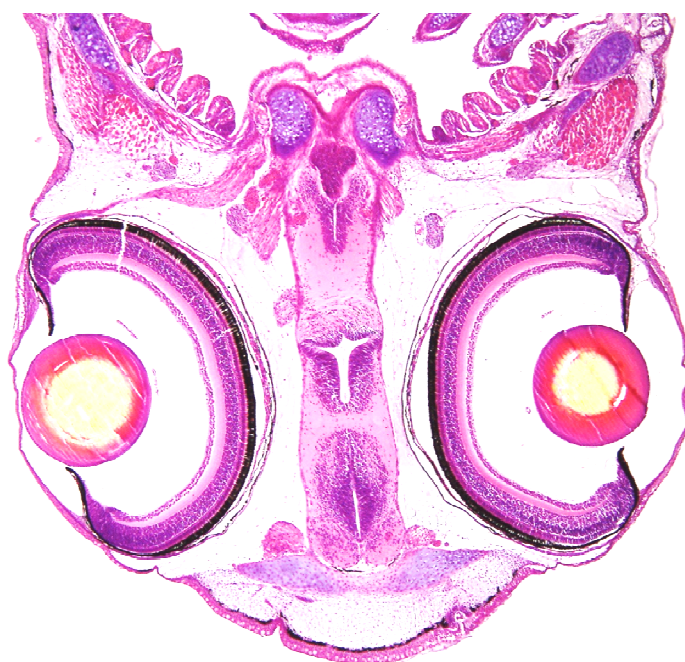


Curso de Técnicas Histológicas

Projeto Aprender a Conhecer o Ambiente Marinho de Portugal BioMar PT



Manual

Formadoras

Célia Lopes e Fernanda Malhão

Coordenação

Eduardo Rocha

Porto, Novembro de 2016



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA
E DO MAR



Índice

Processamento e Técnicas de Coloração para Microscopia Ótica	3
Congelação de Amostras para Microscopia Ótica	20
Processamento para Microscopia Electrónica de Transmissão (MET)	25
Técnicas de Imunohistoquímica	35
Técnicas de Colheitas e Processamento em Citologia	46
Bibliografia	57

Processamento e Técnicas de Coloração para Microscopia Ótica

Histologia

A Histologia (do grego hystos = tecido + logos = estudo) é o estudo dos tecidos biológicos, no que diz respeito à sua formação, estrutura e função.

As técnicas histológicas permitem a observação dos tecidos ao microscópio de modo a avaliar a sua morfologia e arquitetura, a diagnosticar diferentes patologias e até para identificar determinadas substâncias.

Para visualizarmos a morfologia e estudarmos a morfologia de tecidos biológicos a nível microscópico, estes devem passar por uma série de etapas. Estas técnicas compreendem a fixação dos tecidos, o processamento, a inclusão, a microtomia e a aplicação de determinadas colorações.

Fixação

O passo primordial e mais importante da técnica histológica é a fixação dos tecidos. A fixação deve ser realizada o mais rapidamente possível após a remoção dos tecidos.

Objetivo: evitar a destruição das células pelas suas próprias enzimas (autólise), ou por bactérias e/ou fungos (putrefação). Este processo vai permitir preservar os tecidos o mais próximo do *in vivo* para que depois seja feita a interpretação dos achados microscópicos.

Fixador:

Existem diversos fixadores disponíveis, cada um tem as suas vantagens e desvantagens, não sendo por isso possível escolher um fixador ideal. O fixador mais utilizado para microscopia ótica é o formaldeído. O formaldeído é um gás que em solução consegue atingir uma concentração máxima de 40%, solução à qual se dá o nome de formol ou formalina. Usualmente é usada na fixação uma solução de **formol tamponado a 10%, que corresponde a formaldeído a 4%**. O seu mecanismo de ação foi consiste em fixar e estabilizar as proteínas através de pontes de metileno que vão dar origem às ligações cruzadas entre as proteínas

Condições para uma fixação adequada:

- **Espessura:** se os fragmentos forem muito espessos o fixador não penetrará eficientemente, bem como o restante processamento histológico poderá ficar comprometido. A espessura ideal dos fragmentos é cerca de 3 mm. Quando estivermos perante um órgão de maiores dimensões, este deve ser seccionado de maneira a obtermos fragmentos da espessura recomendadas. Se possível a fixação deve ser feita com os fragmentos já seccionados. Por vezes, esta tarefa não é tão simples, pois os órgãos antes da fixação têm uma consistência muito mole, o que dificulta o corte. No entanto, após estarem em fixador há

cerca de uma hora, já facilita o corte, possibilitando também uma melhor fixação.

- **Tamanho:** O tamanho dos fragmentos vai depender muito do objetivo do estudo a ser realizado, mas este não deve ultrapassar as dimensões dos moldes utilizados para a inclusão ou das cassetes (caso o de o processamento ser feito num processador de tecidos).
- **Volume de fixador:** o volume ideal é 10 a 20 vezes o volume dos fragmentos a serem fixados.
- **Duração:** da fixação: 24 a 48 horas habitualmente. Após o término da fixação é aconselhável processar os fragmentos ou transferi-los para etanol a 70% caso seja necessário armazená-los por mais tempo. O etanol a 70% é uma solução de armazenamento adequada uma vez que não vai alterar os resultados histoquímicos e imunohistoquímicos.



Figura 1 - Cassetes histológicas contendo fragmentos de tecidos para serem processados. As cassetes devem ser identificadas à lápis de maneira a sabermos o que consta no seu conteúdo. As cassetes são fechadas e seguem o restante processamento.

Processamento histológico

Objetivo: Impregnar o tecido num meio sólido e firme o suficiente para permitir a obtenção de cortes finos que possam ser corados e visualizados no microscópio ótico.

O processamento de tecidos é composto por diferentes etapas:

a) Desidratação

Objetivo: Remover água e fixador do tecido substituindo-os pelo reagente desidratante. Como a parafina não é miscível com fixadores aquosos, há necessidade de primeiramente remover toda a água dos tecidos.

O agente desidratante mais utilizado é o etanol, sendo que a desidratação é feita em soluções de etanol de concentração crescente, para que não seja uma desidratação brusca nos tecidos que pode levar a distorção da morfologia dos tecidos.

b) Diafanização

Objetivo: remover agente desidratante (etanol) substituindo por um fluido miscível com o meio de impregnação (parafina líquida).

O xilol é o solvente utilizado nesta etapa, atua como um agente intermédio entre o etanol e a parafina já que é solúvel em ambos. Finalmente é feita a impregnação em parafina, que será o meio que confere suporte ao tecido.

c) Impregnação

Objetivo: Substituir o agente diafanizador pelo meio de impregnação.

A impregnação é feita em parafina no estado líquido. Para que a parafina esteja no estado líquido esta deve ser aquecida a 58-60°C (temperatura acima do seu ponto de fusão que ronda 56-58°C).

Processamento manual vs. automático

O processamento histológico pode ser feito manualmente onde os solventes são removidos e substituídos pelo solvente seguinte, ou pode ser feito num aparelho denominado processador automático de tecidos. Neste aparelho as cassetes contendo os fragmentos a serem processados são colocadas num cesto, que é colocado no processador de tecidos e este é programado para trabalhar de acordo com o desejado. Este cesto movimenta-se de maneira a mergulhar os fragmentos nos diferentes solutos do processamento. Conforme indica a figura 2, os tecidos passam por sucessivos banhos, no caso da desidratação com uma graduação crescente da percentagem de etanol, de forma a minimizar a agressividade para os tecidos. Reparem que alguns banhos são múltiplos, como o álcool 99%, xilol e parafina. Os banhos múltiplos aumentam a eficácia do processamento, atendendo que no final do primeiro banho pode ainda haver alguns vestígios do reagente do banho anterior, facto que é eliminado com o banho seguinte.

O tempo em cada um dos regentes pode ser variável, no entanto, 1h por cada banho (à exceção da fixação que era feita a priori durante 24-48 h) é por norma suficiente para um bom processamento.

Após o término do processamento, os tecidos estão prontos para a próxima etapa: a inclusão.



Figura 2 - Esquema representativo do processamento de tecidos biológicos num processador automático.

Inclusão em parafina

Objetivo – obtenção de um bloco facilmente manejável que permite a obtenção de cortes de qualidade sem destruição do tecido. Deste modo os tecidos são envolvidos num meio que lhes irá conferir suporte, sendo esse meio a parafina.

Aparelhos de inclusão

Para a inclusão existem aparelhos que facilitam este processo, chamados aparelhos de inclusão (figura 3).

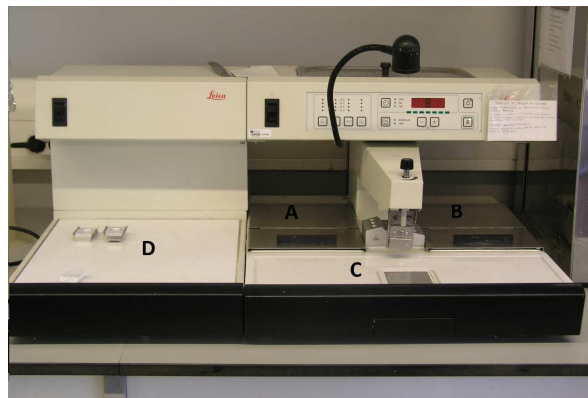


Figura 3 - Aparelho de inclusão. (A) área quente para moldes; (B) área quente para cassetes; (C) área quente para manipulação dos fragmentos; (D) placa fria.

A orientação do fragmento durante a inclusão é importante para a demonstração correta da morfologia do tecido. Uma orientação incorreta pode resultar no dano do tecido durante a microtomia ou pode levar a que a área de interesse não esteja presente no corte.

No que diz respeito à orientação dos fragmentos, de forma geral deve ter-se os seguintes cuidados:

- Devem ser utilizadas sempre pinças aquecidas de modo a que os fragmentos não fiquem colados à parafina solidificada;
- O(s) fragmento(s) deve(m) ocupar a parte central do molde;
- A face do fragmento que se quer cortar deve estar voltada para baixo;
- Deve ser feita ligeira pressão no fragmento de modo a que este esteja todo no mesmo plano;

Depois de orientados os fragmentos, os moldes devem ser passados para a placa fria de modo a solidificar a parafina, pressionando-se ligeiramente os fragmentos para estes ficarem no mesmo plano. Deve ter-se o cuidado de após a orientação dos fragmentos não voltar a colocar os moldes na placa quente para que os fragmentos não se desloquem. De seguida deve ser colocada a cassette correspondente àquela amostra, de modo a que posteriormente o bloco fique identificado. Deve preencher-se com parafina de forma que esta cubra a cassette, sendo depois os moldes transferidos para a placa fria

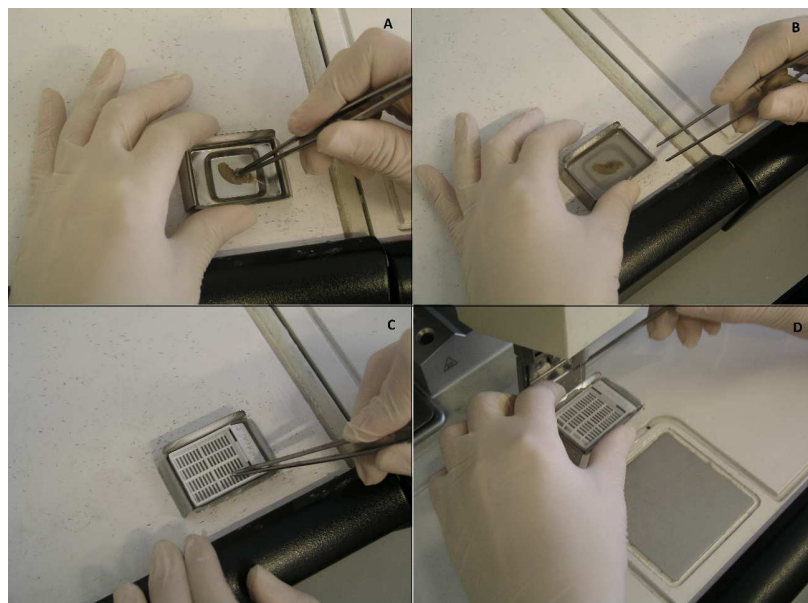


Figura 4 - (A) Orientação dos fragmentos na placa fria; (B) Fragmento orientado onde é possível ver a parafina a solidificar; (C) Colocar a cassette correspondente aos fragmentos sobre o molde; (D) Preencher com parafina.

até que solidifiquem por completo.

Depois de solidificados os blocos podem ser desenformados.

Microtomia de blocos de parafina

Objetivo – fazer cortes finos (3-4 μm) dos tecidos e aderi-los a uma superfície (lâmina de vidro) para que seja possível a observação ao microscópio.

Para a realização de cortes de parafina são necessários:

- Micrótomo - variam consoante a zona que se movimenta. O mais usado é o micrótomo tipo Minot que se baseia no movimento e avanço do bloco face a uma superfície de corte estacionária;
- Banho frio – tina de água fria onde os cortes flutuam, de modo a seleccionar o melhor e corte e remover as pregas de maior tamanho;
- Banho quente – tina de água quente (cerca de 50-55°C) onde se vão remover as pregas mais pequenas;
- Lâminas – superfície onde os cortes vão ficar aderidos, permitindo assim realizar as técnicas pretendidas; as lâminas devem ser identificadas da mesma forma que o bloco.



Figura 5 - Material necessário para a realização de cortes de parafina: (A) micrótomo; (B) banho frio; (C) banho quente.

A microtomia tem várias fases:

a) Desbaste dos blocos

- Realizado a cerca de 30 μm ;
- O objetivo é remover a parafina que está em excesso, expondo toda a superfície do tecido.
- À medida que os blocos são desbastados são colocados na placa fria.

b) Corte

- É necessário que os blocos estejam gelados;
- Realizado a cerca de 3 μm de espessura;
- Utilizar uma faca nova ou com uma zona da faca que ainda não foi usada;
- Os cortes devem formar uma ténia que é transferida para o banho frio (figura 14).

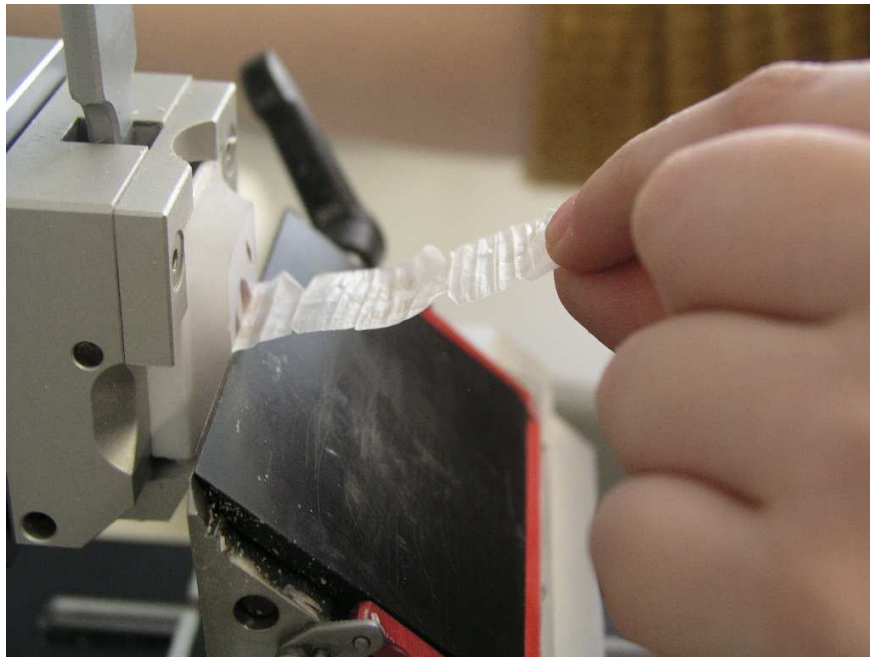


Figura 6 - Corte de fragmentos incluídos em parafina.

c) Extensão

- O objetivo é selecionar o melhor corte e eliminar as pregas existentes;

- Primeiro é usado um banho frio, onde se selecionam os cortes e se retiram as pregas maiores com a ajuda de um pincel;
- Recolhe-se os cortes com uma lâmina
- Transferência dos cortes para um banho quente (cerca de 55°C) de modo a eliminar as pregas mais pequenas e para que estes fiquem aderidos à lâmina.

d) Secagem e adesão dos cortes à lâmina

- Os cortes são colocados em suportes para que possam secar na estufa a 60°C durante pelo menos 30 minutos;
- O objetivo é realizar a adesão dos cortes à lâmina de modo a que estes não descolem nas etapas seguintes;
- Caso os cortes não sejam necessários de imediato podem ser colocados na estufa a 37°C até à sua utilização.



Figura 7 - Extensão de cortes de parafina. (A) ténia a flutuar no banho frio; (B) Seleção e apanhar do melhor corte; (C) Transferência para o banho quente; (D) Corte aderido à lâmina.

Coloração em cortes de parafina

Objetivo - Evidenciar os componentes tecidulares ou fazer a distinção entre diferentes estruturas do tecido.

Hematoxilina-Eosina (HE)

Objetivo - coloração de rotina em histologia, uma vez que consiste numa técnica simples que permite a diferenciação de um grande número de estruturas do tecido.

Princípio da coloração:

- Hematoxilina cora os núcleos de roxo-azulado;
- Eosina cora os citoplasmas e fibras do tecido conjuntivo de rosa/alaranjado.

Hematoxilina

Extraída de uma árvore, a *Haematoxylon campechianum*, mas também pode ser produzida de forma sintética.

Por si só não cora, mas sim o seu produto oxidado → Hemateína.

Hemateína tem pouca afinidade para os tecidos → é necessário usar um mordente (alumínio, ferro, tungsténio...).

O mordente vai facilitar a ligação do corante à estrutura a ser corada. Neste caso o mordente confere carga positiva ao complexo corante-mordente, logo vai permitir que este complexo se ligue às estruturas aniónicas (ácidas) do tecido (núcleo).

Existem diversos tipos de hematoxilina, sendo as mais usadas as de hemalúmen (mordente é o alumínio). Dentro desta também existem vários tipos de hematoxilina:

- Mayer;
- Harris;
- Gill;

A hematoxilina pode ser utilizada de duas formas:

- Regressiva – Deixa-se mais tempo na hematoxilina, ficando o tecido sobrecolorado. É necessário posteriormente diferenciar (solução de ácido clorídrico a 0.5% em álcool a 70%);

- Progressiva – Deixa-se os cortes na hematoxilina apenas o tempo suficiente para que os núcleos sejam corados.

Eosina

Distingue o citoplasma de diferentes células e diferentes tipos de fibras do tecido conjuntivo;

Eosina Y é a mais utilizada que pode ser:

- Alcoólica;
- Aquosa a 1%.

HEMATOLINA-EOSINA – cortes de congelação

Coloração

- Lavar em água destilada
- Hematoxilina de Mayer– 2 minutos.
- Lavar em água corrente – 2 minutos.
- Eosina Y aquosa a 1% – 1 minuto.
- Passar por água corrente (rapidamente para não descorar).

Desidratação

Álcool absoluto I.
Álcool absoluto II.

Diafanização

Xilol I.
Xilol II.

Montagem

Após a coloração podemos obter uma preparação definitiva através da montagem da lâmina. Para tal é colocada uma gota de meio de montagem sobre o corte, que depois é coberto com uma lamela.

Como meio de montagem pode ser utilizado DPX ou Entellan, tendo o cuidado de evitar que se formem bolhas de ar.

HEMATOLINA-EOSINA – cortes de parafina

Desparafinação

Xilol I – 10 min.

Xilol II – 5 min.

Hidratação

Álcool absoluto – 5 min.

Álcool 95° – 5 min.

Álcool 70° – 5 min.

Água corrente – 5 min.

Coloração

Hematoxilina de Mayer – 2 min.

Lavar em água corrente – 5 min

Diferenciar em solução diferenciadora (HCl 0.5% em etanol 80%) – mergulho rápido.

Lavar em água corrente – 5 min.

Eosina Y aquosa a 1% – 1 min.

Passar por água corrente (rapidamente para não descorar).

Desidratação

Álcool absoluto I.

Álcool absoluto II.

Álcool absoluto III.

Diafanização

Xilol I.

Xilol II.

Montagem

Após a coloração podemos obter uma preparação definitiva através da montagem da lâmina. Para tal é colocada uma gota de meio de montagem sobre o corte, que depois é coberto com uma lamela.

Como meio de montagem pode ser utilizado DPX ou Entellan, tendo o cuidado de evitar que se formem bolhas de ar.

Colorações Histoquímicas

A histoquímica é, de forma lacónica, uma técnica que utiliza corantes que se ligam a determinados componentes do tecido, permitindo a visualização de diversos componentes de células e ou tecidos. A própria coloração de hematoxilina- eosina é uma coloração histoquímica.

Existem diversas colorações que podem ser aplicadas nos tecidos, existindo colorações para evidenciar vários componentes dos tecidos, microorganismos como bactérias e fungos, e ainda atividade de algumas enzimas.

As técnicas histoquímicas podem ser aplicadas em lâminas citológicas, em cortes de congelação e cortes de parafina. Relembremos que no caso dos cortes de parafina, estes devem ser desparafinados e hidratados antes de proceder à coloração.

Seguidamente, pode encontrar alguns exemplos de aplicações de técnicas histoquímicas.

Técnicas que evidenciam mucinas:

Azul de alcião

O azul de alcião é um corante básico que tem afinidade para componentes aniónicos como as mucinas ácidas. Este corante é comumente utilizado a um pH 2.5, no entanto por vezes utiliza-se pHs diferentes para identificar subgrupos de mucinas ácidas.

PAS

Muito utilizada para a identificação de mucinas neutras e glicogénio. Baseia-se na oxidação de pentoses pelo ácido periódico, com consequente formação de grupos aldeídos livres que reagem com o reagente de Schiff, resultando num precipitado de cor magenta. Quando se pretende evidenciar glicogénio, faz-se uma prévia digestão enzimática por diastase, enzima que vai digerir o glicogénio. Normalmente aplica-se em cortes consecutivos um com PAS e outro com PAS com diastase.

Azul de alcião/PAS (técnica realizada na aula pratica, o seu protocolo encontra-se no fim desta secção)

Técnicas que evidenciam lípidos

Exemplos destas técnicas são: **Oil Red O** e **Sudão Negro**, sendo corantes lipofílicos, são utilizados para demonstrar lípidos (normalmente em cortes de congelação).

Técnicas que evidenciam constituintes do tecido conjuntivo

Fibras reticulares:

Reticulina e Gordon and Sweet's são dois exemplos.

Fibras Elásticas:

Orceína e Elastina

Distinção entre tecido conjuntivo e tecido muscular:

Tricrómio de Masson

Técnicas que evidenciam constituintes do tecido nervoso

Violeta de Cresil, Kluver Barrera e Bielschowsky são exemplos destas técnicas.

Técnicas que evidenciam pigmentos

Uma das técnicas mais utilizadas é o Masson Fontana para a identificação da melanina. A melanina possui uma capacidade intrínseca de reduzir a prata em prata metálica, aparecendo evidenciada por um precipitado preto.

Técnicas que evidenciam metais

Reação de Perl's: identificação de íons de ferro presentes na hemosiderina.

Rodanina: identificação de cobre

Von Kossa: identificação de cálcio

Vermelho de Alizarina: identificação de cálcio

Técnicas histoenzimáticas

Estas técnicas são utilizadas em cortes de congelação e baseiam-se em reações enzima/substrato que geram compostos com cor.

Técnicas que evidenciam microorganismos:

Gram

O método de Gram permite classificar as bactérias em Gram positivas e Gram negativas. É baseado na capacidade de certas bactérias reterem o complexo violeta de cristal-iodo após diferenciação e uma contração com um corante básico. Esta diferença reside na composição diferencial dos dois tipos de bactérias.

O procedimento envolve a aplicação de uma solução aquosa de violeta de cristal seguida de uma solução de iodo. Todas as bactérias apresentam uma coloração preta-azulada. Com a aplicação de uma solução diferenciadora, a acetona, algumas bactérias retêm a cor (Gram-positivas) enquanto outras não, ficando incolores (Gram-negativas). Seguidamente é aplicado um contrastante como a safranina, ficando as bactérias Gram-negativas coradas de vermelho.

Ziehl- Neelsen

O princípio do método Ziehl-Neelsen baseia-se na permeabilidade selectiva da parede celular e nas propriedades ácidas dos ácidos micólicos presentes na parede celular das micobactérias. Para facilitar a penetração da fucsina básica é aquecida, seguidamente aplica-se uma solução álcool-ácido. Neste passo todos os componentes do tecido, excepto os álcool-ácido resistentes, ficam incolores. O contrastante, usualmente, utilizado nesta coloração é o azul de metileno (solução diluída) que cora os núcleos com um tom azulado suave.

Grocott

O princípio do método é baseado no alto teor de glícidos presente na parede dos fungos e nas suas propriedades argentafins. Grupos aldeídos formados numa etapa de são capazes de reduzir catião prata a prata metálica, a qual deposita nas vizinhanças dos grupos aldeído.

Neste método é usado o verde luz como contrastante. Os fungos aparecerem delineados a preto, sendo o interior cinzento.

PAS (Periodic Acid Schiff)

Esta técnica também evidencia os fungos devido ao alto teor de glícidos presentes na parede dos fungos.

Azul de alcião – PAS (Periodic Acid-Schiff)

Técnica:

Desparafinação

Xilol I – 10 min.
Xilol II – 5 minutos.

Hidratação

Álcool absoluto – 5 min.
Álcool 95° – 5 min.
Álcool 70° – 5 min.
Água corrente – 5 min.

Coloração

Passar por água destilada.
Corar com o azul de alcião – 10 minutos.
Passar por água destilada.
Oxidar pelo ácido periódico a 0,5% – 10 minutos.
Água corrente – 5 minutos.
Passar por água destilada.
Reagente de Schiff – 15 minutos.
Lavar com água corrente.
Corar com hematoxilina de Mayer – 1 minuto.
Lavar com água corrente – 5 minutos.

Desidratação

Álcool absoluto I.
Álcool absoluto II.
Álcool absoluto III.

Diafanização

Xilol I.
Xilol II.

Montagem

Resultados:

Núcleos.....azul/roxo

Mucinas ácidas.....azul

Glicogénio e mucinas neutrasmagenta

Congelação de Amostras para Microscopia Ótica

Congelação de amostras para microscopia ótica

São um conjunto de métodos em que o frio (congelamento) é utilizado como meio para fornecer suporte para a realização de cortes histológicos. Resumidamente, o procedimento consiste em congelar o tecido biológico, transformando a água intracelular em gelo. Os tecidos ficam firmes e consistentes, funcionando o gelo como meio de inclusão. Em geral a morfologia dos tecidos é pior do que a dos cortes de parafina porque a congelamento dos tecidos tende a levar à formação de cristais de gelo no interior dos tecidos. No entanto, permitem a aplicação de técnicas que são inviabilizadas pelo processamento histológico e permitem a obtenção de cortes mais rapidamente.

São aplicações dos cortes de congelamento:

- Produção rápida de cortes histológicos ex. para exames intraoperatórios;
- Métodos de imunofluorescência;
- Diagnóstico e histoquímica enzimática: preservação de enzimas ou compostos enzimáticos, que de outra forma se podem difundir, dificultando a sua demonstração histoquímica;
- Imunohistoquímica: preservação dos epítomos antigénicos, sendo estes protegidos do calor e da fixação que podem destruí-los ou inativá-los;
- Demonstração de alguns carboidratos e de lípidos;

Quando o objectivo é preservar a morfologia dos tecidos pode recorrer-se a dois tipos de métodos:

- Congelamento rápido
- Fixação e crioproteção

No entanto, os dois métodos poderão não ser adequados para todas as aplicações.

Congelamento rápido

É um processo que é mais rápido do que o processamento para parafina, e não envolve a utilização de soluções fixadoras e produtos químicos. Assim, é possível obter diagnósticos histológicos de forma mais rápida e permite a realização de técnicas que são inviabilizadas pela fixação e processamento para parafina.

O objectivo da congelamento rápido de amostras é limitar ao máximo a formação de cristais de gelo, controlando a temperatura de congelamento. A quantidade dos cristais e o tamanho destes é proporcional à velocidade a que o tecido é congelado. Estes surgem, microscopicamente, como buracos (onde anteriormente estiveram os cristais,

em gelo). Desta forma, os melhores cortes de congelação são aqueles em que a congelação do tecido é mais rápida.

A técnica mais regularmente utilizada para a congelação rápida é a que usa isopentano arrefecido em azoto líquido. Utilizar azoto líquido de forma isolada, apresenta algumas desvantagens. O azoto líquido borbulha em contacto com a amostra, e o azoto em forma gasoso dificulta o arrefecimento rápido da amostra. Esta desvantagem pode levar à produção de artefactos de congelação, dificultando a interpretação dos resultados. No entanto, este problema pode ser ultrapassado, congelando o tecido num agente que possua alta condutividade térmica: o isopentano. Este é arrefecido por imersão em azoto líquido (a cerca de -160°C). Coloca-se um recipiente com isopentano num recipiente com azoto líquido e quando a temperatura do isopentano desce até à temperatura pretendida (começa a flocular no fundo do recipiente), o fragmento é imerso no isopentano. As principais vantagens deste método são a rapidez e a amplitude de aplicações, que é maior do que na fixação com criopreservação, permitindo, por exemplo, a realização de técnicas de histoenzimologia. No entanto a morfologia é, em geral, é inferior.

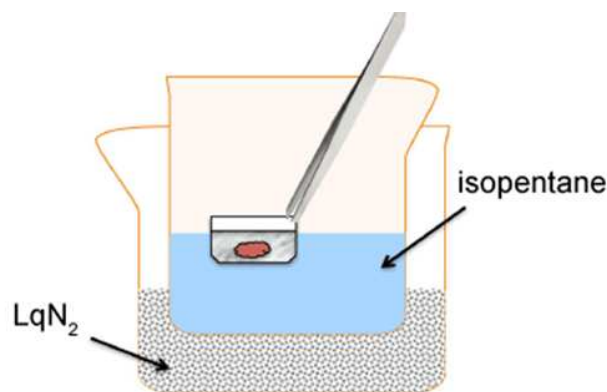


Figura 1 - Congelação de amostras em isopentano arrefecido com azoto líquido.

Fixação e crioproteção

São métodos em que a amostra é fixada -normalmente com formaldeído, paraformaldeído ou PLP (Paraformaldehyde/Lysine/Periodate)- e posteriormente infiltrada com um agente crioprotetor. Os agentes crioprotetores aumentam a qualidade da congelação diminuindo a formação de cristais de gelo. Estes agentes aumentam a viscosidade quando sujeitos a temperaturas muito baixas (negativas), levando à diminuição da mobilidade das moléculas de água e baixam a temperatura de congelação. Os agentes crioprotetores mais utilizados em histologia são a sacarose e o glicerol. A infiltração normalmente é feita a 4°C em soluções contendo 15-30% de sacarose em tampão fosfato, até o tecido afundar. O glicerol normalmente é usado em

soluções de 20%, também tamponadas. Em termos de morfologia normalmente estes métodos são superiores à congelação de tecidos frescos, dado que são menos propensos à formação de cristais de gelo. Podem ser utilizados quando o intuito é a realização de imunohistoquímica ou imunofluorescência, embora devido à fixação possa ser necessário realizar recuperação antigénica e também para hibridização in situ. Têm a desvantagem de ser mais demorados do que a congelação de tecido fresco e de normalmente a realização de cortes histológicos ser mais difícil.

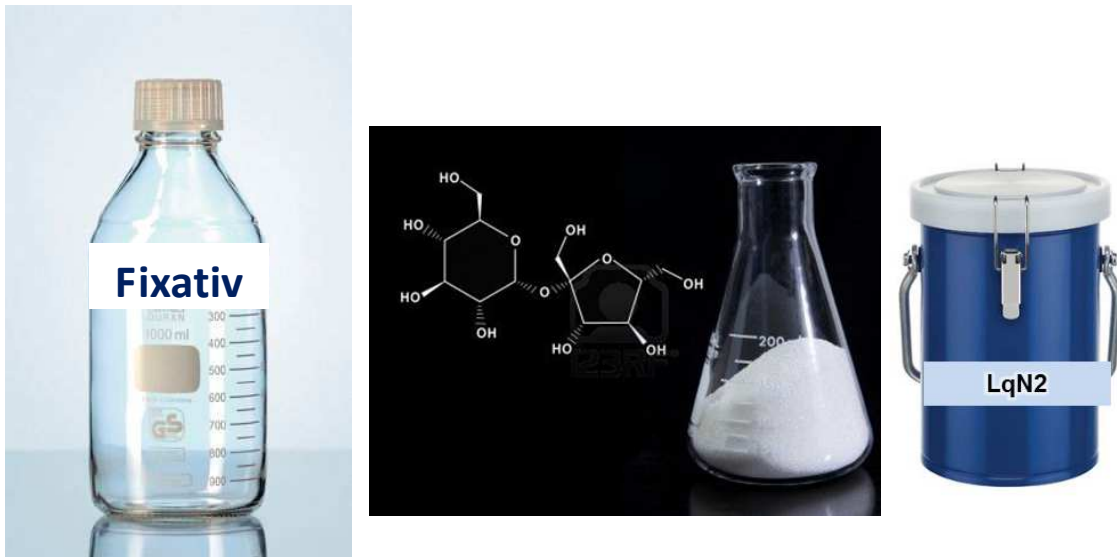


Figura 2- Etapas na congelação com crioproteção: fixação, infiltração com agente crioprotetor, congelação.

Crióstato

O crióstato é o aparelho fundamental para a obtenção de cortes de congelação. Basicamente consiste num micrótomo que se encontra dentro câmara refrigerada. Os controlos mecânicos do crióstato são manipulados do exterior dessa câmara. Utilizam-se facas descartáveis específicas (e.x.C35-Feather). Para cada tipo de amostra existe uma temperatura de corte ideal e existem tabelas com as temperaturas para cada tipo de tecido. Depois de realizado o corte, este é facilmente “apanhado” encostando ao corte uma lâmina que se encontra à temperatura ambiente. A atração eletrostática juntamente com o facto da lâmina estar mais quente, faz com que o tecido adira imediatamente à lâmina. Os cortes de criostato, depois de secos à temperatura ambiente, podem ou não ser fixados por outros métodos dependendo da aplicação pretendida.

Tissue Type	Working Temperature
Brain	-12 °C
Liver	-14 °C
Lymph Node	-14 °C
Kidney	-16 °C
Spleen	-16 °C
Muscle	-20 °C
Thyroid	-20 °C
Skin	-25 °C
Breast	-25 °C
Breast with Fat	-30 °C or below
Adipose Tissue	-30 °C or below
Fixed Tissue	-12 °C to -17 °C

Figura 3 - Tabela com as temperaturas ótimas para corte em crióstato de diversos tecidos.

OCT

É o nome genérico dado ao agente utilizado como meio de inclusão para os cortes de congelação. Da sigla, optimum cutting temperature, que é o agente protetor mais comumente utilizado nos laboratórios de histologia na rotina. É uma solução aquosa composta por Polyvinylalcohol e Polyethyleneglycol, que, proporciona ao tecido uma matriz de suporte que possibilita o corte de congelação.

Processamento para Microscopia Electrónica de Transmissão (MET)

Amostragem do material biológico

A colheita do material deve ser muito rápida. Os fragmentes devem ser muito pequenos ($0.5-1 \text{ mm}^3$) para permitirem a penetração dos fixadores, sendo cortados já em gotas de fixador.

Nota: Nunca devemos deixar os fragmentos secarem durante o processamento !!!

Fixação

Objetivo: estabilização das estruturas celulares sem alterações morfológicas

Em MET é utilizada uma dupla fixação, normalmente de forma sequencial, com :

- Fixador primário - **Glutaraldeído** ou uma mistura de paraformaldeído/glutaraldeído (penetra mais rapidamente e estabiliza as moléculas por ligações cruzadas)
- Fixador secundário – **Tetróxido de ósmio**; penetra e reage mais lentamente, melhor fixador para lípidos (osmiofílicos). Ósmio é um metal pesado (confere contraste as estruturas a que se liga)

O aldeído estabiliza os componentes proteicos e o ósmio os organelos membranosos.

Desidratação

Consiste em remover a água celular substituindo-a gradualmente por uma série ascendente de álcoois. Os agentes desidratantes mais utilizados são: acetona ou etanol em água destilada: 50%; 70%; 90%; 95%; 100% (x 2).

Impregnação

Consiste na substituição do agente de desidratação pela resina utilizada na inclusão (Epon), sendo necessário o uso de um solvente intermediário, o óxido de propileno, uma vez que este é melhor solvente da resina do que o etanol. Devido à viscosidade da resina, esta é introduzida nos progressivamente fragmentos, ou seja, quantidades de resina cada vez maiores.

Inclusão

A inclusão tem como objetivo dar suporte físico e consistência ao fragmento de modo a ser possível prender o bloco ao porta-blocos do ultramicrotomo e permitir o corte de cortes semi-finos e ultra-finos. A inclusão é feita em moldes de borracha que são previamente identificados. Os blocos necessitam de ir a com a estufa a 60°C durante 48 horas para polimerização.

Soluções

Tampão Cacodilato de Sódio

Preparar a solução stock de tampão Cacodilato de Sódio 0.4 M
- 42,8g de cacodilato de sódio em 500 ml de água destilada.

Soluções de trabalho:

A partir desta solução diluir para 0,1 M e 0,2 M consoante a necessidade, deve ser acertado o pH para 7.2-7.4 antes de perfazer o volume final.

Nota: Para peixes de água doce normalmente usamos 0.1 M.

Epon

Epon A

62 ml Epikote ou Glycidether 100.
100 ml DDSA.

Misturar bem ao longo do dia em agitador magnético, guardar a 4°C.

Epon B

100 ml Epikote ou Glycidether 100.
89 ml MNA.

Misturar como o anterior e guardar a 4°C.

As soluções A e B podem ser guardadas a 4°C durante cerca de 3-4 meses.

Epon final

Para um volume total de 50 ml de Epon final:

24 ml Epon A.

26 ml Epon B.

1 ml DMP-30.

Colocar um agitador durante cerca de 30 minutos.

Protocolo de Processamento para MET

Fixação

Glutaraldeído 2.5% em Tampão Cacodilato (0.1 M, 4°C): 2 horas a 4°C.

(2h) Início _____ Final _____

Lavagens com Tampão Cacodilato 0,1 M a 4°C; Fazer mudanças de tampão a 4°C. (*).

(30') Início _____ Final _____

(30') Início _____ Final _____

Pós-Fixação

Tetróxido de ósmio a 1% em tampão Cacodilato (0.1M concentração final) 4°C:

(2h) Início (4°C) _____ Final _____

Lavagens com Tampão Cacodilato 0,1 M a 4°C; Fazer mudanças de tampão a 4°C. (*).

(30') Início _____ Final _____

(30') Início _____ Final _____

Desidratação (a 4°C até à última mudança de álcool a 100%)

Álcool 50% (15') Início (4°C) _____ Final _____

Álcool 70% (15')* Início (4°C) _____ Final _____

Álcool 95% (15') Início (4°C) _____ Final _____

Álcool 100% p.a. (2 x 15' - última mudança passar para temperatura ambiente)

(15') Início _____ Final _____

(15') Início _____ Final _____

Óxido de Propileno (2 x 15' - à temperatura ambiente)

(15') Início _____ Final _____

(15') Início _____ Final _____

Impregnação

Propósito: Aumentar sucessivamente a quantidade de resina

Óxido de Propileno + Epon (3:1)

(1h00) Início _____ Final _____

Óxido de Propileno + Epon (1:1) (*)

(1h00)*Início _____ Final _____

Óxido de Propileno + Epon (1:3)

(1h00) Início _____ Final _____

Epon (Temperatura ambiente)

(1h00) Início _____ Final _____

Epon (60°C - estufa) com os frascos abertos para evaporar qualquer resíduo de óxido de propileno

(10') Início _____ Final _____

Inclusão

Epon (60°C)

(2 a 3 dias) Início _____ Final _____

(*) Quando necessário pode ficar durante a noite a 4°C.



Figura 1- Moldes de borracha utilizadas para inclusão de fragmentos em epon. Os fragmentos são incluídos nas extremidades do bloco, já com a respectiva identificação

Ultramicrotomia

Para a obtenção de cortes semifinos (1-2 μ m) e ultrafinos (60-90nm), é necessária a utilização do ultramicrotomo e de facas de vidro ou de diamante.

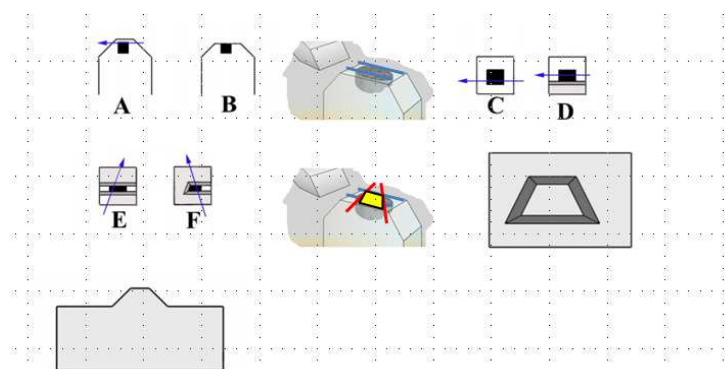


Figura 2 – Esquema representativo do talhe do bloco para posterior corte no ultramicrotomo

Cortes semifinos: tem como objetivo alisar a superfície do corte e possibilitar a escolha da área de interesse para os cortes ultrafinos. Os cortes semifinos são transferidos para

lâminas de vidro e corados com o corante descrito abaixo, sob uma placa de aquecimento (60°C) para facilitar a penetração do corante na resina.

Coloração de semi-finos

Solução stock A – Azul de Metileno 1%

Solução I

Azul de metileno 1g.

Água destilada q.b.p 100ml.

Solução II

Bórax 1g.

Água q.b.p 100ml.

Misturar Sol I e Sol II em iguais proporções.

Solução stock B – Azul de azur II

Azul de Azur II 1g.

Água destilada q.b.p 100ml.

Solução de trabalho: Solução A + Solução B em iguais proporções.

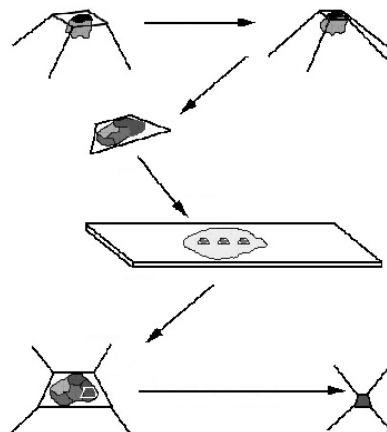


Figura 3- Esquema representativo do talhe do bloco para cortes ultrafinos, após seleção da área de interesse feita por observação do corte semifino corado no microscópio óptico.

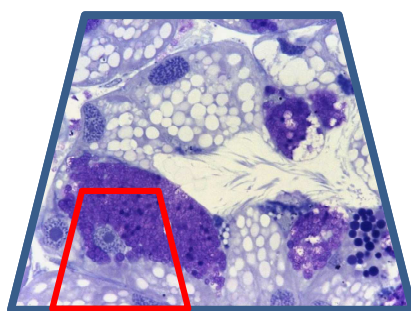


Figura 4- Corte semifino corado. A zona a vermelho corresponde a área de interesse selecionada.

Cortes ultrafinos: são cortes extremamente finos (50-90 nm) para permitirem ser atravessados pelo feixe de electrões. Estes cortes são recolhidos em grelhas metálicas com uma malha (mesh) variável consoante o objectivo. As grelhas são armazenadas em caixas porta-grelhas próprias que possuem um código de identificação de grelhas. As grelhas devem ser posteriormente contrastadas antes de irem ao Microscópio electrónico.

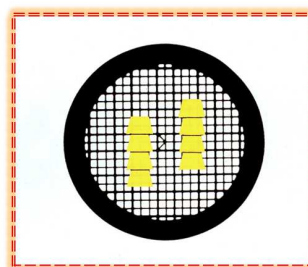
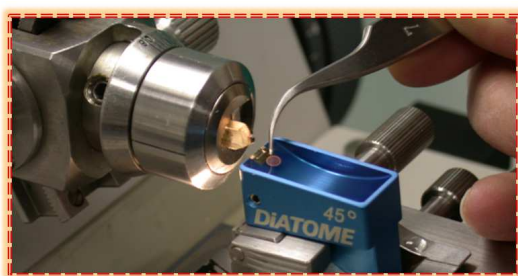


Figura 5- Realização de cortes ultrafinos e recolha dos mesmo em grelhas metálicas



Figura 6- Caixas para armazenamento de grelhas

Contraste de Grelhas

A contrastação tem como objetivo principal fornecer ao tecido a capacidade de dispersar elétrons dos seus elementos estruturais. Este contraste consiste na introdução de átomos pesados que se depositam sobre os componentes do tecido

Contrastantes

Acetato de Urânio (segundo Valentin 20' - 30')

Solução de ácido acético a 1% – 50 ml

(Diluir 0,5 ml de ácido acético em 50 ml de água ultrapura)

Dissolver 2 g de acetato de urânio nos 50ml anteriores.

Misturar 49 ml da solução anterior e 51 ml de álcool absoluto.

Guardar a 4°C em frasco escuro.

Citrato de Chumbo (segundo Reynolds 10' - 15')

Dissolver 1,33 g de Nitrato de Chumbo e 1,76 g de Citrato de Sódio em 30 ml de água ultrapura. Forma-se um precipitado branco leitoso.

Agitar durante 1 minuto.

Deixar repousar com agitação intermitente durante 30 minutos.

Dissolver 0,4 g de hidróxido de sódio (lentilhas) em 10 ml de água ultrapura.

Adicionar 8 ml desta solução a 30 ml da primeira solução.

Completar o volume de 50 ml com água ultrapura.

Misturar suavemente por inversão (pH 12-12,01). A solução deve ficar límpida. Se necessário, centrifugar um pouco (3000rpm 10').

Guardar a 4°C em frasco escuro.

Filtrar antes de utilizar.

Contrastação Manual de Grelhas

A contrastação é feita em placas de Petri revestidas com cera dentária e cobertas com papel alumínio para proteger da luz.

Acetato de Uranilo: Colocar uma gota de Acetato de Uranilo e mergulhar as grelhas (20 minutos). Devemos por um vidro de relógio com metanol puro para saturar atmosfera. Após a contração deve-se fazer 1 lavagem com metanol 50% e duas lavagens em água destilada.

Secar as grelhas no papel filtro.

Citrato de Chumbo: Colocar uma gota de Citrato de Chumbo (mesmo antes de ser utilizado) e mergulhar as grelhas (15 minutos). Devemos por também um vidro de relógio com pepitas de NaOH para remover a humidade do ar e evitar precipitados. Após a contração com citrato de chumbo, fazer duas lavagens com hidróxido de sódio (1 lentilha em 200ml de água ultrapura) e depois duas lavagens em água destilada. Secar em papel filtro.

Arquivar as grelhas em caixas próprias.

Técnicas de Imunohistoquímica

Introdução à técnica de imunohistoquímica

A Imunohistoquímica é uma técnica que se baseia no princípio da que é possível detectar moléculas (antígenos) tecidulares e/ou celulares através da interação específica antígeno – anticorpo.

A 1ª técnica de Imunohistoquímica foi introduzida por Coons et al em 1941, e consistiu na conjugação de um anticorpo com uma substância fluorescente e sua utilização para identificação de antígenos em cortes histológicos.

Antígeno

Um antígeno é geralmente uma molécula complexa e de grande peso molecular, como por exemplo uma molécula proteica, que uma vez introduzido no organismo induz a uma resposta por parte do sistema imunitário, levando à produção de anticorpos.

Cada uma destas moléculas apresenta na sua superfície, um ou mais locais específicos de ligação ao anticorpo – determinantes antigénicos ou epítomos. Estas regiões de ligação altamente específicas são constituídas por sequências (completas ou fragmentos) de proteínas ou de polissacarídeos.

Anticorpo (imunoglobulina)

Nome dado às moléculas de natureza proteica que são produzidas pelos plasmócitos em resposta à presença de substâncias que são reconhecidas como estranhas pelo organismo. Cada imunoglobulina possui uma estrutura básica constituída por 4 cadeias proteicas: 2 cadeias pesadas idênticas e 2 cadeias leves idênticas, unidas por ligações dissulfídicas que mantêm a estabilidade do anticorpo.

Soros Policlonais

Os Soros policlonais possuem anticorpos produzidos por várias células, reagindo assim com diversos epítomos de um antígeno. O animal mais utilizado para a produção de soros policlonais é o coelho, mas podem ser utilizados outros: cabra, porco, ovelha, cavalo, etc.

- Capacidade de deteção de vários epítomos de um mesmo antígeno;
- Relativa facilidade de obtenção em grandes quantidades;
- Baixo custo;
- Alta variabilidade de lote para lote;
- Relativa baixa especificidade;
- Possibilidade de presença de anticorpos não específicos.

Soros Monoclonais

Um soro monoclonal é um reagente que é o produto de um único clone de plasmócitos imortalizados e que, como tal, é uniforme em estrutura, especificidade e afinidade, podendo ser produzido em relativamente grandes quantidades.

Os anticorpos de um determinado clone são imunoquimicamente idênticos e reagem com um determinado epítopo de um antígeno, contra o qual foram produzidos. O animal mais utilizado para obter clones de anticorpos monoclonais é o ratinho, embora actualmente também se produzam anticorpos monoclonais de coelho.

- Identificação de um só epítopo de um antígeno;
- Alta especificidade e afinidade;
- Baixa variabilidade de lote para lote;
- Ausência de anticorpos não específicos;
- Alto custo;
- Maior dificuldade de obtenção em grandes quantidades;
- Ligam-se apenas a um epítopo que pode ser alterado durante o processamento, ou pode não estar acessível para a ligação;
- Podem ocorrer reações cruzadas com outras moléculas que contenham determinantes similares.

Na imunohistoquímica são utilizados vários tipos de anticorpos:

Anticorpo primário

- É o que vai reconhecer o antígeno de interesse. Deve ser específico e não ter afinidade para antígenos similares.
- Anticorpos comerciais normalmente disponíveis em pequenas quantidades (max 1 ml (podem ser monoclonais ou policlonais); Utilizando anticorpos policlonais há maior probabilidade de reatividade cruzada com a mesma proteína em espécies diferentes daquela para que o anticorpo foi produzido.
- Necessidade de confirmação da especificidade.

Anticorpo secundário

- Comercialmente disponíveis em maior quantidade e a preço menor;
- Produção de grandes volumes de forma relativamente simples (são em geral policlonais);
- Pode escolher-se que possuam afinidade para todas as imunoglobulinas da espécie, ou para uma classe (e.g. IgG ou IgM) do anticorpo primário usado;

Recuperação antigénica

É necessária devido às consequências da fixação com formaldeído, que leva à formação de pontes dimetileno entre as proteínas. As estruturas quaternárias e terciárias das proteínas são assim modificadas podendo “mascarar” os epítomos dos antígenos.

As consequências da fixação dependem da concentração do fixador, pH, temperatura e duração da fixação. Para uma boa imunohistoquímica deve ser utilizado formaldeído diluído a 4%, tamponado. O tempo de fixação deve ser controlado: a subfixação e a sobrefixação têm consequências na preservação dos antígenos. As alterações decorrentes da fixação podem ser de tal forma extensas que levam ao não reconhecimento do antígeno. Os soros monoclonais em geral apresentam maiores problemas na detecção de antígenos fixados em formol do que os soros policlonais, pois estão limitados à detecção de somente um epítomo.

A recuperação antigénica pode ser feita recorrendo à utilização de calor ou à ação de enzimas proteolíticas.

Recuperação antigénica por calor:

A recuperação antigénica mediada por calor é definida como o aquecimento dos cortes, a alta temperatura, em soluções tampão, de modo a recuperar a antigenicidade que foi afetada pela fixação em formol. O efeito de recuperação antigénica é atingido devido à transferência de energia resultante do aquecimento, que para além de quebrar as ligações proteína-proteína, quebra também as ligações entre os iões cálcio e os aminoácidos (nesta última reação podem também estar envolvidos agentes quelantes existentes na solução de recuperação). Os tampões utilizados na recuperação antigénica podem ter vários pH: os mais utilizados são tampão Citrato (pH 6) o tampão EDTA pH 8. Para cada antígeno é preciso testar qual o tampão e pH que mais se adequa.

O aquecimento pode ser feito através de:

- Micro-ondas;
- Panela de pressão;
- Banho-maria termostaticado (deve ter tampa para manter a temperatura estável)
- Autoclave

Recuperação antigénica por digestão enzimática proteolítica:

Consiste no tratamento dos tecidos por enzimas proteolíticas como por exemplo:

- Tripsina;
- Proteinase K;
- Pepsina.

Estas enzimas digerem ligações proteicas e levam à destruição indireta das ligações induzidas pela fixação (pontes de metileno), expondo assim antígenos que estavam obstruídos ou mascarados pela fixação. Pode ser feita em banho-maria ou na

estufa. A temperatura ideal ronda os 37°C, que é a temperatura ótima de atuação da maior parte das enzimas utilizadas.

Bloqueios de componentes endógenos

Peroxidase Endógena

Existe principalmente em tecidos com eritócitos mas também no baço, rim, fígado, medula óssea e em áreas de necrose. É bloqueada por um excesso de substrato (peróxido de hidrogénio) que leva à saturação da atividade enzimática. Para a inibição efetiva da peroxidase endógena pode ser utilizada uma solução de H₂O₂ 3% em metanol imediatamente após a desparafinação/hidratação ou noutro momento considerado adequado (antes da aplicação do reagente conjugado com a peroxidase).

Biotina endógena

Utiliza o princípio do complexo avidina biotina. Primeiro é aplicada avidina que se vai ligar à biotina dos tecidos e em seguida é aplicada biotina que vai completar os espaços livres da biotina. Criam-se assim complexos avidina.biotina completos e, portanto, não reativos

Bloqueio de reações inespecíficas

Nos tecidos existe normalmente locais (pontos hidrofóbicos, eletrostáticos ou outros) suscetíveis de ligações inespecíficas dos anticorpos. Podem existir em qualquer órgão ou tecido e poderão provocar o aparecimento de coloração de “fundo” ou de marcação inespecífica. Estas reações inespecíficas podem ser bloqueadas utilizando diversas estratégias:

- Utilização de soro normal não imune de uma espécie animal diferente da utilizada para produzir o anticorpo primário, normalmente da espécie em que é produzido o anticorpo secundário (no caso de ser aplicado o método indirecto). É aplicado imediatamente antes do soro primário.
- Adição de detergentes (ex. Triton X100; Tween 20).ao tampão de lavagem (PBS ou TBS)
- Adição de albumina sérica bovina (BSA) ao tampão de diluição do anticorpos.
- Soros de bloqueio comerciais .

Métodos de Deteção

Método direto

Consiste no emprego de um anticorpo primário, que se liga ao antígeno, e está conjugado com uma molécula repórter

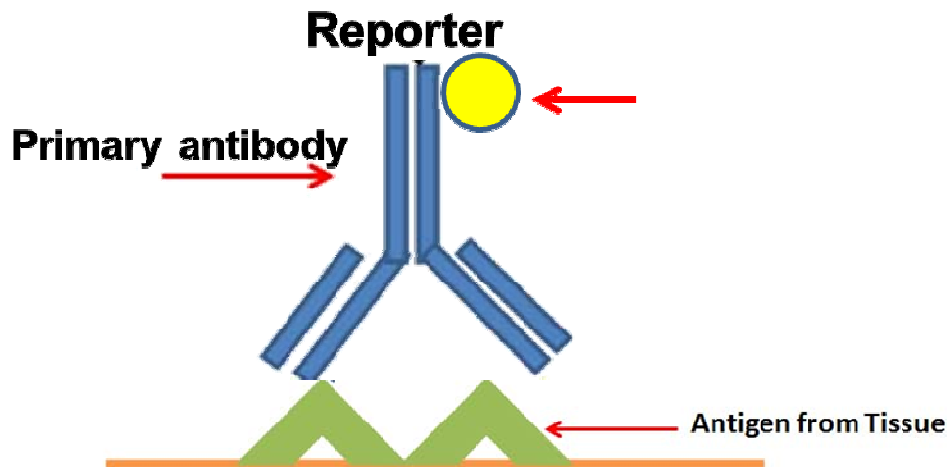


Figura 1- Imunohistoquímica- método direto

Método indireto simples

O método indireto simples consiste na utilização de um anticorpo primário não conjugado que se liga ao antígeno e um anticorpo secundário conjugado com uma enzima, dirigido contra a porção FC do anticorpo primário.

O anticorpo secundário tem de ser dirigido contra o anticorpo primário, logo se o anticorpo primário é produzido em ratinho o secundário é produzido por exemplo em coelho (coelho anti ratinho).

As enzimas mais utilizadas são a peroxidase e a fosfatase alcalina.

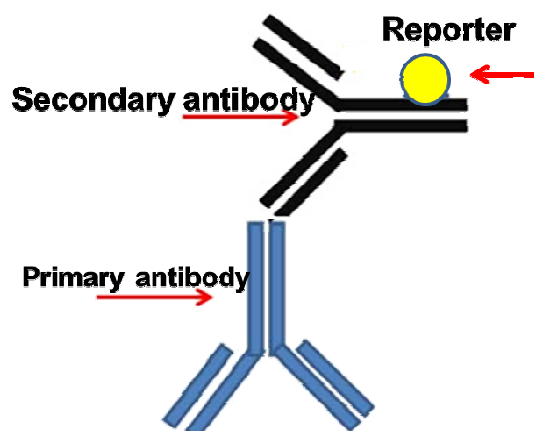


Figura 2 - Imunohistoquímica- Método indireto

Método LSAB (labelled streptavidin-biotin)

Baseia-se na alta afinidade que a streptavidina tem para a biotina, formando complexos muito estáveis. Neste método são aplicados sequencialmente:

- Um anticorpo primário contra o antígeno pretendido.
- Um anticorpo secundário biotinilado dirigido contra o anticorpo primário.
- Streptavidina marcada com a enzima (normalmente peroxidase).
- Cromogénio.

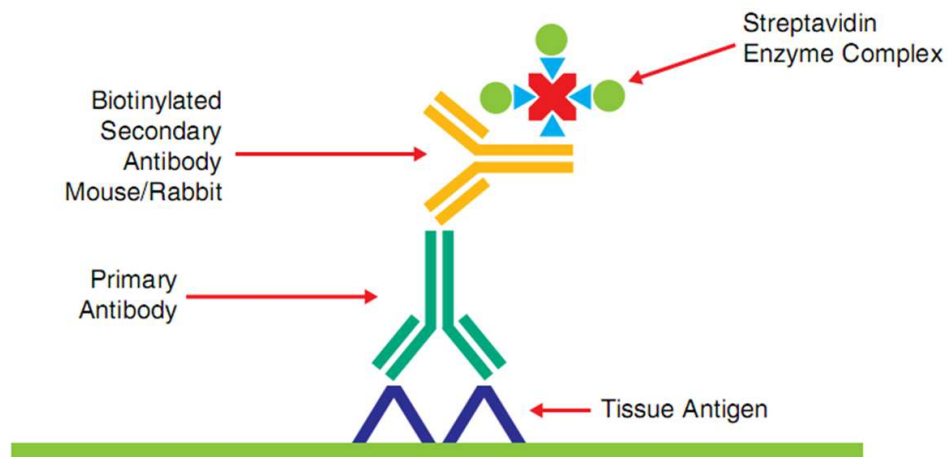


Figura 3 - Imunohistoquímica. Método LSAB

Método do polímero

É uma metodologia mais recente que recorre a um polímero constituído por um esqueleto central de grandes dimensões (normalmente dextrano), ao qual estão acopladas grandes quantidades de anticorpos e enzimas (ex. peroxidase)

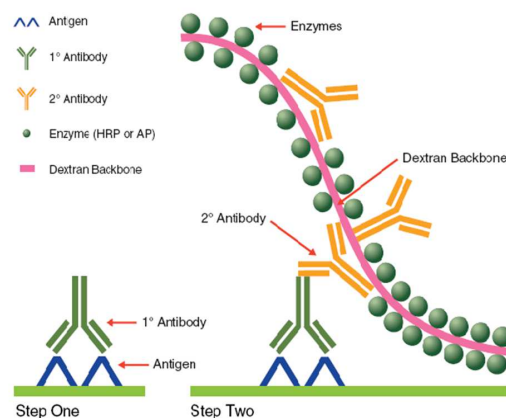


Figura 4- Imunohistoquímica método do polímero

Revelação

Normalmente é usado um cromogénio que ao reagir com o substrato da enzima usada dá origem a uma substância colorida e estável, conferindo cor ao local da reação..

Substratos e Cromogénios

O Cromogénio mais utilizado para a peroxidase é a 3,3 – Diaminobenzidina Tetrahydrochloride (DAB). Gera um composto castanho, insolúvel em álcool e noutros solventes orgânicos.

Outro cromogénio que pode ser usado para a peroxidase é o amino-9-etilcarbazol – AEC produz um produto de cor vermelha, solúvel nos álcoois.

Controlos:

Em cada reação devem ser incluídos controlos de procedimentos:

Substituição de reagentes (omissão do anticorpo primário ou substituição por um anticorpo do mesmo isotipo, no caso dos anticorpos monoclonais.

Controle tecidual:

- Positivo;
- Negativo;

**Imunohistoquímica em cortes 5 µm com peroxidase
PCNA (1:400) e E caderina (1:50)**

Sistema de detecção (kit): Kit Histostain-Plus - Invitrogen®

Soluções:

PBST (0,01M com 0,9% de NaCl, pH 7,5/0,05%Tween 20)

8,7 g de NaCl.

0,272 g de KH_2PO_4 .

1,41 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Dissolver os sais separadamente em H_2O destilada; misturar e perfazer o volume até 1L.
Rectificar o pH.

Adicionar 0,5 ml de Tween 20.

Tampão Citrato 0,01M pH 6,0

Solução A – Ácido cítrico p.a ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,1M (1,050 g para 50 mL H_2O destilada).

Solução B – Citrato de sódio p.a ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,1M (2,941 g para 100 mL H_2O destilada).

Solução de Trabalho

18 mL Solução A + 82 mL Solução B para 1000 mL H_2O destilada;
Medir o pH=6 antes de colocar a H_2O destilada.

Tampão Tris-EDTA 10 mM Tris base; 1mM EDTA, 0.05% Tween 20 pH 9,0

1,21g Tris

0,37 g EDTA

Dissolver em 700 ml de água destilada.
Ajustar pH para 9,0.
Perfazer com água destilada até 1000 ml.

Técnica:

Desparafinação

Xilol I – 10 min.

Xilol II– 5 minutos.

Hidratação

Álcool absoluto – 2 min.

Álcool 95° – 2 min.

Álcool 70° – 2 min.

Água corrente – 2 min.

Água destilada

Recuperação antigénica em panela de pressão

- Encher a panela de pressão até $\frac{3}{4}$ com tampão citrato pH6.
- Aquecer a solução quase até à fervura.
- Introduzir as lâminas num suporte de plástico e fechar a panela de pressão.
- Após atingir a pressão máxima contar 2 min. e de seguida colocar a panela debaixo de água corrente deixando a panela perder pressão e a solução arrefecer lentamente.
- Após 5 min. abrir a panela e retirar as lâminas.
- Lavar em água corrente – 5 min. (retirar o excesso de tampão).
- Passar em H₂O destilada.

Recuperação antigénica em microondas

- Colocar o tampão EDTA num recipiente de plástico e deixar aquecer até à ebulição.
- Introduzir as lâminas num suporte de plástico (preencher os locais vazios se necessário)
- Deixar ferver 10 min na potência máxima
- Deixar arrefecer a solução até próximo da temperatura ambiente
- Lavar em água corrente
- Passar por água destilada

Bloqueio da peroxidase endógena

- Incubar 10 min. numa solução a 3% de peróxido de hidrogénio em metanol.
- Lavar em água corrente – 5 min.
- H₂O destilada.
- Passar em PBST.

Incubações

- Secar as lâminas, sem deixar secar o corte e delimitar o corte com a caneta hidrofóbica.
- Solução de bloqueio: 10% soro normal de cabra (Solução A do Kit – Blocking Solution); cobrir o corte e deixar a incubar na câmara húmida – 10 min.
- Escorrer sem lavar.
- Aplicar o anticorpo primário diluído em PBS/BSA 1% por cima do corte de forma a cobri-lo por completo (ao controlo negativo é adicionada apenas tampão PBS)
- A incubação é feita em câmara húmida a 4°C, overnight.
- Lavar em PBST – 5 min. + 5 min.
- Limpar as lâminas à volta do corte para retirar o excesso de tampão.
- Incubar com o anticorpo secundário biotinilado (Solução B do Kit – Broad Spectrum Second Antibody). Cobrir o corte. Incubação em câmara húmida à temperatura ambiente – 30 min.
- Lavar em PBST – 5 min. + 5 min.
- Limpar as lâminas à volta do corte para retirar o excesso de tampão.
- Incubar com a enzima conjugada complexo streptavidina-peroxidase (Solução C do Kit - HRP-Streptavidin). Cobrir o corte – 30 min.
- Lavar em PBST – 5 min + 5 min.
- Cromogénio - DAB (DAB Substrate Buffer & Liquid DAB Chromogen) preparar a solução 5-10 min antes de usar adicionando 50 µl de cromogénio para cada ml de tampão (O DAB é altamente tóxico deve-se ter muito cuidado no seu manuseamento e antes de ser rejeitado deve ser misturado com lixívia.)
- Lavar com água corrente – 5 min

Contraste

- Corar hematoxilina de Mayer – 1 min.
- Lavar em água corrente 5 min.

Desidratação

- Álcool absoluto I.
- Álcool absoluto II.
- Álcool absoluto III.

Diafanização

- Xilol I.
- Xilol II.

Montagem

Técnicas de Colheita e Processamento em Citologia

Citologia

A citologia consiste no estudo microscópico de células, destacadas dos tecidos espontaneamente, ou utilizando técnicas específicas.

São técnicas de colheita em citologia:

Imprint ou aposição

Consiste na remoção de células superficiais de uma lesão ou superfície de um órgão através do contacto com uma lâmina de microscopia, sendo indicado para superfícies expostas, por exemplo, lesões cutâneas. É também indicado para diagnóstico rápido em biópsias, necrópsias e exames extemporâneos, onde pode ser feito imprint dos fragmentos de tecidos.

Para aumentar a celularidade podem ser feitas várias impressões por lâmina. A rotação da lâmina sobre o tecido ou do tecido sobre a lâmina também facilita a obtenção de mais células por preparação.



Figura 1 - Fotos ilustrativa de imprint ocular (esquerda) e imprint de fígado (direita).

Raspagem

Constitui uma técnica para obtenção de células raspando a superfície da lesão com uma lâmina de vidro ou bordo rombo de uma lâmina de bisturi. O material pode ser colhido diretamente para a lâmina ou ser espalhado na mesma posteriormente.

Esta técnica tem indicações semelhantes à técnica anterior sendo apropriada especialmente para lesões que esfoliam pouco.



Figura 2 - Demonstração de raspagem de raspagem de pele e esfregaço em lâmina.

Zaragatoa

É um método de colheita em que as células são colhidas de uma superfície ou mucosa e espalhadas na lâmina com o próprio instrumento de colheita. Em caso de colheitas para cultura a zaragatoa deve ser estéril, podendo ser humedecida com soro fisiológico se a zona de colheita não for húmida. É uma técnica mais usada para colheitas em mucosas ou zonas de difícil acesso.

Para maximizar a celularidade transferir as células quer da superfície lateral quer da ponta da zaragatoa para a lâmina

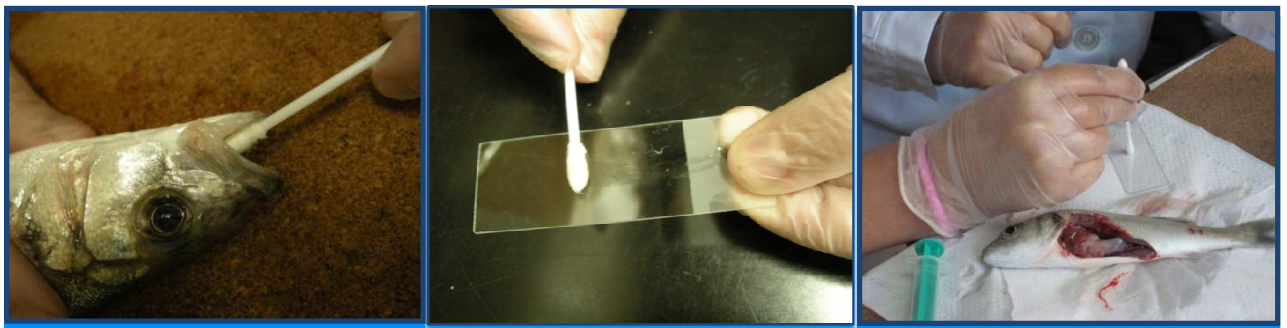


Figura 3- Zaragatoa da mucosa oral de peixe, colheita e transferência de células para lâmina.

Escova

As indicações são semelhantes às da zaragatoa. Apropriada para colheita em mucosas (nariz, boca, cérvico-vaginal). Os esfregaços obtidos são em geral bastante celulares e com boa morfologia.

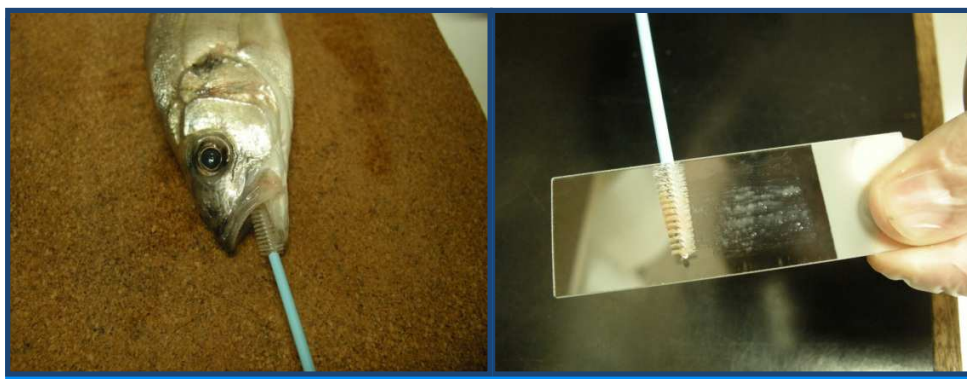


Figura 4- Escovado da mucosa oral de peixe, colheita e transferência de células para a lâmina.

Citologia aspirativa

Método indicado para recolher células de lesões subcutâneas, que podem ser massas sólidas ou cavitárias ou de órgãos profundos. São usadas seringas de 3 a 20 ml e agulhas de 21 a 25G. As agulhas de maior calibre (menor G) são utilizadas em lesões mais duras e que esfoliem pouco enquanto as de menor calibre (maior G) são indicadas para tecidos mais moles.

Procedimento- técnica aspirativa

- Inserir a seringa com a agulha acoplada na lesão alvo.
- Puxar o êmbolo da seringa até ao máximo, criando pressão negativa.
- Redireccionar agulha dentro da lesão várias vezes, para aumento de representatividade e celularidade.
- Antes de retirar a agulha da lesão aliviar a pressão a negativa, fazendo com que o êmbolo volte ao ponto inicial (impede que o material aspirado entre dentro da seringa).
- Retirar a agulha/seringa da lesão.
- Desacoplar a agulha da seringa e voltar a puxar o êmbolo para cima.
- Voltar a colocar agulha na seringa e transferir o material aspirado para a lâmina, mantendo a agulha perto da sua superfície. Fazer o esfregaço.

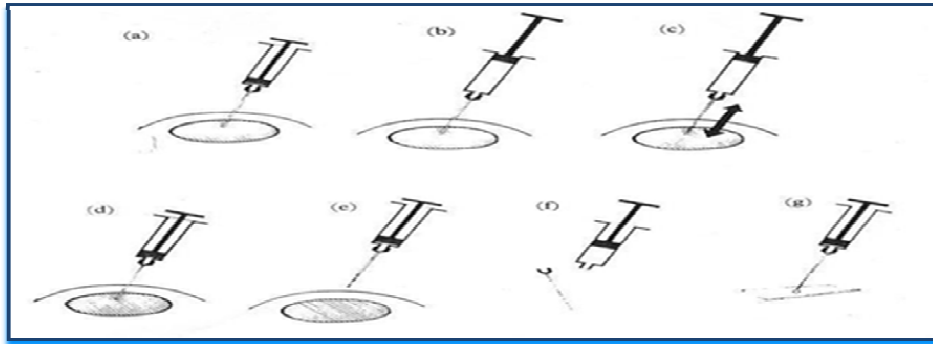


figura 5 – Esquema representativo da técnica aspirativa.

Procedimento- técnica não aspirativa

Inserir a agulha na lesão alvo redireccionando-a dentro da lesão várias vezes, para aumento de representatividade e celularidade.

Retirar a agulha da lesão e bater com a parte plástica numa lâmina até o material colhido sair. Fazer o esfregaço

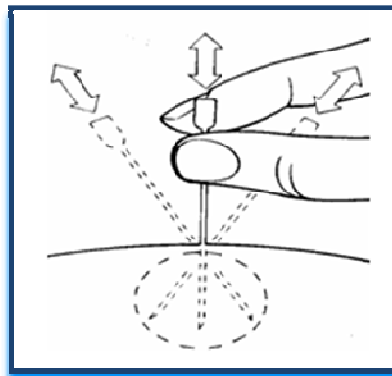


Figura 6 - Esquema representativo da técnica não aspirativa

Processamento de amostras:

Cytospin

Adequado para amostras pouco celulares - concentração de células.

- Identificar uma lâmina de vidro
- Colocar a lâmina identificada no filtro e fechar com o clip
- Encaixar o filtro na centrífuga (calibrar)
- Colocar 50-200 μ L de amostra no funil (de acordo com a celularidade)
- Centrifugar a 1600 rpm durante 6 minutos (800rpm 8 minutos para LCR)
- Retirar a lâmina, deixar secar e corar.



Figura 7 - Citocentrífuga e o seu respectivo sistema de montagem de lâmina e citofunil.

Técnica de obtenção do *buffy coat*

Técnica utilizada para separar os eritrócitos dos leucócitos do sangue. Os leucócitos ficam numa camada central, entre os eritrócitos e o plasma, designada de *buffy coat*. Por rotina faz-se centrifugação do sangue em dois tubos de microhematócrito não heparinizados (azuis).

Material necessário

- Tubos de microhematócrito (2);
- Plasticina;
- Lâminas com a identificação;
- Caneta de diamante;
- Clip.

Procedimento

- Introdução do sangue no tubo de microhematócrito, por capilaridade, através da extremidade oposta à linha azul.
- Para facilitar a entrada do sangue deve-se inclinar ligeiramente o tubo.

- Encher até $\frac{3}{4}$ do tubo.

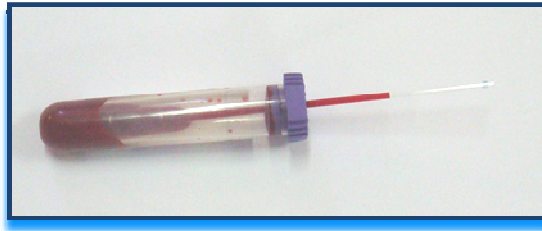


Figura 8 - Enchimento do tubo de microhematócrito.

- Após o enchimento do tubo, tapar com o dedo indicador para evitar a saída do sangue e inserir o tubo pela extremidade oposta à linha azul na placa com plasticina.
- Criar um rolhão de plasticina pressionando levemente o tubo e fazendo movimentos circulares com a placa no sentido horário.



Figura 9 - Rolhão com plasticina.

- Colocar os tubos na centrífuga (com a plasticina para fora) e em posições opostas de modo a que a centrífuga fique calibrada.
- Fechar a tampa de rosca da centrífuga verificando se ficou bem presa e de seguida fechar a tampa de mola.
- Marcar 5 min e iniciar a centrifugação.
- Após a centrifugação retirar os tubos e desligar a centrífuga.

Manter o tubo com a plasticina voltada para baixo até a execução dos esfregaços.

Realização dos esfregaços de *buffy coat*

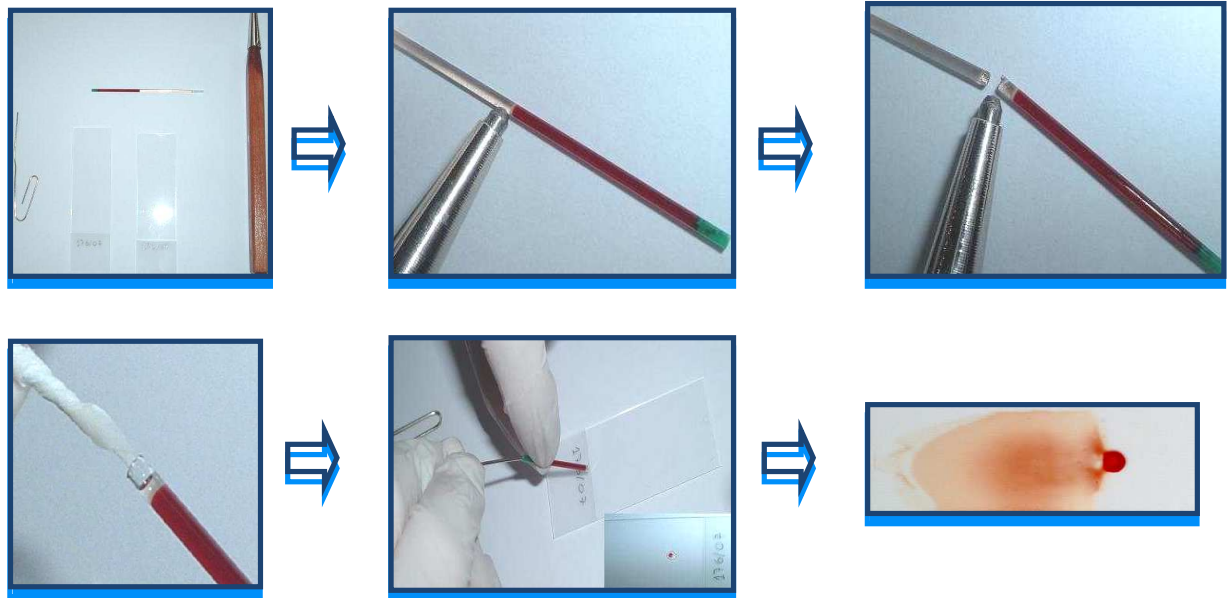


Figura 10 - Esquema representativo da realização do esfregaço de *buffy coat*

Com a caneta de diamante, partir o tubo ligeiramente a seguir à camada de *buffy coat*.

- Com o guardanapo absorver o plasma.
- Com a ajuda de um clip, empurrar a plasticina até remover completamente a camada de *buffy coat*. Em princípio, se deixarmos sair um pouco da camada com os eritrócitos, temos a certeza que também já saiu o *buffy coat* e por outro lado, conseguimos estender melhor o esfregaço.
- Executar o esfregaço.
- Proceder à secagem rápida do esfregaço.
- Coloração por Diff Quik.

REALIZAÇÃO DE ESFREGAÇOS

Técnica de esfregaço de sangue

Adequada para amostras de consistência mais líquida como os derrames cavitários e sangue.

Procedimento

Colocar uma pequena gota do material numa das extremidades da lâmina

Com uma segunda lâmina em ângulo de 45° arrastar ligeiramente primeiro em direcção à extremidade mais próxima

Realizar o esfregaço no sentido contrário espalhando as células por arrastamento e capilaridade num movimento rápido e uniforme.

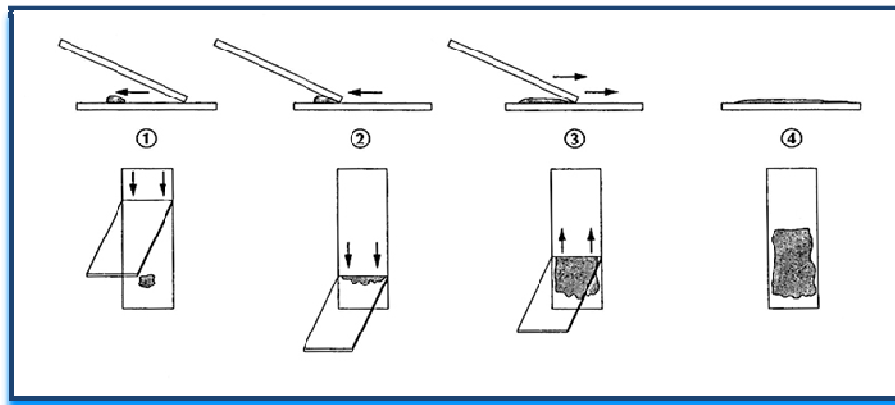


Figura 11 - Esquema representativo de esfregaço sanguíneo.

Técnica de squash

Indicada para amostras semi-sólidas ou muito viscosas ou para fragmentos de tecidos.

Procedimento:

O material é colocado numa das extremidades da lâmina.

O material é pressionado ligeiramente por uma segunda lâmina e espalhado com um deslizamento contínuo sem exercer demasiada pressão e sem ultrapassar o extremo da primeira lâmina.

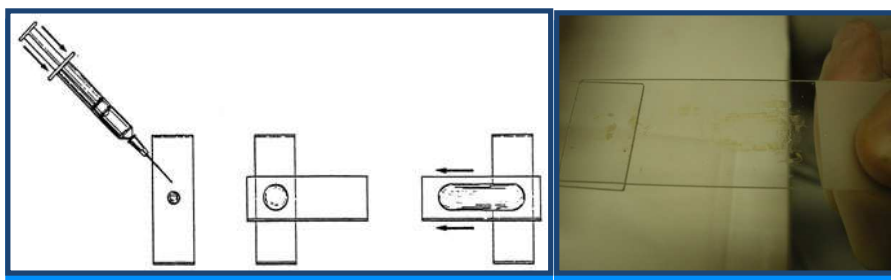


Figura 12 - Esquema representativo da técnica de squash.

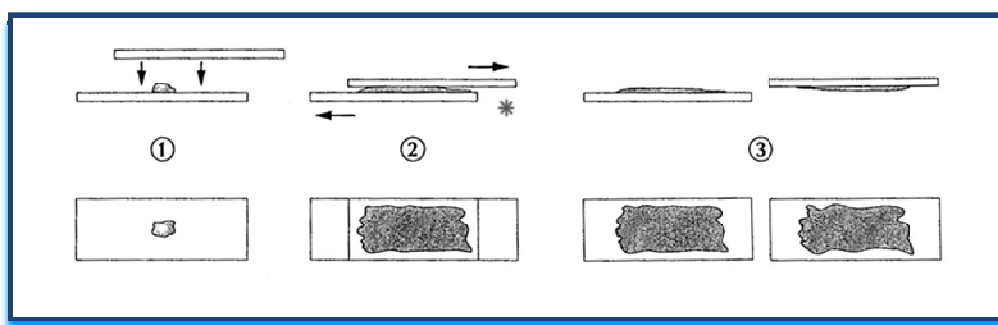


Figura 13 - Esquema representativo de alternativa à técnica de squash da Figura 9.

DIFF-QUIK

Coloração utilizada como rotina em citologia.

Técnica

Fixação

Lâmina com o esfregaço é seca ao ar.

Técnica

- Solução I: metanol – 1 minuto.
- Solução II: hemacolor 2 – 2 minutos.
- Solução III: hemacolor 3 – 3 minutos.
- Secar ao ar.

Montagem

Resultados

EritrocitosRosa

NúcleosAzul escuro a arroxeado

CitoplasmaAzul mais claro

BIBLIOGRAFIA

Processamento e Técnicas de Coloração para Microscopia Ótica

Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques, 7th Edition, Churchill Livingstone, 2013.

Stainsfile: <http://stainsfile.info/StainsFile/jindex.html>, consultado a 25 de novembro de 2016.

Dako Guide for special stains :

http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/hb313/main_pages/timetable/Tutorials/2008/DAKO.guide_to_special_stains.pdf, consultado a 25 de novembro de 2016.

Use of destained cytology slides for application of routine special stains; Marco, R; Santos, N; Malhão, F; Ferreira, Monteiro, RAF; Rocha, E. Veterinary Clinical Pathology 2009 Mar;38(1):94-102.

Congelação de Amostras para Microscopia ótica

Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 7th Edition, Churchill Livingstone, 2013.

Processamento para Microscopia Electrónica de Transmissão (MET)

Electron Microscopy Methods and Protocols 2nd, John Kuo, Human Press, 2007.

Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques 7th Edition, Churchill Livingstone, 2013.

Imunohistoquímica

Borges-Ferro A. Imunohistoquímica. Lisboa, Portugal: Autor; 2014. Available at: <http://www.amadeuferro.pt.vu>, acedido a 25 de novembro de 2016.

Immunohistochemical Staining Methods:

http://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/public/08002_ihc_staining_methods.pdf, acedido a 25 de novembro de 2016.

Nota das autoras:

Algumas imagens que constam neste manual não são da nossa autoria, foram retirados de páginas disponíveis na internet.