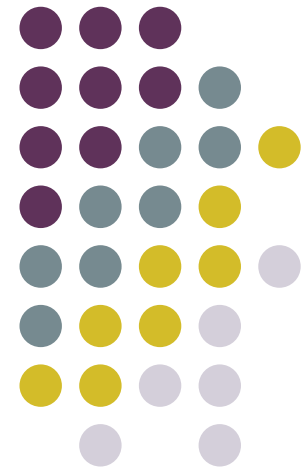


TECIDO CONJUNTIVO

Prof. Carina Ladeira

Março de 2008



Tecido Conjuntivo



- O tecido conjuntivo apresenta diversos tipos de **células** separadas por abundante **material extracelular** sintetizado por elas
- As **células** constituintes são: fibroblastos, mastócitos, histiócitos, condrócitos, osteócitos, células mesenquimatosas, entre outras...
- O **material extracelular ou substância fundamental** consiste num gel viscoso de macromoléculas alongadas (glicosaminoglicanos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas) muito hidratadas



Tecido Conjuntivo

O tecido conjuntivo é formado por:

- Tecido conjuntivo propriamente dito
- Tecido cartilagíneo
- Tecido ósseo
- Tecido hematopoiético

- **Função:** providenciar suporte estrutural e metabólico a outros tecidos e órgãos

Tecido Conjuntivo

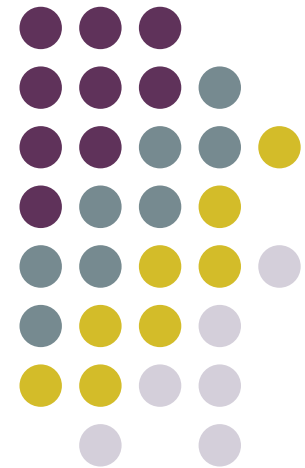


- O tecido conjuntivo propriamente dito é constituído por fibras de:
 - Colagénio
 - Reticulina
 - Elastina

Fibras de Colagénio

Prof. Carina Ladeira

Março de 2008



Fibras de Colagénio - caracterização



- Promovem força, quanto mais colagénio presente mais forte é o tecido
- Aspecto eosinófilo
- Composição: glicina, prolina, hidroxipolina, hidroxilisina,
- Aspecto ao M.O.C. – bandas onduladas com variáveis graus de densidade
- Aspecto ao M.E. – padrão característico de estriação composto por microfibrilhas
- Luz polarizada - birrefringência

Fibras de Colagénio - caracterização



Existem vários tipos de fibras sendo as de:

- Tipo I e V encontradas no tendão, osso, fibrocartilagem, derme)
- Tipo II e XI encontradas na cartilagem hialina, disco intervertebral
- Tipo III na pele de recém-nascido, músculo liso, tecido conjuntivo reticular
- Tipo IV nas membranas basais
- Tipo VII na derme
- Tipo IX na cartilagem hialina
- Tipo XII nos tendões e ligamentos



Aplicação diagnóstica

- Exibição distinta entre fibras de colagénio e fibras musculares em alterações fibróticas ou processos de fibrose (aumento do colagénio)
- Ex.: cirrose hepática e pielonefrite
- Alterações histológicas em doenças neuromusculares – diagnóstico diferencial entre tumores originários de fibroblastos ou de tumores originários de células musculares

Fibras de colagénio – Técnicas de eleição



- Soluções ácidas de anilinas com Ácido pícrico

Ex.: **Van Gieson**

- Técnicas tricrómicas utilizando Ácido fosfomolibdico e fosfotúngstico

Ex.: **Tricrómio de Masson**

- Variantes da Hematoxilina fosfotúngstica

Ex.: **PTAH**

- Métodos de oxidação com ácido periódico

Ex.: **Lillie's Allochrome**

Técnica de Van Gieson



- Van Gieson 1889
- Técnica histoquímica de grande sucesso
- Coloração específica e distintiva das fibras de colagénio
- Utilizada como contraste de outras técnicas, como p.e.: Von Kossa

Técnica de Van Gieson – Protocolo



1. Hematoxilina de Weigert
2. Lavagem em água corrente e destilada
3. Picrofucsina de Van Gieson

Técnica de Van Gieson – Princípio



A literatura refere 2 mecanismos explicativos:

- pH
- Dimensão das moléculas

Técnica de Van Gieson – Princípio do pH



- O pH ácido providenciado pelo Ácido pícrico é fundamental para a selectividade das estruturas a demonstrar – fibras de colagénio
- O Ácido pícrico funciona igualmente como corante, corando o músculo, eritrócitos e citoplasma

Técnica de Van Gieson – Princípio da dimensão das moléculas



- As moléculas pequenas do Ácido pícrico ficam retidas na malha apertada do músculo e dos eritrócitos
- A Fucsina ácida não penetra o componente citoplasmático devido à sua densidade
- As moléculas grandes da Fucsina ácida entram nos espaços das fibras de colagénio mascarando Ácido pícrico
- O mecanismo da Fucsina ácida está pouco conhecido, talvez funções hidróxilo dos a.a. laterais possam estar implicadas

Técnica de Van Gieson – Princípio da dimensão das moléculas



- Ambos os corantes são ácidos e com capacidade de ligação às estruturas básicas do tecido
- Quando um corte é tratado por 2 corantes ácidos de baixo pH, o mais difusível fixa-se nas estruturas acidófilas mais densas (citoplasma), enquanto que o menos difusível confere a sua cor às estruturas menos densas (colagénio)

Técnica de Van Gieson – Princípio



- O aumento do pH implica a perda de sensibilidade da solução corante (tonalidade rosa das estruturas)
- Como a solução de Picrofucsina de Van Gieson tem baixo pH a coloração nuclear tem de ser feita com a Hematoxilina férrica de Weigert
- Não é necessário diferenciar a coloração nuclear, pois a solução ácida de Van Gieson realiza este passo

Técnica de Van Gieson – Princípio



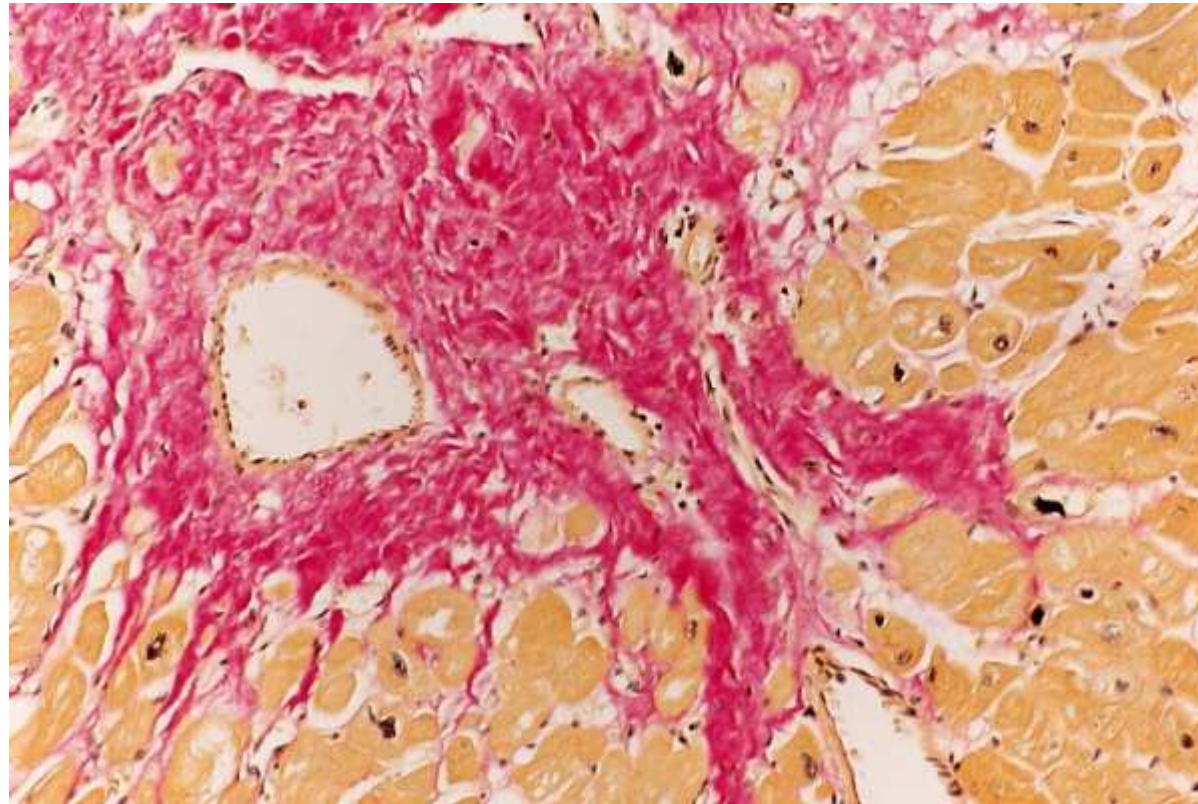
- Quando a solução de Van Gieson envelhece o pH pode subir a um ponto que diminua a coloração, neste caso deve-se adicionar HCL ou Ácido acético para aumentar o pH
- A fixação ideal para o Van Gieson é feita por Cloreto de mercúrio, no entanto outros fixadores podem ser utilizados

Técnica de Van Gieson – Resultados



- Núcleos – azul a negro
- Citoplasma e eritrócitos – amarelo
- Fibras de colagénio – vermelho brilhante
- Músculo – amarelo
- Membranas basais - vermelhas

Técnica de Van Gieson – Resultados



Tricrómio de Masson



- Masson 1929
- Designa-se de Tricrómio devido ao facto de utilizar 3 substâncias corantes, podendo estar incluída ou não o corante nuclear

Tricrómio de Masson - Protocolo



1. Hematoxilina férrica de Weigert
2. Fucsina ácida
3. Ácido fosfomolibdico ou fosfotúngstico
4. Azul de anilina ou Verde luz

Tricrómio de Masson - Princípio



- Fundamenta-se na permeabilidade entre as fibras de colagénio e os outros elementos acidófilos constituintes do tecido
- O colagénio possui maior permeabilidade permitindo o efeito difusor do Ácido fosfomolibdico sobre o corante utilizado anteriormente
- O mecanismo é desconhecido existindo várias teorias explicativas

Tricrómio de Masson – Teoria da substituição



- As fibras de colagénio retêm o Ácido fosfomolibdico que é substituído posteriormente por outro corante – Azul de anilina ou Verde luz

Tricrómio de Masson – Teoria do comportamento anfotérico



- Baseia-se no facto dos corantes usados após o Ácido fosfomoblídico apresentarem um comportamento anfotérico, ou seja, o pentavalente Ácido fosfomolíbldico que se encontra fixado nas fibras de colagénio, mantém numerosos radicais livres que se vão combinar com os grupos básicos do corante seguinte, de natureza anfotérica (Azul de anilina ou Verde luz)



Tricrómio de Masson

Porque não fica retida a Fucsina ácida nas fibras de colagénio?

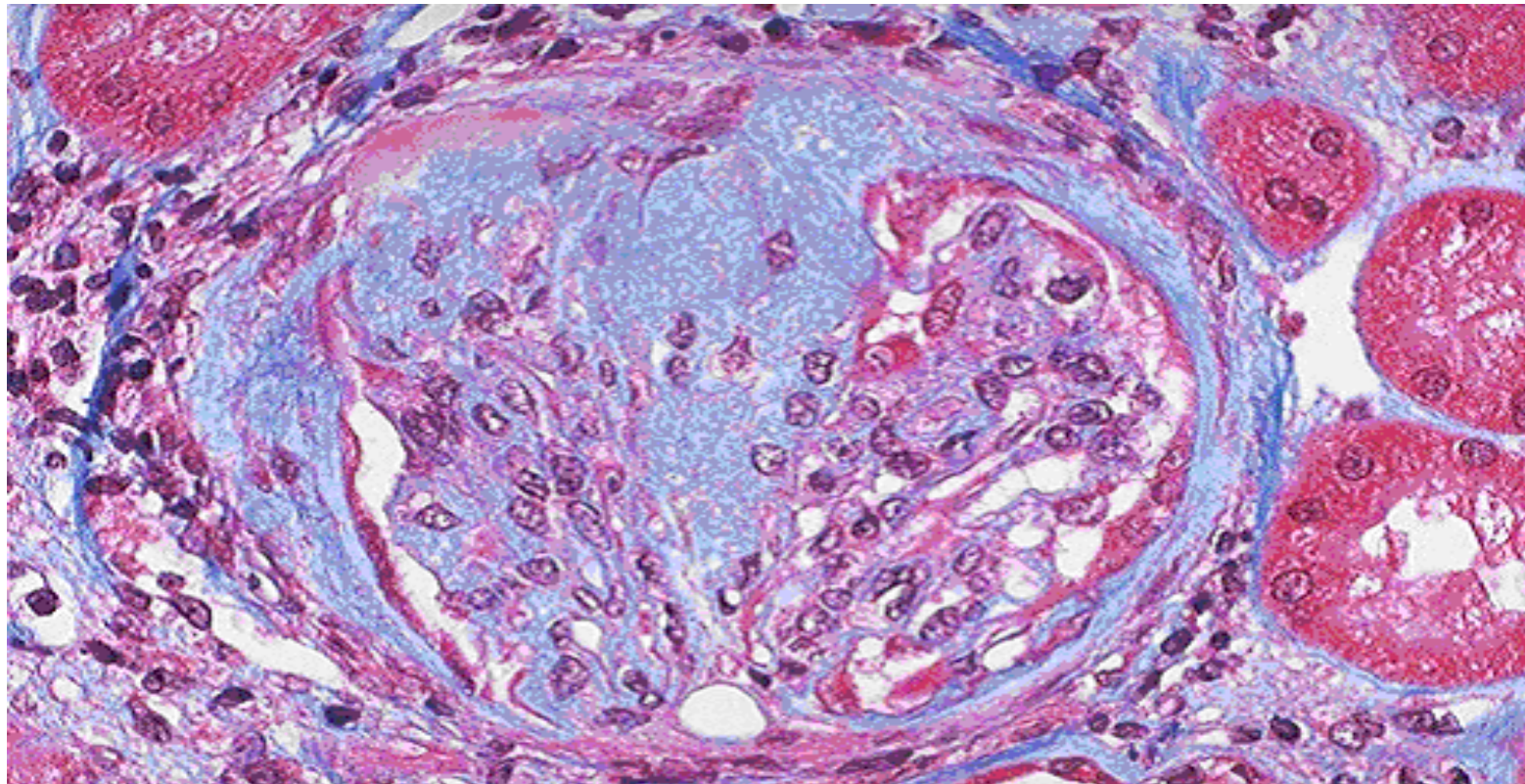
- Factores de permeabilidade e difusão: a fucsina ácida não fica retida nas fibras de colagénio devido à sua elevada permeabilidade e a difusão facultada pela adição do ácido. Como o citoplasma é uma estrutura mais “vedada” a fucsina ácida fica retida nestes

Tricrómio de Masson - Resultados

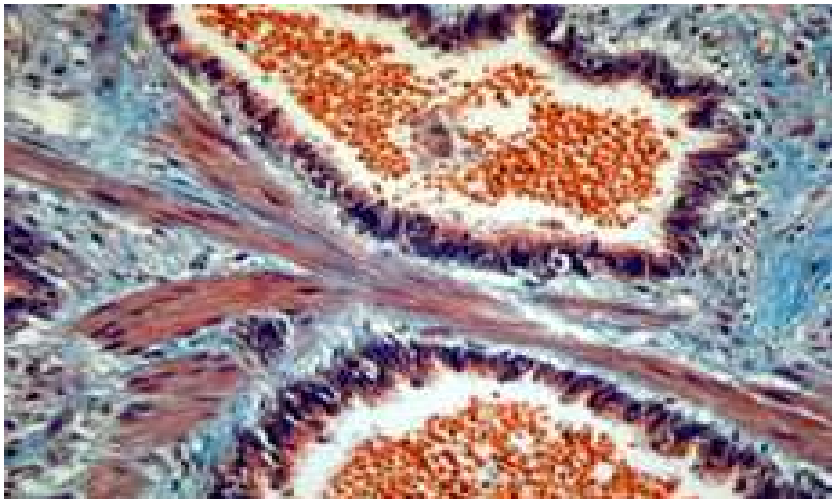
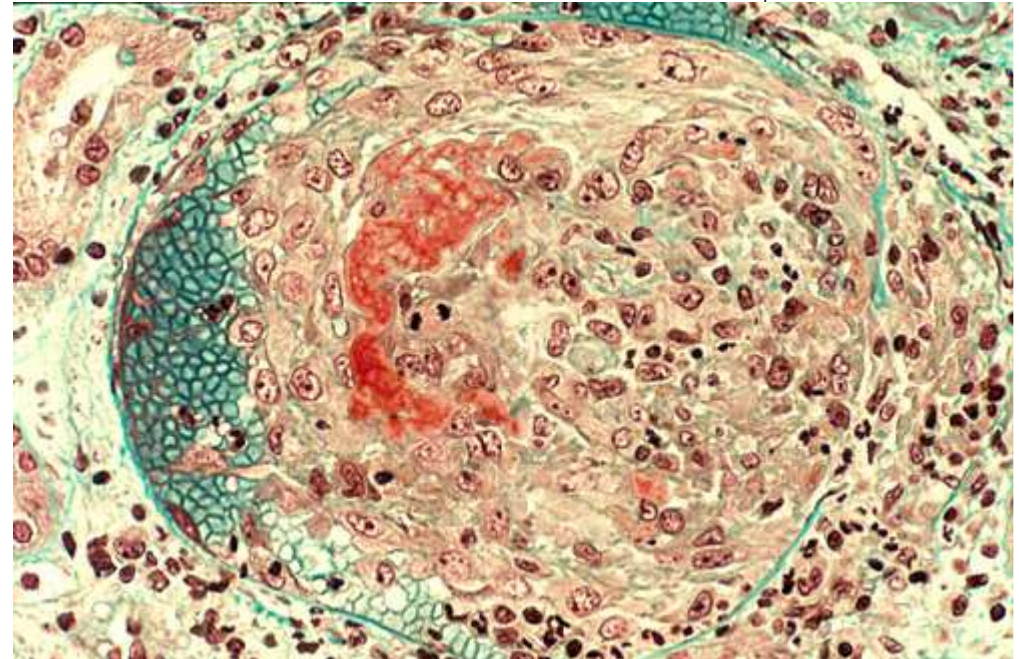


- Núcleos – azul a negro
- Citoplasma, eritrócitos, queratina, músculo – vermelho
- Fibras de colagénio, amilóide, mucinas e alguma reticulina – verde ou azul

Tricrómio de Masson - Resultados



Tricrómio de Masson - Resultados



Glomerulonefrite proliferativa extracapilar

Hematoxilina Fosfotúngstica



- Pode ser designada de policromática
- Utiliza como mordente o tungsténio
- Requer pós-fixação com Cloreto de mercúrio (Líquido de Zenker), que incrementa a afinidade tinturial entre reagente e componentes tecidulares
- As soluções de PTAH são extremamente estáveis, especialmente quando protegidas da luz solar
- Quando os resultados deixarem de apresentar a vulgar variação de tonalidade de azul significa que a solução de PTAH deve ser descartada, por sobreoxidação

Hematoxilina Fosfotúngstica - Protocolo



1. Pós-fixação com Líquido de Zenker
2. Permanganato de potássio
3. Ácido oxálico (remove o excesso do Permanganato de potássio)
4. Solução de PTAH

Hematoxilina Fosfotúngstica - Mecanismo



- A pós-fixação com cloreto de mercúrio aumenta a afinidade tintorial, sendo um factor determinante para o êxito da técnica
- O Permanganato de potássio funciona como mordente, cuja resistência à acção do Ácido oxálico se fica a dever a factores de permeabilidade
- A solução de PTAH proporciona 2 tonalidades distintas (azul e castanho avermelhado)

Hematoxilina Fosfotúngstica - Mecanismo



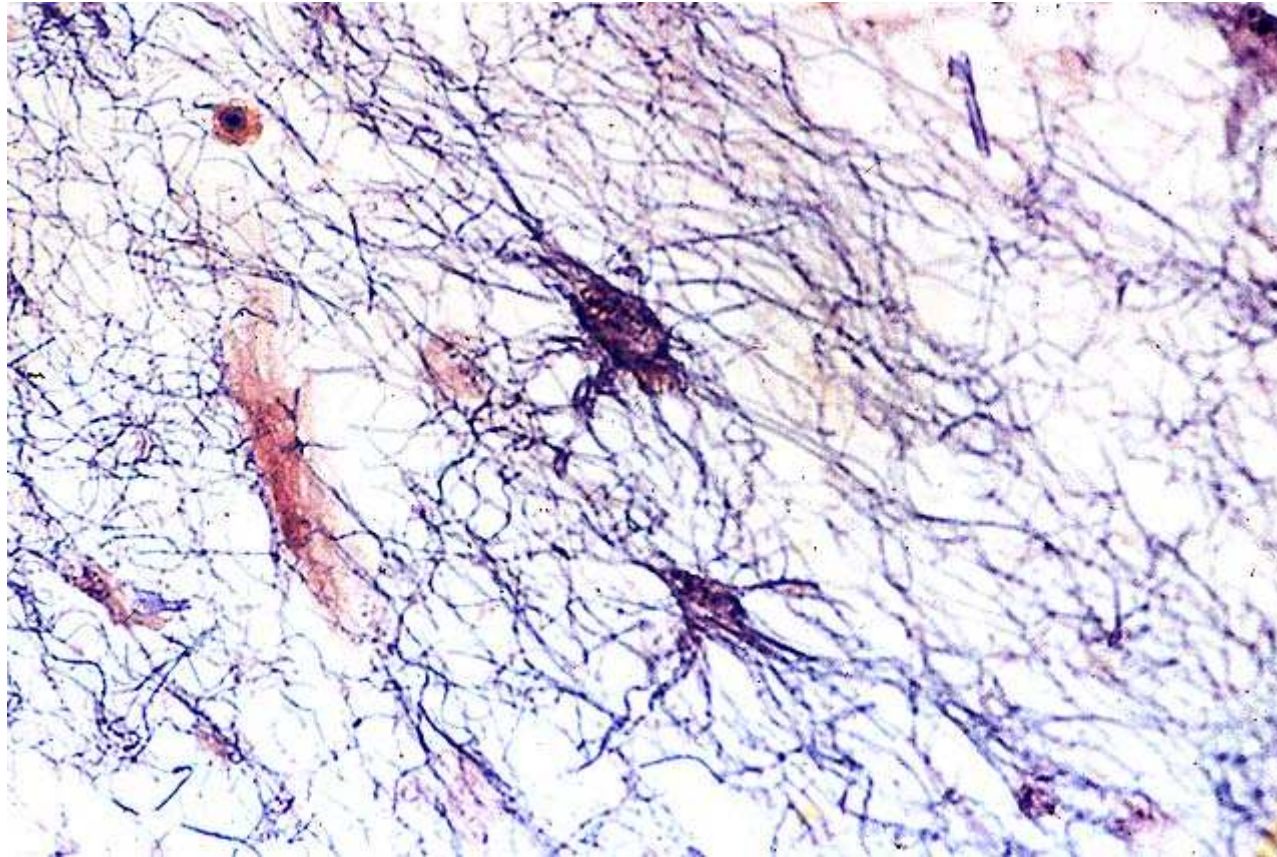
- A solução apresenta uma proporção de 20:1 de ácido relativamente à hematoxilina originando uma solução de cor azulada
- Supõe-se que a coloração azul de algumas estruturas se fica a dever à hematoxilina
- As estruturas coradas de castanho avermelhado sofrem a acção do Ácido fosfotúngstico
- Nota: requer desidratação rápida afim de se evitar o arrastamento da tonalidade vermelha conferida pelo Ácido fosfotúngstico

Hematoxilina Fosfotúngstica - Resultados



- Núcleos – azuis
- Citoplasma – azul
- Colagénio – castanho rosado
- Músculo – azul
- Células gliais – azul púrpura
- Fibras elásticas - púrpura

Hematoxilina Fosfotúngstica - Resultados



Lillie's Allochrome



- Utiliza o Ácido periódico como oxidante
- Demonstra o colagénio, fibras reticulares e membranas basais

Lillie's Allochrome - Protocolo



1. Ácido periódico
2. Reagente de Schiff
3. Hematoxilina de Weigert
4. Solução de Azul de metil em Ácido pícrico

Lillie's Allochrome - Mecanismo



- Os complexos não-glucosamino polissacarídeos que se encontram conjugados com o colagénio coram pelo PAS
- A solução de Azul de metil em Ácido pícrico (40 mg: 100ml) apresenta alta selectividade para o colagénio dada a sua natureza ácida

Lillie's Allochrome - Resultados



- Núcleos – castanho a negro
- Citoplasma e músculo – cinzento esverdeado a amarelo esverdeado
- Colagénio – azul
- Membranas basais – vermelho púrpura



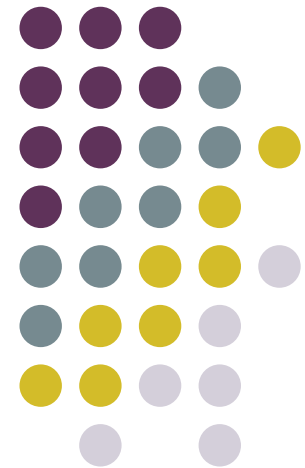
RESUMO

- Conceitos gerais
- Caracterização das fibras de colagénio
- Aplicação diagnóstica
- Técnica de Van Gieson
- Tricrómio de Masson
- Hematoxilina Fosfotúngstica
- Lillie's Allochrome

Fibras de reticulina

Prof. Carina Ladeira

Março de 2008





Fibras de reticulina

- Designa-se de reticulina o principal constituinte das fibras de reticulina ou reticulares
- Muito semelhante ao colagénio, distinguindo-se pela presença de glícidos em maior quantidade e pela presença de lípidos
- Presentes na membrana basal e nos órgãos fortemente celulares: gânglios linfáticos, fígado, medula óssea e vasos
- São digeridas por enzimas proteolíticas
- São argirófilas



Fibras de reticulina

- Estudos ultraestruturais indicam que estas fibras corresponderão a fibras de colagénio jovens ou possivelmente a agregações de colagénio
- Não são visíveis pela Hematoxilina-Eosina
- Possuem componente carbohidratado (evidenciação pelo PAS) responsável pela evidenciação pela prata



Aplicação diagnóstica

- O arranjo estrutural da reticulina permite um diagnóstico diferencial dos tumores:
- **Carcinomas** – as fibras de reticulina organizam-se em torno de ninhos de células tumorais, providenciando suporte às estruturas circundantes
 - **Sarcomas** – o padrão arquitetural é algo uniforme em que cada célula é rodeada por reticulina
 - **Linfosarcomas** – as fibras de reticulina rodeiam individualmente as células
 - **Cirrose hepática** – as fibras de reticulina apresentam um padrão descontínuo



Técnicas de eleição

Métodos de Prata Amoniacal

- Gomori
- Gordon & Sweets

Métodos de Prata Metenamina

- P.A.S.M.

Prata Amoniaca

Princípios Gerais da Técnica



- Oxidação
- Sensibilização
- Impregnação pela solução de prata
- Redução
- Tonificação ou Aurificação
- Remoção da Prata não reactiva
- Contraste

Princípios gerais

Oxidação



- As fibras devem ser oxidadas para revelarem a sua argirófilia
- Consiste na oxidação dos grupos glicol da hexose na reticulina em grupos aldeído
- Agentes oxidantes: Ácido fosfomolibdico, Permanganato de potássio (seguido de Ácido oxálico ou Metabissulfito de potássio para descoloração e remoção do excesso) e Ácido periódico
- Posteriormente requer uma lavagem prolongada afim de remover o excesso de agente oxidante

Princípios gerais

Sensibilização



- Consiste num processo de impregnação (deposição), utilizando um sal de um metal, o qual forma um composto metal-orgânico com o tecido, sendo subsequentemente substituído pela prata
- Agentes sensibilizadores: Nitrato de uranilo, Sulfato de amónio férrico e diluições de soluções de prata

Princípios gerais Impregnação



- Envolve o tratamento com uma solução de Nitrato de prata amoniacal
- Solução de Nitrato de Prata Amoniacal
- A adição contínua gota a gota de Hidróxido de amónio à solução de nitrato de prata a 10% (pH 5.0) leva à formação de um precipitado de cor castanha escura (formação de óxido ou Hidróxido de prata), cuja dissolução ocorrerá paulatinamente atingindo-se um pH 9.5, levando à formação de complexos diamino prata

Princípios gerais

Impregnação



- Após a dissolução do precipitado a adição de uma pequena quantidade de Hidróxido de amónia permitirá atingir um pH 11 a 12
- Nesta fase verifica-se elevada concentração de complexos diamina prata e baixa concentração de iões de prata
- Envolve o tratamento com uma solução de nitrato de prata amoniacal
- Deposição dos complexos diamina prata que são reduzidos a prata metálica pelos grupos aldeído (processo insuficiente não produzindo reacção adequadamente visível)

Princípios gerais

Redução



- Utiliza uma solução de formaldeído a 10%, que vai reduzir os complexos diamina prata residuais a prata metálica, nas porções de tecido selectivamente impregnadas
- Simultaneamente o formaldeído, propriamente dito, sofre um processo de oxidação
- As porções impregnadas pela prata metálica apresentam uma tonalidade castanha escura

Princípios gerais

Tonificação ou Aurificação



- Por acção do Cloreto de ouro, a prata metálica (tonalidade castanha escura) é oxidada em prata iónica e o Cloreto de ouro é reduzido a ouro metálico (tonalidade púrpura negro)
- O Cloreto de ouro é mais estável que a prata metálica pelo que os cortes histológicos apresentam melhor contraste e definição
- Designa-se por viragem a substituição da prata metálica agora existente no tecido por ouro

Princípios gerais

Remoção da Prata Não Reactiva



- Previne a redução não-específica da prata ao longo do tempo, por exposição à luz
- Remove o excesso de Cloreto de ouro, eventualmente presente
- Utiliza-se o Tiosulfato de sódio, Metabissulfito de potássio ou Hipobissulfito de sódio, cujos iões um complexo solúvel com a prata iónica não-reactivo presente no tecido

Princípios gerais

Contraste



- Kernechtrot (Nuclear Fast Red)
- Vermelho Neutro
- Verde Luz
- Opcional, utilizada de acordo com o gosto do Técnico e do Patologista

Algumas considerações



- Estas reacções necessitam de absoluta “esterilidade” química dos materiais de vidro a utilizar e de absoluta pureza dos reagentes
- Deve evitar-se o contacto entre os reagentes atrás referidos e os equipamentos e materiais metálicos

Gomori

Protocolo



1. Permanganato de potássio a 0,5%
2. Lavar com água destilada
3. Ácido oxálico a 5%
4. Lavagem em água destilada
5. Alúmen de ferro a 2%
6. Lavagem em água corrente
7. Solução de Prata Amoniacal
8. Lavagem rápida em água destilada
9. Formaldeído neutro a 10%
10. Lavagem em água destilada
11. Cloreto de ouro a 0,2%
12. Hipobissulfito de sódio a 5%
13. Lavagem em água corrente
14. Contraste

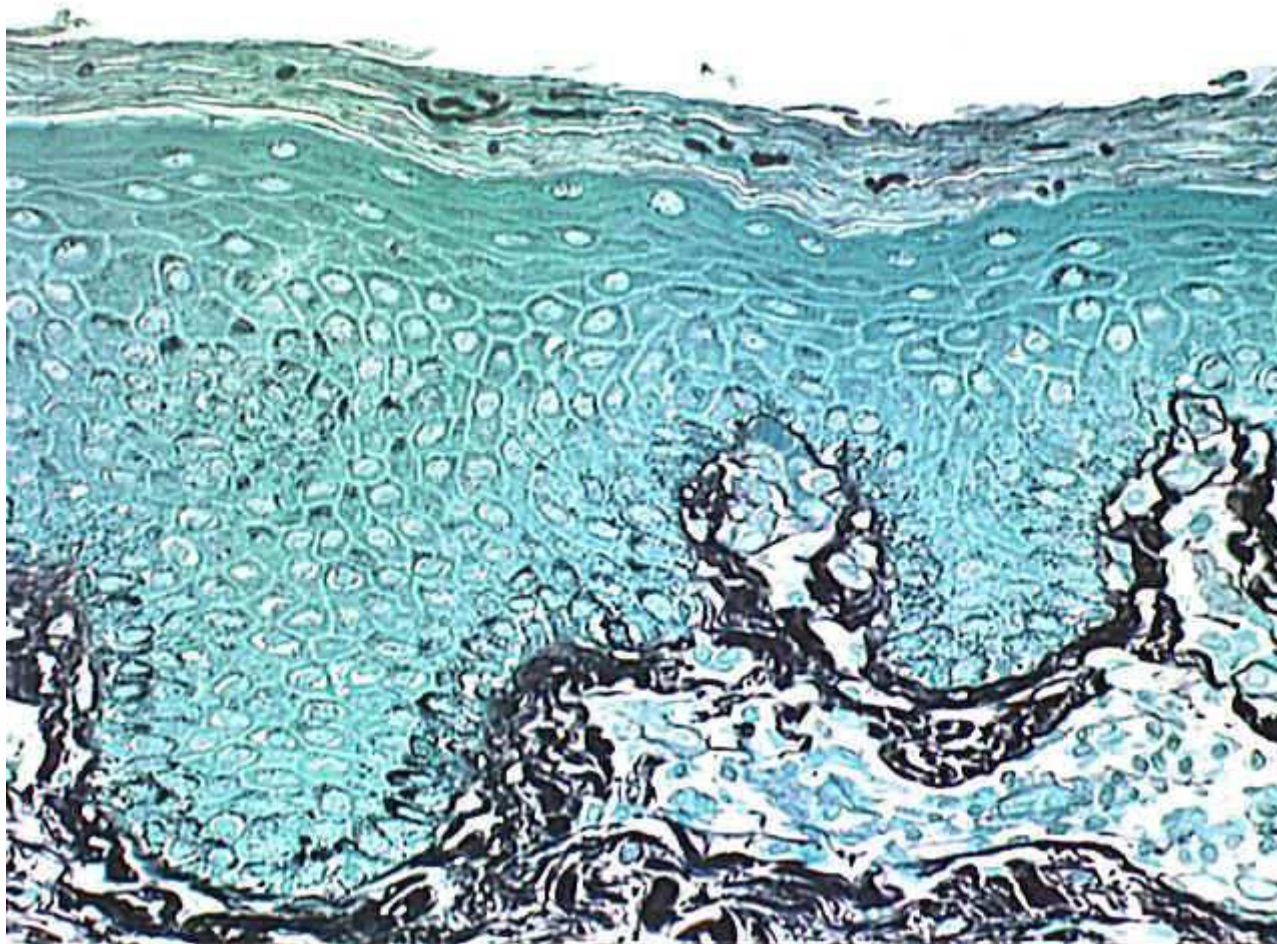
Gomori

Resultados



- Fibras de reticulina – preto
- Colagénio – cinzento/ púrpura escuro
- Fundo – verde (Verde luz) ou rosa (Kernechtrot)

Gomori Resultados



Gordon & Sweets

Protocolo



1. Permanganato de potássio acidificado
2. Lavar com água corrente
3. Ácido oxálico a 1%
4. Lavagem em água destilada
5. Alúmen de ferro a 2%
6. Lavagem em água destilada
7. Nitrato de Prata (extemporânea)
8. Lavagem em água destilada
9. Formaldeído neutro a 10%
10. Lavagem em água destilada
11. Cloreto de ouro a 0,2%
12. Tiosulfato de sódio a 5%
13. Lavagem em água destilada
14. Contraste

Gordon & Sweets

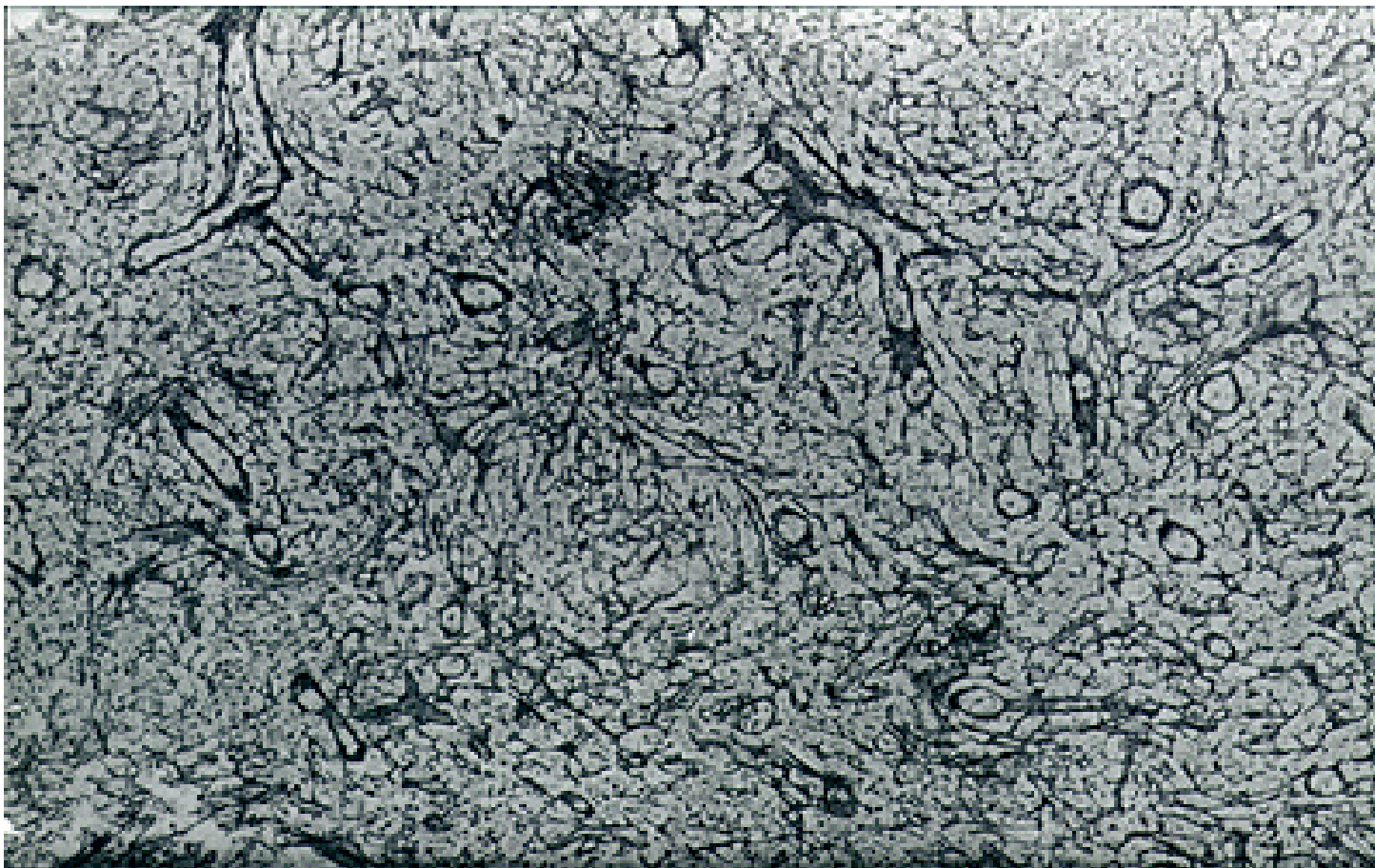
Resultados



- Fibras de reticulina – preto
- Colagénio – cinzento
- Fundo – verde (Verde luz) ou rosa (Kernechtrot)

Gordon & Sweets

Resultados



Prata Metenamina

Princípios Gerais



- Oxidação (Ácido periódico)
- Impregnação pela solução de prata metenamina
- Tonificação ou Aurificação
- Remoção da Prata não reactiva
- Contraste

Prata Metenamina



- Os carboidratos existentes nas fibras reticulares e membranas basais são oxidados por acção do ácido periódico obtendo-se grupos aldeídos
- A prata do complexo prata metenamina é reduzida, por acção dos grupos aldeído, a prata metálica visível

Periodic Acid Silver Methenamine Protocolo



1. Permanganato de potássio a 0,5%
2. Lavar com água destilada
3. Ácido oxálico a 5%
4. Lavagem em água destilada
5. Alúmen de ferro a 2%
6. Lavagem em água corrente
7. Solução de Prata Metenamina
8. Lavagem rápida em água destilada
9. Formaldeído neutro a 10%
10. Lavagem em água destilada
11. Cloreto de ouro a 0,2%
12. Hipobissulfito de sódio a 5%
13. Lavagem em água corrente
14. Contraste

P.A.S.M.

Resultados



- **Fibras de reticulina, membranas basais, micéto, bactérias** – preto
- **Colagénio** – cinzento/púrpura escuro
- **Fundo** – verde (Verde luz) ou rosa (Kernechtrot)

- Esta técnica é especialmente recomendada para a visualização da membrana basal em biópsias renais

RESUMO

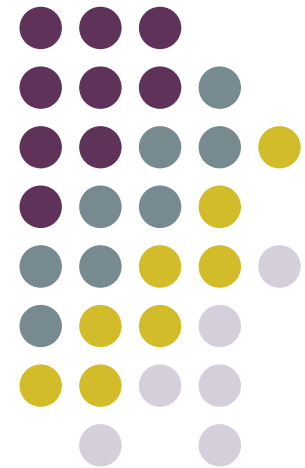


- Caracterização das fibras de reticulina
- Aplicação diagnóstica
- Gordon & Sweets
- Gomori P.A.S.M.

Fibras de elastina

Prof. Carina Ladeira

Abril de 2008





Fibras de elastina

- Apresentam alta refração, característica que as distingue das fibras de colagénio
- São geralmente mais finas que as fibras de colagénio
- Tem capacidade de deformação e retorno à forma original
- São acidófilas
- Principal componente é a glicoproteína estrutural elastina, que é resistente a diversas enzimas
- Além de formar fibras, a elastina apresenta-se na parede de algumas artérias como a aorta sob a forma de membranas elásticas fenestradas



Fibras de elastina

- Além das fibras elásticas típicas existem ainda as fibras elaunínicas e as oxitalânicas encontradas com menor frequência
- As fibras elaunínicas encontram-se na pele
- As fibras oxitalânicas encontram-se no ligamento periondotal e nos tendões
- As principais células produtoras de elastina são os fibroblastos e as células musculares dos vasos sanguíneos
- Síntese de pró-elastina que se polimeriza em elastina
- A.a. típicos da elastina: desmosina e isodesmosina
- Conferem a consistência elástica da elastina, 5x mais extensível que a borracha



Aplicação diagnóstica

- Demonstração do processo de atrofia
Ex.: casos de enfizema
- Alterações estruturais das fibras elásticas, como perda, quebra, estreitamento, separação, etc.
- Ex.: aterosclerose, aneurisma e outras patologias vasculares
- Nefroesclerose, enfisema pulmonar, degeneração elástica da pele, fibroelastose cardíaca e mesoaortite sífilítica

Fibras elásticas – Métodos de evidenciación



- Verhoeff
- Orceína
- Weigert



Fibras elásticas - Verhoeff

- Verhoeff 1908
- Método rápido para fibras elásticas
- Utiliza uma solução composta por hematoxilina combinada com iodo e cloreto férrico que irá sobrecolorar o tecido
- O cloreto férrico e a iodina funcionam como mordentes e secundariamente como oxidantes
- A iodina contribui para a retenção do corante nas estruturas afins durante o processo de diferenciação
- Utiliza um processo de diferenciação recorrendo a excesso de mordente

Verhoeff Protocolo



1. Solução de Verhoeff
2. Diferenciação com Cloreto férrico a 2%
3. Álcool a 95% ou Tiosulfato de sódio (remoção do excesso de iodo)
4. Contraste com Picrofucsina de Van Gieson

Verhoeff

Mecanismo



- Supõe-se que a reacção ocorre por ligações de hidrogénio, dado as propriedades corantes das fibras elásticas indicarem um tipo de ligação não-electroestática
- Supõe-se que os grupos químicos, presentes na elastina, responsáveis pela afinidade tintorial com a solução corante serão se desmosina, a isodesmosina e a n-5-aminolisina e a n – 5-carboxipentilisina

Verhoeff

Mecanismo



- A diferenciação recorre à utilização de excesso de mordente de modo a quebrar as ligações entre o tecido e a solução corante
- Dada a afinidade das fibras elásticas com a solução corante estas formam complexos insolúveis, resistindo à acção do diferenciador
- O contraste com Picrofucsina ne Van Gieson não poderá ser prolongado dado o Ácido pícrico actuar como diferenciador

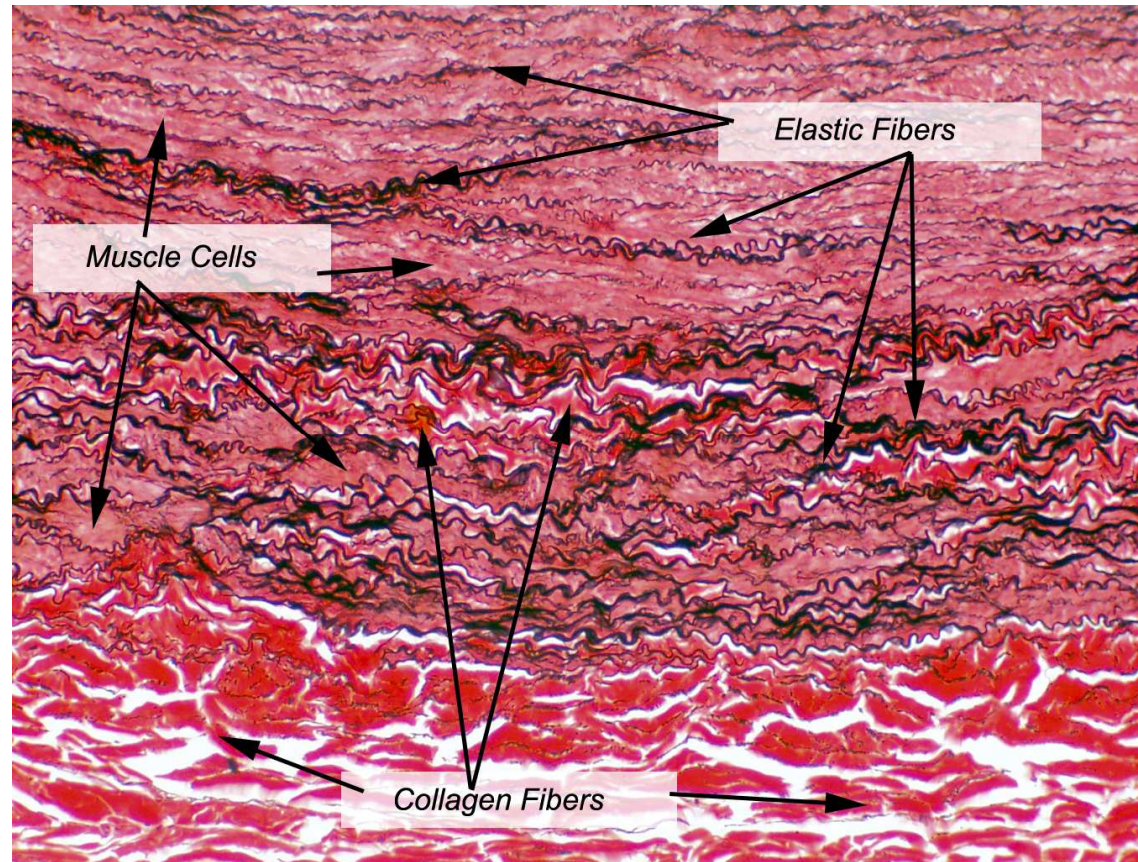
Verhoeff

Resultados

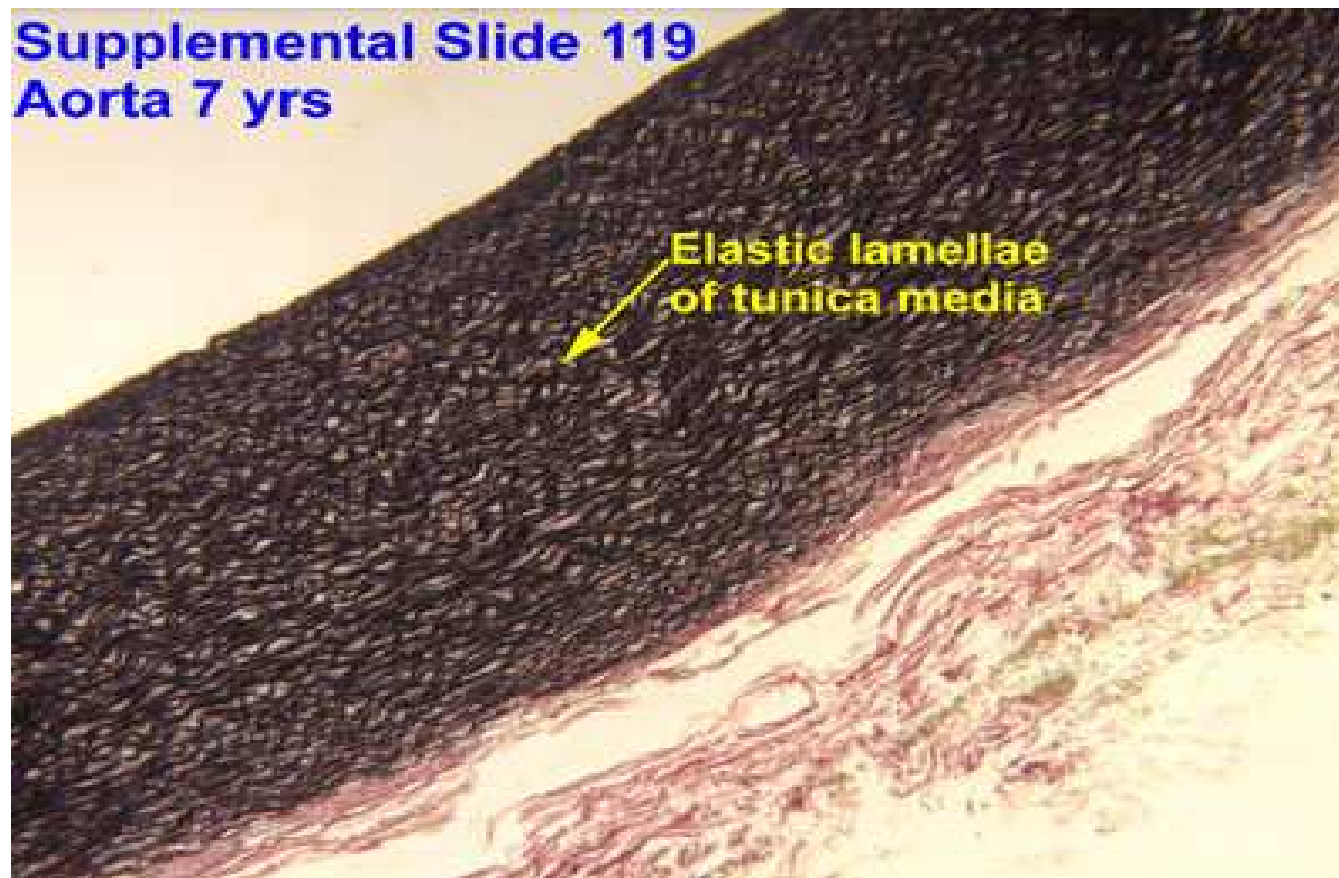


- Núcleos – azul escuro a negro
- Colagénio – vermelho
- Fibras elásticas – negro
- Músculo e eritrócitos - amarelo

Verhoeff Resultados



Verhoeff Resultados



Orceína



- Unna 1891
- É uma técnica usada na evidenciação de fibras elásticas preferencialmente no material de dermatologia (porque o Verhoeff mascara a melanina)
- Recorre à utilização de Orceína e como coloração utiliza o corante de Giemsa

Orceína

Protocolo



1. Solução de Orceína
2. Diferenciação em Álcool clorídrico a 1% (facultativo)
3. Lavagem em água corrente
4. Contraste com Picrofucsina de Van Gieson, Hematoxilina alumínica, Picrocarmim de índico, Azul de metileno

Orceína

Mecanismo



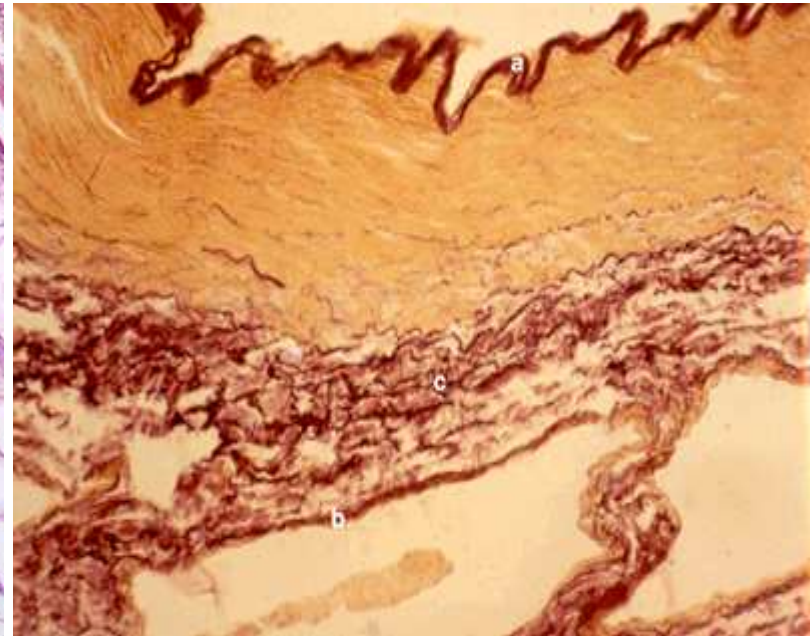
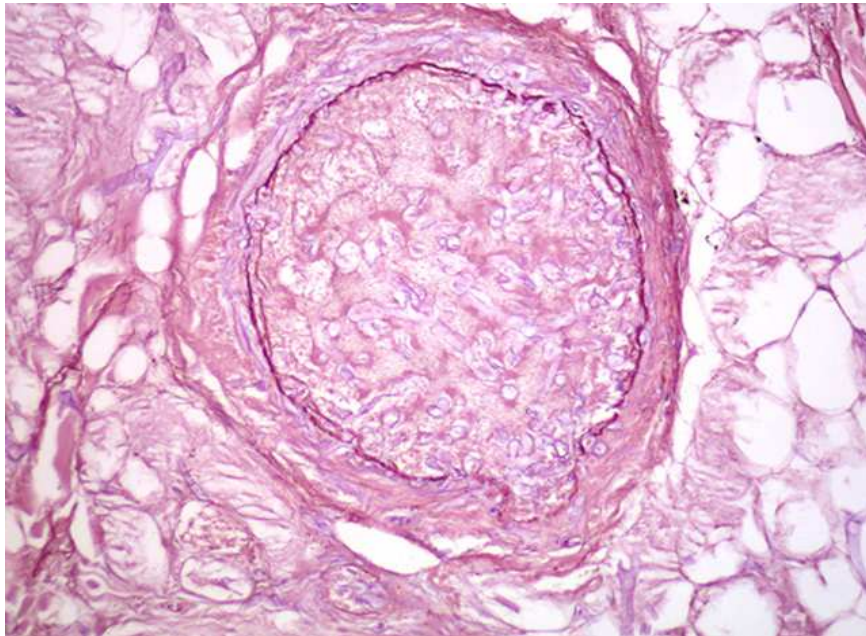
- Supõe-se que a ligação do corante ao tecido é da responsabilidade de forças não-iónicas provavelmente forças de Van der Waals

Orceína

Resultados



- Núcleos – roxos ou azuis
- Fibras elásticas – castanho escuro (canela)
- Restantes elementos – gradientes de azul



Weigert



- Weigert 1898
- Existem várias variações da técnica inicialmente proposta por Weigert (modificações por Hart, French e Sheridan)
- Técnica muito boa na demonstração de fibras elásticas finas

Weigert Mecanismo



- Baseia-se na afinidade das fibras elásticas para o corante que resulta da acção entre a Resorcina e a Fucsina básica na presença de cloreto de ferro
- Não é um método absolutamente específico, existem outras estruturas que podem ser coradas, tais como: colagénio e a membrana basal
- É imprescindível diferenciação cuidadosa de modo a obter uma marcação selectiva das fibras elásticas

Weigert Protocolo

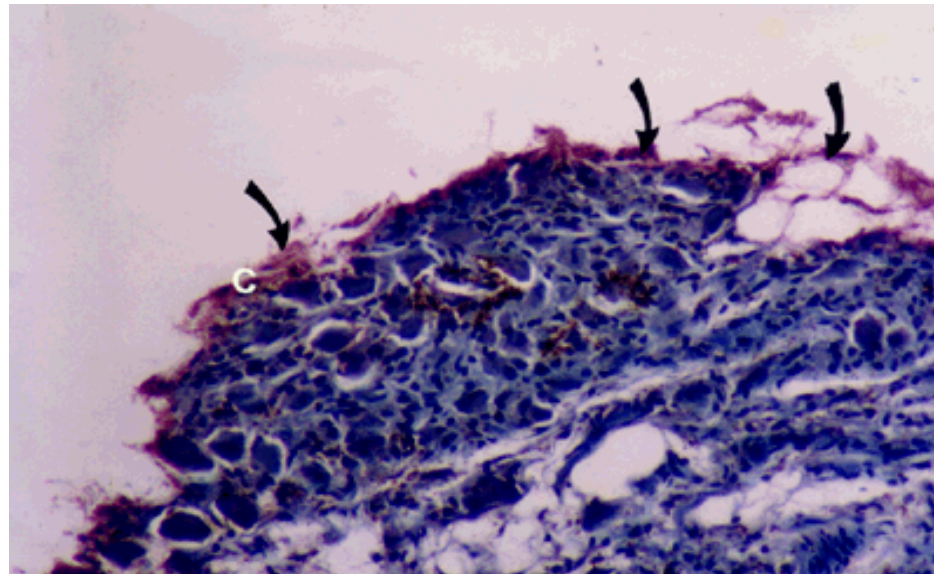


1. Ácido periódico 1%
2. Lavagem em água destilada
3. Solução alcoólica + Fucsina resorcina de Weigert
4. Lavagem em água destilada
5. Diferenciação com álcool ácido a 1%
6. Lavagem em água corrente e destilada
7. Contraste com Picrofucsina de Van Gieson, Eosina, Carmalum Mayer

Weigert Resultados



- Núcleos – vermelhos
- Fibras elásticas - púrpura



RESUMO



- Caracterização
- Aplicação diagnóstica
- Verhoeff
- Orceína
- Weigert