundos

Guardar o mais rapidamente possível na arca a -80°C





Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Corte em Crióstato a -22°C

3 Lâminas – HE + TG + PAS

14 Lamelas – Nadh, Miofosforilase, ATPase 4.6 e 9.4, SDH

Lâminas e Lamelas secam à temperatura ambiente 15 a 20 minutos e são guardadas na arca congeladora a -80° C

Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

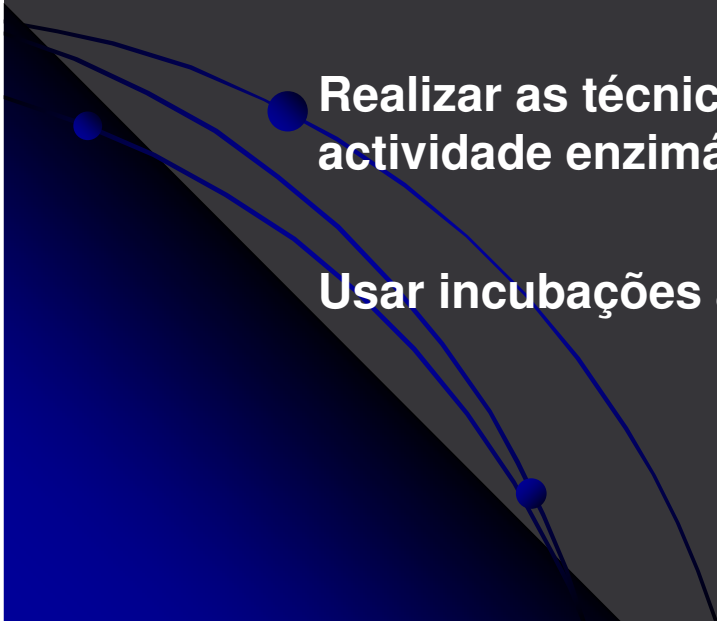
Para demonstrar a actividade enzimática é necessário

Uso de material limpo e isento de fosfatos

Usar meios de incubação contendo substratos na concentração adequada

Realizar as técnicas a uma Temperatura óptima para a actividade enzimática

Usar incubações a valores de pH ideais



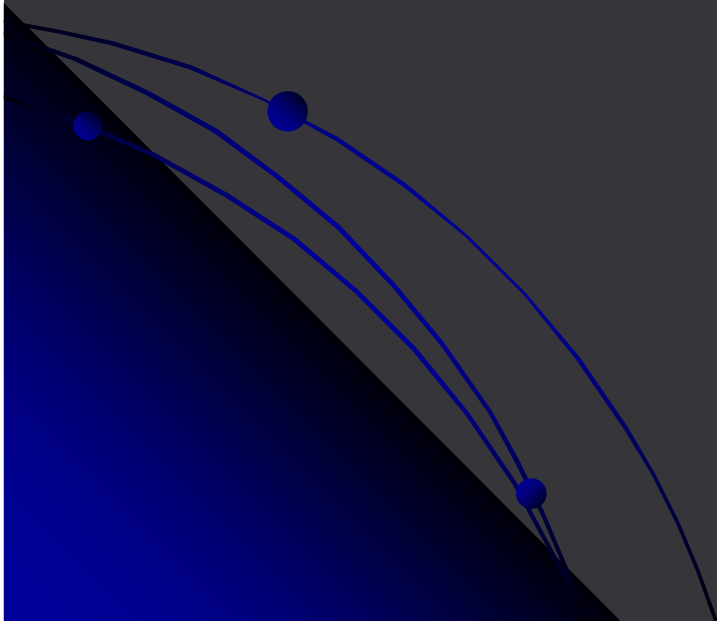
Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Fixação

Tecido a fresco

Esfregaços

Método do Isopentano



Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Miofosforilase

A enzima miofosforilase catalisa a reacção reversível de glicogénio em glucose – 1 - fosfato



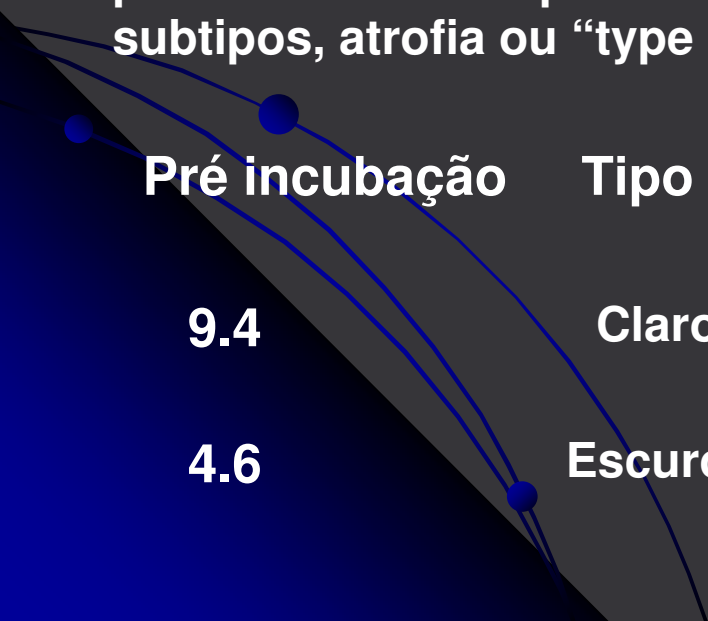
In vitro utilizamos um meio de incubação contendo glucose – 1 – fosfato e em condições óptimas a síntese do polissacárido (glicogénio) é proporcional à quantidade de enzima existente no tecido

Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Adenosina Trifosfatase

É uma enzima que está presente na miosina do músculo.

O método de ATPase permite diferenciar os diferentes tipos de fibras, importante para o diagnóstico de muitas doenças musculares que são caracterizados pela perda de um dos tipos de fibras ou subtipos, atrofia ou “type grouping”



Pré incubação

9.4

Tipo I

Claro

Tipo 2a

Escuro

Tipo 2b

Escuro

Tipo 2c

Escuro

4.6

Escuro

claro

Intermédio

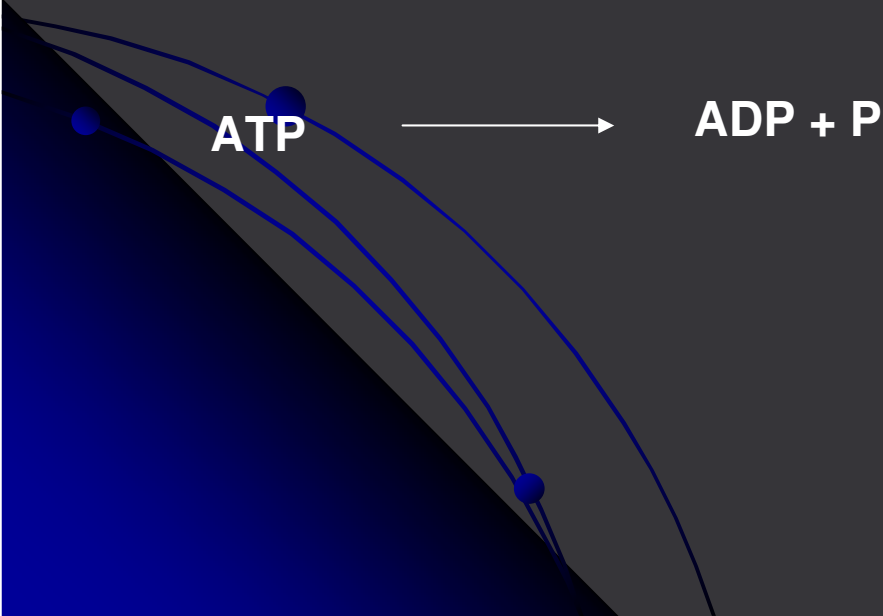
Intermédio

Técnicas Enzimáticas em Biopsias Musculares

Adenosina Trifosfatase

As pré-incubações com diferentes valores de pH inactivam a enzima de um tipo de fibra específico

A enzima ATPase hidrolisa o fosfato terminal do ATP produzindo ADP. Esta reacção é estimulada pelo Ca^{2+}



ATP

The diagram illustrates the hydrolysis of ATP. It features a dark blue background with a lighter blue curved shape on the left. Three blue dots are positioned along this curve. A white arrow points from the middle dot, which is labeled 'ATP', to the text 'ADP + P' on the right.

ADP + P



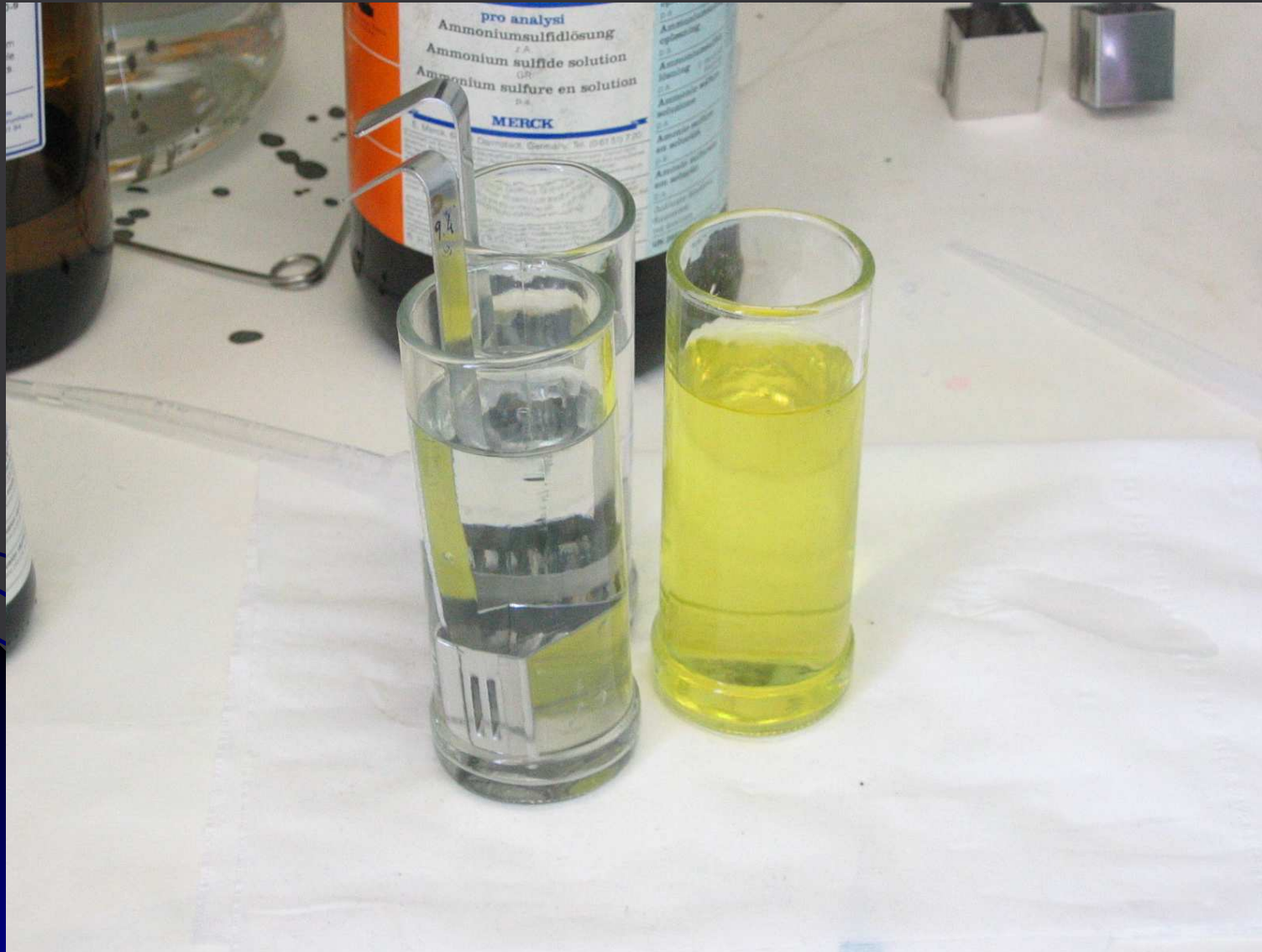
Cloreto de
cálcio 1%

Cloreto de
cobalto 2%

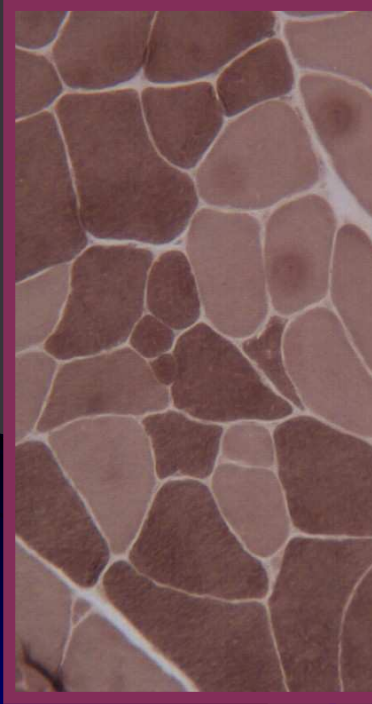
Veronal
Sódico

d H₂O

Técnicas de Histoenzimologia em Biópsias musculares



ATPases



Técnicas de Histoenzimologia em Biópsias musculares

Nicotinamide – adenine - dinucleotide

NADH

Reacção oxidativa que permite visualizar a arquitectura interna das fibras (Retículo intermiofibrilhar, os diferentes tipos de fibras e a acumulação de mitocôndrias)

Usada para detectar as estruturas anormais do retículo sarcoplasmático e anomalias mitocondriais.

Fibras tipo I – Azul escuro

Fibras tipo II – Azul claro

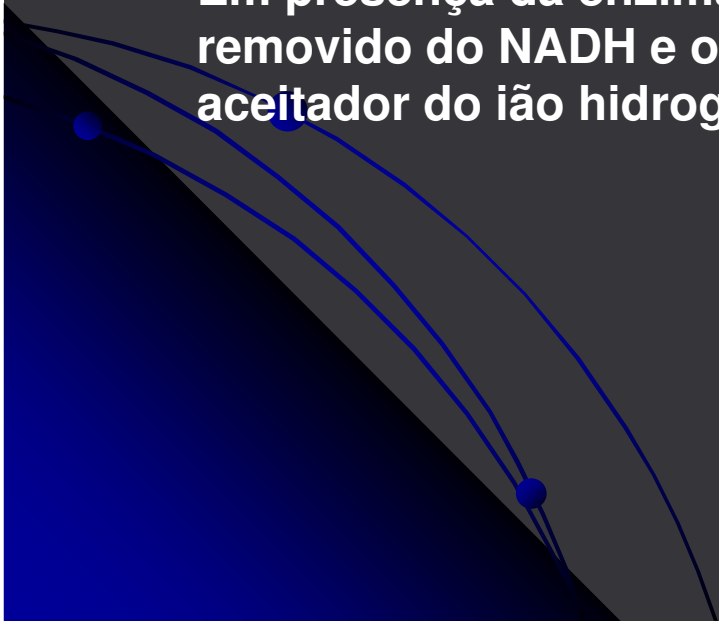
Técnicas de Histoenzimologia em Biópsias musculares

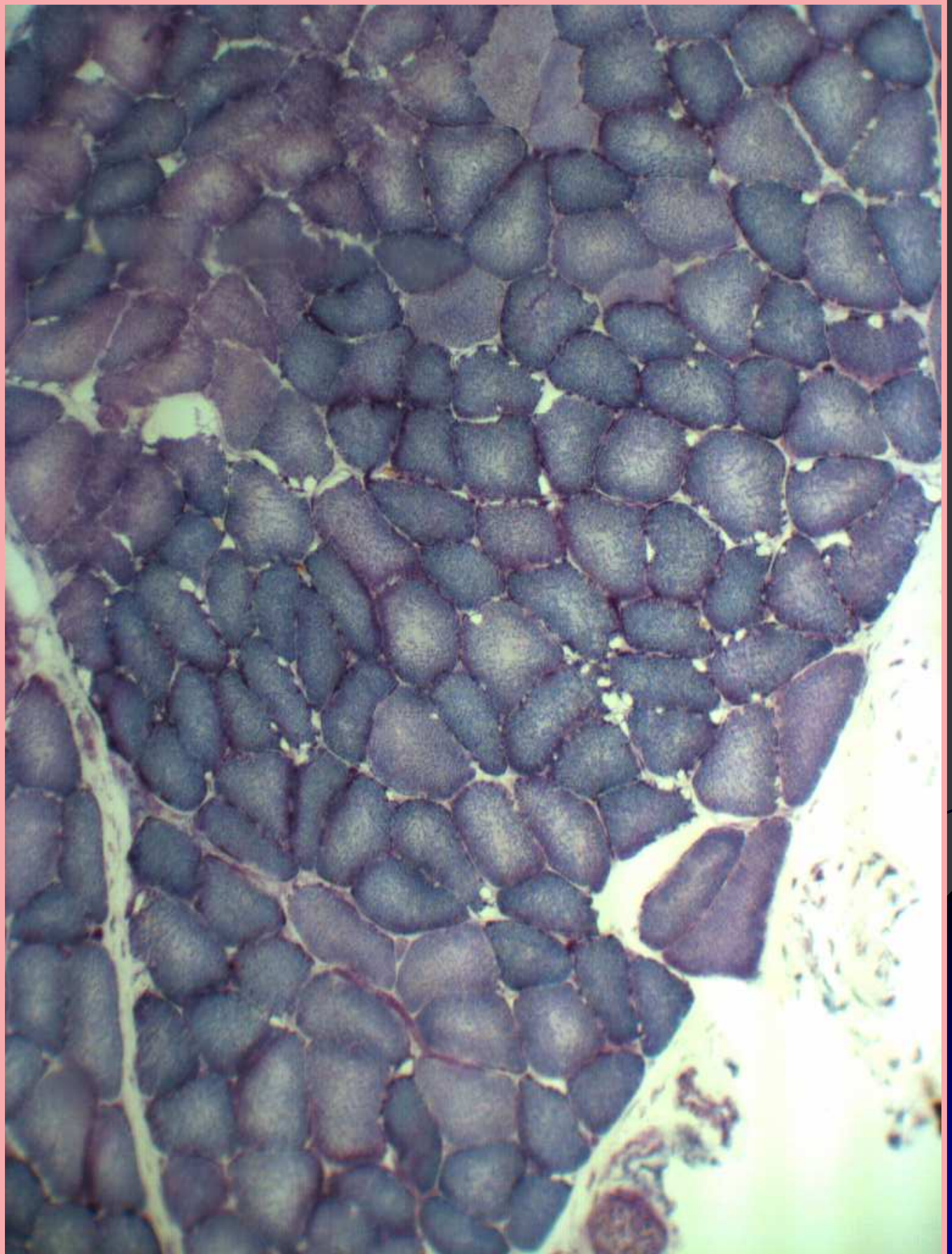
NADH

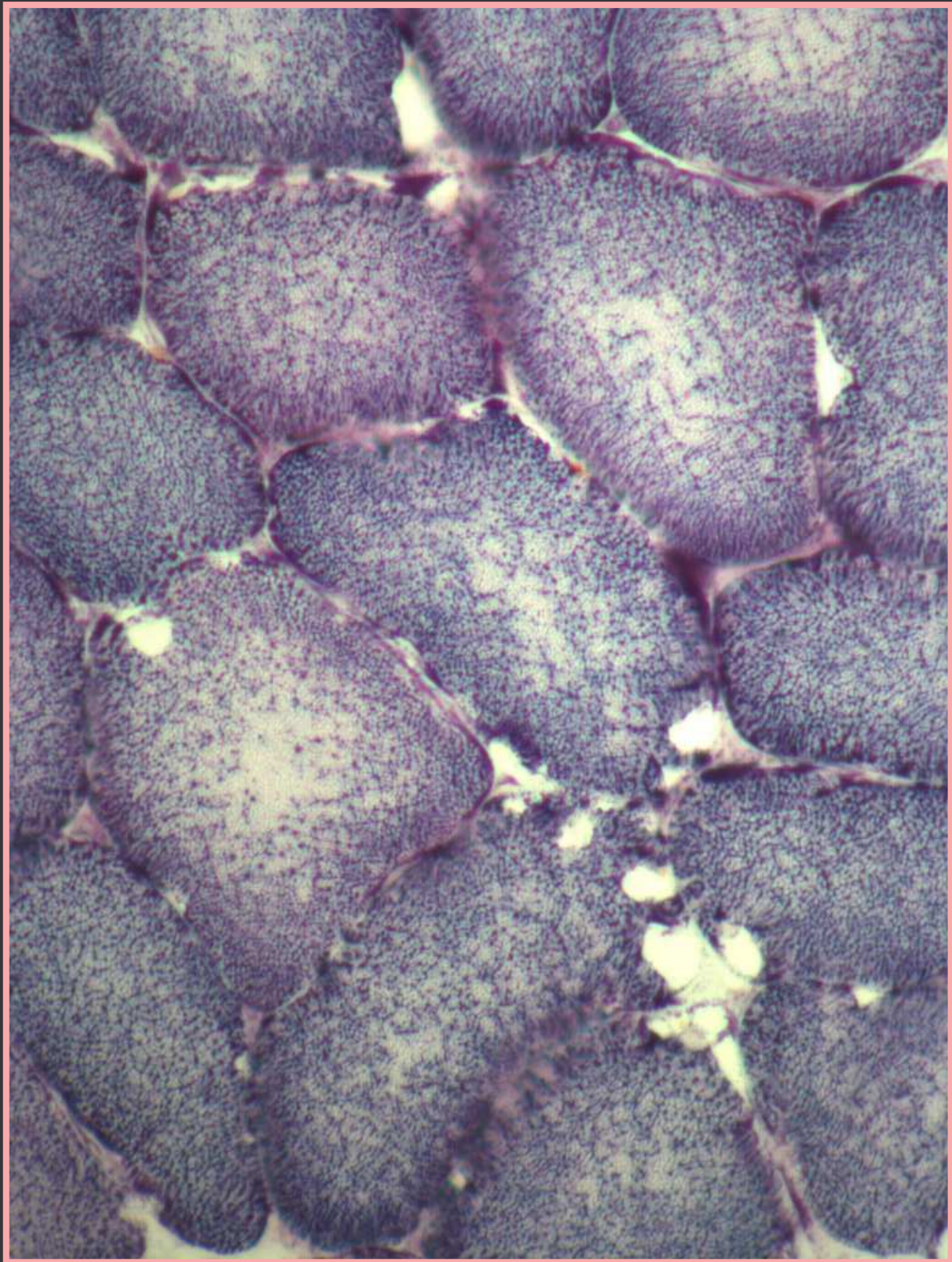
Princípio da técnica

O tecido é incubado numa solução contendo NADH e Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

Em presença da enzima, o hidrogénio é removido do NADH e o tetrazolium vai ser o aceitador do ião hidrogénio









Técnicas de Histoenzimologia em Biópsias musculares

Desidrogenase Succínica

SDH

A desidrogenase succínica é uma reacção específica para demonstrar a acumulação de mitocôndrias no sarcolema do músculo

As desidrogenases são enzimas oxidativas que transferem electrões (de hidrogénio) de um substrato para um aceitador.

Neste caso o substrato é o succinato de sódio e o aceitador o NBT. No final forma-se um composto insolúvel corado nos locais onde existe actividade enzimática

Resultados: Fibras Tipo I – Azul Escuro

Fibras Tipo II – Azul Claro





Técnicas de Histoenzimologia em Biópsias musculares

COX – Citocromo c Oxidase

Demonstra as mitocôndrias

Os sítios de actividade de citocromo c oxidase apresentam cor castanha (As fibras de tipo I de forma mais intensa)

**Fibras negativas significam
deficiências em citocromo c ou seja
citopatias mitocondriais**

