



Volume

2

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Organização
Etelcia Molinaro
Luzia Caputo
Regina Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Paulo Ernani Gadelha Vieira

ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE JOAQUIM VENÂNCIO

Diretora

Isabel Brasil Pereira

Vice-diretor de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico

Maurício Monken

Vice-diretora de Ensino e Informação

Márcia Valéria Morosini

Vice-diretor de Gestão e Desenvolvimento Institucional

Sergio Munck

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Diretora

Tânia Cremonini Araújo Jorge

Vice-diretora de Pesquisa, Desenvolvimento Tecnológico e Inovação

Mariza Gonçalves Morgado

Vice-diretora de Ensino, Informação e Comunicação

Helene dos Santos Barbosa

Vice-diretora de Serviços de Referência e Coleções Científicas

Elizabeth Ferreira Rangel

Vice-diretor de Desenvolvimento Institucional e Gestão

Christian Maurice Gabriel Niel

CONCEITOS E
MÉTODOS
para formação
de profissionais
em laboratórios
DE SAÚDE

Volume 2

ORGANIZADORAS

Etelcia Moraes Molinaro

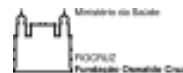
Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Maria Regina Reis Amendoeira

IOC
Instituto Oswaldo Cruz



ESCOLA POLITÉCNICA DE SAÚDE
JOAQUIM VENÂNCIO



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Dantas Cruz

Copyright © 2010 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/Fundação Oswaldo Cruz

Conselho Editorial

Dr.^a. Ana Luzia Lauria Filgueiras
Dr.^a. Fátima Conceição Silva
Dr. Herman Schatzmayr
Dr.^a. Léa Camillo-Coura
Dr.^a. Lúcia de Brito Gitirana
Dra. Marcia Ferrão
Dr. Marco Antonio Ferreira da Costa
Dr.^a. Margareth Maria de Carvalho Queiroz
Dr.^a. Maria Regina Reis Amendoeira
Dr. Otílio Machado Pereira Bastos

Capa

Zé Luiz Fonseca

Projeto Gráfico e Editoração

Marcelo Paixão

Fotos

Rodrigo Mexas
Maria Eveline Castro Pereira
Moyses Gomes Marcelino

Desenhos

Newton Marinho da Costa Júnior

Revisão

Luciana Duarte
João Sette Camara

Secretária Executiva da Coleção

Josane Ferreira Filho

Catálogo na fonte
Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio
Biblioteca Emília Bustamante

M722c Molinaro, Etelcia Moraes

Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2 / Organização de Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira. - Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

290 p. : il. , tab.

ISBN: 978-85-98768-41-0

1. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 2. Pessoal de Laboratório. 3. Laboratórios. 4. Formação de Técnicos. 5. Saúde e Educação. I. Título. II. Caputo, Luzia Fátima Gonçalves. III. Amendoeira, Maria Regina Reis.

CDD 542.1

Autores

Anna Christina Rosa Guimarães

Tecnóloga em Processos Químicos Industriais, Técnica em Saúde Pública do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/INCQS/Fiocruz.

Daniel Santos de Souza

Biólogo, Especialista em Políticas Públicas em Saúde, Mestrando em Saúde Pública pela Escola Nacional de Saúde Pública/ENSP/Fiocruz, Técnico em Saúde Pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz. (Egresso do Curso Técnico de Laboratório de Biodiagnóstico em Saúde/Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz).

Emanuele Amorim Alves

Farmacêutica industrial, Especialista em Perícia Criminal pela Universidade Castelo Branco, Mestranda em Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Técnica em Saúde pública da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz.

Ester Maria Mota

Bióloga, Doutora em Biologia Parasitária pela Fundação Oswaldo Cruz. Pesquisadora Associada do Laboratório de Patologia do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Helene Santos Barbosa

Bióloga, Especialista em Protozoologia pelo Bernhard Nocht Institut da Alemanha, Doutora em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz. Pesquisadora Titular do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Leandro Medrado

Biólogo, Especialista em Educação Profissional pela Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz. Mestrando em Educação Profissional em Saúde pela EPSJV/Fiocruz. Técnico em Saúde Pública da EPSJV/Fiocruz (Egresso do Curso Técnico de Laboratório de Bodiagnóstico em Saúde/Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz)

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Bióloga, Tecnologista em Saúde Sênior do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. (Egressa do Curso Técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária/Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz, 1984)

Lycia de Brito Gitirana

Bióloga, Mestre em Histologia e Embriologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ, Doutora em Biologia pela University of Heidelberg. Professora Associada II do Instituto de Ciências Biomédicas/ICB/UFRJ.

Pedro Paulo de Abreu Manso

Biólogo, Mestre em Ciências pelo programa de Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz. Tecnologista em Saúde Pública do IOC/Fiocruz. (Egresso do Curso Técnico de Histologia da Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio/EPSJV/Fiocruz)

Suzana Côrte-Real

Bióloga, Doutora em Patologia pela Universidade Federal Fluminense e Especialista em Microscopia Eletrônica pelo Instituto Pasteur Lyon – França. Pesquisadora Titular III do Laboratório de Biologia Estrutural do Instituto Oswaldo Cruz/IOC/Fiocruz.

Sumário

Prefácio **9**

Apresentação **13**

“Um sonho quase realizado” **15**

Capítulo 1. Biologia celular e ultraestrutura **19**

Capítulo 2. Histologia **43**

Capítulo 3. Técnicas histológicas **89**

Capítulo 4. Técnicas citológicas **189**

Capítulo 5. Cultivo celular **215**

PREFÁCIO

O Chico Trombone costumava me dizer:

– Isso eu sei fazer, dr. Luiz Fernando, aprendi com Joaquim Venâncio.

E era com orgulho que se referia a seu mestre.

Vimos, portanto, que a formação de técnicos já vem dos tempos de Oswaldo. É claro que não era institucionalizada como hoje. Eram outros tempos.

Joaquim Venâncio nasceu na fazenda Bela Vista, em Minas Gerais. Era a fazenda da mãe de Carlos Chagas, pai. Em 1916, veio trabalhar no Instituto Oswaldo Cruz. Veio e deu certo. O dr. Lutz teria dito certa vez:

– Não troco o Venâncio por nenhum doutor de Oxford ou de Cambridge.

Se não disse, pensou.

Eficiência nos processos de seleção de pessoal? Competência do serviço de recursos humanos? Evidentemente que não. Não havia nada disso nessa época. As coisas eram muito mais simples, e davam certo. Veio porque era amigo do velho Carlos Chagas. Amigos de infância. Brincaram juntos na fazenda.

Quando Joaquim Venâncio faleceu, em 27 de agosto de 1955, teve seu necrológio publicado na *Revista Brasileira de Biologia*. Lugar de ne-

crologio de cientista famoso. Cito textual: “Joaquim Venâncio conseguiu, durante cerca de 35 anos que trabalhou ativamente, aprender zoologia que conhecia de modo invejável. Como decorrência das contingências da vida, não teve oportunidade de instruir-se, mas sua mentalidade era de um homem culto. Pela convivência com o dr. Lutz, pela observação direta do que via nas excursões e no laboratório, adquiriu conhecimento detalhado de vários grupos zoológicos, principalmente anfíbios, moluscos fluviais e trematódeos. Chegou a conhecer muito bem os anfíbios e, com grande facilidade, os classificava nas excursões pela voz. Dadas as indicações feitas pelo dr. Lutz em seus trabalhos, há casos em que foi citado na literatura como colaborador direto”.

Joaquim Venâncio era, sem dúvida, um naturalista. Era competente, tinha o domínio do ofício, a maestria da arte.

E gostava de ensinar. Ensinou muita gente.

Certa vez, o Venancinho me disse:

– Era a Escola do Venâncio, né? Foi muito boa, né?

* * *

Na presidência de Sergio Arouca, resolvemos atualizar a “Escola de Venâncio”. E foi assim que surgiu a Escola Politécnica, com o nome do seu patrono. Cresceu e abriu várias frentes, desde a vocação científica aos cursos de nível médio complementados pela formação de técnicos. Foi um êxito, como a antiga. Aparece sempre nos primeiros lugares nas avaliações e já se estendeu a outras instituições.

* * *

E agora surgem os livros didáticos. Organizado por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira, vem à luz a coleção **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos**

em **Laboratórios de Saúde**, reunindo professores de várias unidades da Fiocruz.

Os capítulos oferecem a história da técnica, os seus fundamentos, a maneira moderna de realizá-la, as suas aplicações, a organização do laboratório etc.

É útil para os cursos da Fundação e para outros externos. Mostra, também, o quanto as unidades da Fiocruz estão integradas na realização de suas tarefas.

Ensino é questão primordial. Sem ele, o país não se desenvolve.

Está de parabéns a Fiocruz pela realização de mais uma tarefa de primordial importância.

Oswaldo Cruz está orgulhoso dos seus continuadores.

Luiz Fernando Ferreira

Pesquisador Emérito da Fundação Oswaldo Cruz

Apresentação

A coletânea de livros intitulada **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**, organizada por Etelcia Moraes Molinaro, Luzia Fátima Gonçalves Caputo e Maria Regina Reis Amendoeira é antes de tudo uma obra original, importante e necessária. Original porque não existe na literatura técnica em saúde, na área biomédica brasileira e internacional, pelo menos que eu saiba, algo semelhante em abrangência, profundidade e seleção dos temas abordados; importante pelo público-alvo a que se destina, muito além da “Formação de Técnicos de Laboratórios”, abrangendo certamente todos os profissionais de saúde; e é necessária porque servirá como obra de referência para a formação dos mencionados técnicos e de consulta obrigatória para todos os profissionais de saúde que necessitem de esclarecimento dos aspectos técnicos ali abordados.

Versada em 5 volumes e 22 capítulos, organizados em sequência lógica, desde a biossegurança e boas práticas de laboratório, passando por todos os fundamentos das técnicas laboratoriais, bioquímica básica, biologia celular e molecular, histologia e ultraestrutura, até atingir o cerne da prática laboratorial, da imunologia à infectoparasitologia – virologia, bacteriologia, micologia, protozoologia e helmintologia e seus vetores, com a entomologia médica e a malacologia. Os autores que escrevem os respectivos capítulos são do melhor

nível intelectual e científico, com a titulação de mestres, doutores e especialistas, com grande experiência prática nos assuntos de que tratam.

Parabenizo o Instituto Oswaldo Cruz e a Escola Politécnica Joaquim Venâncio, que patrocinaram esta obra de referência e que desde seus primórdios, valorizaram a qualidade da formação dos seus técnicos e com eles povoaram e estão povoando o Brasil de Norte a Sul e de Leste a Oeste com o que temos de melhor – os fundamentos para uma boa pesquisa. Aproveito esta oportunidade para homenagear a figura de Henry Willcox, que, no início da década de 1980, quando o convidei para me ajudar na coordenação dos cursos de pós-graduação em Biologia Parasitária e Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, foi o grande incentivador para criarmos paralelamente o Curso de Técnico em Pesquisa, do qual foi o seu primeiro coordenador.

Igualmente parabenizo as organizadoras desta coletânea e a Fiocruz como um todo pelo lançamento desta obra pioneira.

José Rodrigues Coura

Pesquisador Titular Emérito
Chefe do Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC/Fiocruz

“Um sonho quase realizado”

(Oswaldo Cruz, 1872-1917)

As alterações pelas quais passa o mundo com a globalização trazem como consequência o surgimento de novos paradigmas tecnológicos, fazendo-se necessário que o ensino da área da saúde atenda às exigências do mundo moderno, do trabalho e do atual perfil do técnico da área.

Os cursos para a formação de técnicos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) buscam demonstrar os princípios científicos envolvidos com as técnicas laboratoriais, preparando os alunos para as transformações no mundo do trabalho em saúde, decorrentes do desenvolvimento tecnológico e científico. Neste contexto, duas unidades técnicas científicas desta instituição, o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e a Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio (EPSJV), historicamente são as responsáveis por coordenarem cursos e especializações técnicas que se firmaram como modelos desses princípios. Essas unidades, na área de ensino técnico, sempre estiveram intrinsecamente ligadas, e os professores realizam permanente parecerias entre si. Muitos de nós, egressos desses cursos, são hoje docentes e autores desta coleção.

Além da formação técnica de profissionais em nível regional e nacional, intensificou-se, na Fiocruz, a demanda para o estabelecimento de cooperações técnicas internacionais, que por sua *expertise* e capacidade de produzir, pas-

sou a divulgar conhecimentos, elaborando cursos, metodologias e tecnologias educacionais. A Escola Politécnica é Centro Colaborador da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a educação de técnicos em saúde desde 2004.

A ideia da publicação dessa coleção surgiu da necessidade conjunta das duas Unidades da Fiocruz de produzir material didático, que atendesse aos alunos dos cursos de nível técnico em Saúde da Fiocruz e de outros locais. Desse modo, o nosso principal desafio é oferecer conteúdo que abarque toda a área técnica de saúde utilizada nos principais cursos de nível médio, e que, ao mesmo tempo, possa manter-se suficientemente atualizado.

Dada a complexidade da estrutura instrumental e pedagógica dos cursos técnicos, se fez necessária a publicação de uma coleção, escolhendo-se tópicos de importância básica. Para tanto, foram convidados pesquisadores/professores com experiência em ensino de cursos de nível técnico e de destacado conhecimento nos temas abordados nos 22 capítulos, que constituem os 5 volumes da coleção.

A coleção **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde** tem como objetivo integrar conhecimentos teóricos e práticos, proporcionando ao aluno informações que possibilitem uma permanente reflexão de seu papel como agente transformador dos processos e atividades de ensino, pesquisa científica e desenvolvimento tecnológico. Outro objetivo inconteste destes livros é servir para professores, como norteadores da definição curricular de seus cursos.

Visando garantir a autonomia dos autores, e respectivas responsabilidades, foi mantida a formatação original dos textos, inclusive as fotos, figuras, diagramas. Podem ocorrer também algumas repetições de conteúdo em alguns capítulos, mas, a nosso ver, a retirada de partes de capítulos já abordadas poderia descontextualizar o texto.

O pontapé inicial deste sonho só foi possível pelo incondicional apoio dado pelo professor André Paulo da Silva Malhão, pela dra. Isabel Brasil Pereira, pessoa-chave desencadeadora do processo, e pela dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge, que apoiaram e incentivaram institucionalmente este projeto. Agradecemos especialmente aos autores que abraçaram este trabalho com muito entusiasmo e que possibilitaram a sua concretização. É um carinho especial para Josane Ferreira Filho pela organização paciente de nossas reuniões e textos, com a gratidão das organizadoras e autores.

Agradecemos em especial aos renomados cientistas eméritos da Fundação Oswaldo Cruz, doutores Luiz Fernando Ferreira – patrono da EPSJV – e José Rodrigues Coura, que nos deram a honra de apresentar esta coleção.

Esperamos, assim, contribuir para a sistematização do conhecimento dos leitores sobre os diversos tópicos abordados em cada capítulo, apresentando cada assunto de forma didática e sintética, recomendando a consulta à literatura especializada sempre que houver necessidade de aprofundamento do conhecimento em determinados temas.

Etelcia Moraes Molinaro
Luzia Fátima Gonçalves Caputo
Maria Regina Reis Amendoeira

Organizadoras

Capítulo 1

Biologia celular e ultraestrutura

Helene Santos Barbosa
Suzana Côrte-Real

1. Histórico

Citologia, ou biologia celular, é a ciência que estuda os vários sistemas celulares, a maneira como as células são reguladas e a compreensão do funcionamento de suas estruturas. A construção dos microscópios ópticos foi um passo decisivo para a descoberta das células, e acredita-se que o primeiro tenha sido inventado em 1592, por Jeiniere da Cruz e seu pai, Zacharias Jansen, dois holandeses fabricantes de óculos. Tudo indica, porém, que o primeiro a fazer observações microscópicas de materiais biológicos foi o holandês Antonie van Leeuwenhoek (1632-1723). O microscópio simples com apenas uma lente, construído por Leeuwenhoek, foi aprimorado por Robert Hooke em 1665, ganhando mais uma lente.

A partir dos estudos de Hooke em biologia, publicados em um livro intitulado *Micrographia* (1665), que analisou cortes finos de cortiça obtidos da casca do sobreiro, verificou que estes eram constituídos por pequenas cavidades poliédricas (no latim, *cella*), as quais foram denominadas células. Estes compartimentos representavam as paredes das células vegetais mortas. Em

1838, o botânico alemão Matthias Schleiden descreveu que a célula era a unidade básica de todas as plantas e, mais tarde, em 1839, o zoólogo alemão Theodor Schwann chegou à mesma conclusão para os animais. Com base nestes conhecimentos, elaborou-se a teoria celular que foi proposta por Schleiden e Schwann. Posteriormente, a associação de técnicas de coloração e de citoquímica foi capaz de revelar as estruturas e a fisiologia das células.

O grande avanço no conhecimento da biologia celular, sem dúvida, foi a invenção dos microscópios eletrônicos em 1931, por dois engenheiros alemães – Ernst Ruska e Max Knoll –, o que possibilitou a visualização das organelas celulares em grande detalhe.

A célula é uma unidade funcional que estabelece interação entre seus componentes, sob o aspecto fisiológico, biossintético e reprodutivo. A dinâmica celular para a manutenção da vida é regida por um processo de automanutenção, que compreende a modificação de estruturas, a substituição de componentes, de tal forma articulada que garanta a sua organização estrutural e funcional.

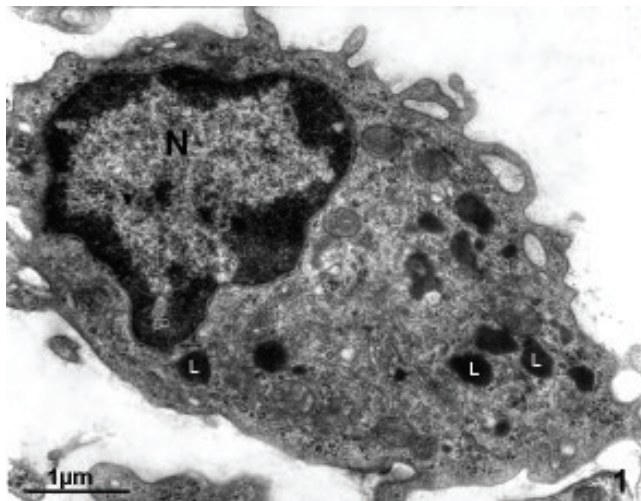
2. Células procarióticas e eucarióticas

A divergência entre procariontes e eucariontes deve ter ocorrido após serem estabelecidos os mecanismos de replicação e transcrição do ácido desoxirribonucleico (DNA), a tradução, o sistema de códons e os metabolismos energéticos e biossintéticos. O principal critério de distinção entre estes grupos é a sua organização celular. As células procarióticas (do latim *pro*-primeiro e *cario*-núcleo) são relativamente simples e se caracterizam por não apresentarem membrana, segmentando os ácidos nucleicos DNA) e ribonucleicos (ARN) do citoplasma. Além disso, algumas destas células apresentam uma membrana plasmática circundada externamente pela parede celular. As células eucarióticas (do latim *eu*-verdadeiro e *cario*-núcleo) constituem o tipo celular da constituição dos fungos, protozoários, animais e plantas. Estruturalmente, são células mais complexas, ricas em membranas que formam compartimentos,

ou seja, uma divisão de funções metabólicas entre as organelas citoplasmáticas e o núcleo, circundado pelo envoltório nuclear, onde está contido todo seu material genético. Para os eucariontes, a compartimentalização de atividades celulares em organelas circundadas por membranas fosfolipídicas foi decisiva para a homeostase celular.

Os componentes das células eucarióticas (Figura 1) compreendem: a membrana citoplasmática, o citoplasma, o núcleo, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias, os peroxissomos, as inclusões lipídicas, o glicogênio, o citoesqueleto, os centríolos, o centrossomo, os cloroplastos (encontrados em vegetais) e a parede celular, sendo esta última encontrada em fungos e vegetais. As características morfológicas e fisiológicas das principais estruturas encontradas nas células eucarióticas serão apresentadas a seguir.

Figura 1. Célula eucariótica mostrando membrana plasmática, núcleo (N) e organelas.



2.1. Membrana celular

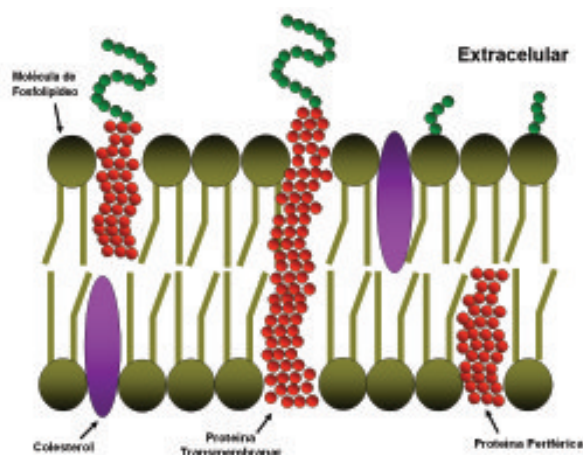
A membrana plasmática ou celular atua na manutenção de microambientes, formando uma barreira que impede o conteúdo celular de escapar e se misturar com o meio circundante. Esta membrana confere individualidade a cada célula,

definindo os meios intra e extracelulares. Além desta função, a membrana plasmática é o primeiro contato entre esses meios, traduzindo informações para o interior da célula e permitindo que ela responda a estímulos externos que podem influenciar nas suas funções biológicas, participando decisivamente das interações célula – célula e célula – matriz extracelular.

A membrana plasmática e a membrana das diferentes organelas celulares medem cerca de 7 a 10 μm de espessura e são visíveis somente ao microscópio eletrônico. Trata-se de uma estrutura trilaminar constituída de duas camadas eletrondensas (escuras) e uma camada eletrólúcida (clara) central. Molecularmente são formadas por uma bicamada fluída de fosfolipídios (fosfoglicerídeos e esfingolipídios) e colesterol, onde estão inseridas moléculas de proteínas. A membrana plasmática não é uma estrutura estática, os lipídios movem-se proporcionando fluidez à membrana.

Esquema mostrando a bicamada da membrana plasmática:

Figura 2. A membrana plasmática é formada por moléculas de lipídeos (fosfoglicerídeos e esfingolipídeos), colesterol, proteínas periféricas (localizadas somente em uma das camadas dos fosfolipídeos) e as transmembranares (localizadas nas duas camadas dos fosfolipídeos, ligando o meio extracelular ao citoplasma). A cadeia de pequenas moléculas verdes representa os carboidratos localizados somente no lado externo da membrana plasmática.



Os carboidratos presentes nesta estrutura, como, por exemplo, glicose, manose, fucose e galactose, estão ligados às proteínas, formando as glicoproteínas; ou aos lipídios, resultando nos glicolípídios e nos glicosfingolípídios. Estes carboidratos estão presentes apenas na face externa da membrana e fornecem identidade à célula.

A membrana apresenta uma propriedade imprescindível para manutenção da viabilidade celular, que é a permeabilidade seletiva, controlando a entrada e a saída de substâncias da célula. A passagem de moléculas polares maiores e os íons requer canais, formados por proteínas transmembranares.

○ transporte de moléculas para o interior das células pode ser:

a) transporte passivo – por difusão ou por osmose, quando não envolve o consumo de energia do sistema, sendo utilizada apenas a energia cinética das moléculas. Sendo assim, a movimentação dos íons e moléculas dá-se a favor do gradiente de concentração (do meio hipertônico para o meio hipotônico). A difusão pode ser auxiliada por enzimas (difusão facilitada) ou pode não ter participação de nenhuma delas (difusão simples). A difusão simples ocorre quando moléculas hidrofóbicas pequenas e polares, como O_2 , CO_2 , N_2 e C_6H_6 , passam pela membrana sem serem bloqueadas;

b) transporte ativo – é quando o transporte das moléculas envolve a utilização de energia pelo sistema, na forma de adenosina trifosfato (ATP). A movimentação das substâncias se dá contra o gradiente de concentração, ou seja, do meio hipotônico para o hipertônico, como, por exemplo, a bomba de sódio e potássio, que tem função de manter o potencial eletroquímico das células.

Entretanto, partículas maiores não conseguem atravessar a membrana, mas podem ser incorporadas à célula pela própria estrutura da membrana celular, ocorrendo, assim, a formação de vesículas. A este processo, no qual a membrana celular envolve partículas ou fluido do exterior, dá-se o nome de **endocitose**. Ele ocorre por dois mecanismos:

- a) **fagocitose** – quando ocorre a captação de moléculas maiores, partículas ou microrganismos. Neste processo, a partícula a ser ingerida toca na membrana celular, formando projeções chamadas de filopódios;
- b) **pinocitose** – processo utilizado pela célula para englobar porções de fluidos extracelulares e pequenas moléculas. Neste caso, a membrana sofre um processo de invaginação, ocorrendo a formação de pequenas vesículas. Estas são direcionadas para o citoplasma para que ocorra a absorção dos nutrientes. Por outro lado, para eliminar substâncias residuais, a célula utiliza o processo de **exocitose**, no qual uma vesícula, vinda do citoplasma contendo material que deve ser eliminado, se funde à membrana plasmática, lançando o seu conteúdo no meio extracelular.

2.1.1. Especializações da membrana plasmática

A comunicação e a coesão entre as células são estabelecidas por meio das membranas, formando três classes funcionais de junções celulares:

- a) **junção ancorante ou aderente** – célula-célula ou célula-matriz, às quais a força de estresse é transmitida ao citoesqueleto. Existem vários tipos desta junção; destacamos, dentre eles, os desmossomas, os hemidesmossomas e junções que circundam completamente as células, atuando como uma barreira de permeabilidade e tensão;
- b) **junção apertada ou oclusiva** (*tight junctions*) – é um tipo de junção que liga duas células vizinhas, selando os espaços entre elas e tornando essa região impermeável, não permitindo, assim, a passagem de pequenas moléculas ou íons;
- c) **junção mediada por canais proteicos** – são as junções comunicantes (*gap junctions*) que permitem a passagem de moléculas e de íons entre duas células adjacentes.

2.2. Citoplasma

O citoplasma, ou citossol das células eucariotas, é formado por uma solução coloidal, viscosa e de aspecto relativamente uniforme, que contém água (80%), íons diversos, aminoácidos e proteínas. No citoplasma estão localizados o núcleo e as organelas celulares, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomos, as mitocôndrias, os peroxissomos e, ainda, as inclusões lipídicas, os grânulos de glicogênio e os ribossomos. Estas estruturas são responsáveis pelas funções celulares, como digestão, respiração, secreção, síntese e transporte de proteínas. No citoplasma estão também os elementos do citoesqueleto, responsáveis por várias atividades dinâmicas das células, e os centríolos, estruturas geradoras dos microtúbulos.

2.3. Núcleo

Estrutura extremamente importante para as células eucarióticas, pois nele estão contidos os ácidos nucleicos (código genético), protegidos pelo envoltório nuclear. É no seu interior que ocorre a duplicação do DNA e a transcrição dos ARNs.

O núcleo tem sua localização geralmente no centro da célula e a sua forma pode estar relacionada ao tipo celular. O envoltório nuclear é composto por duas membranas, uma externa e outra interna, com composições proteicas distintas, que delimitam um espaço variável que oscila entre 40 e 70 μm . A membrana interna deste envoltório se encontra associada à lâmina nuclear, que, por sua vez, está ligada fortemente à cromatina. A membrana externa do envoltório circunda a membrana interna e é contínua com a membrana do retículo endoplasmático (RE). Este fato faz com que o espaço existente entre as membranas do envoltório seja também contínuo à luz do RE. Assim como a membrana do RE, a membrana externa do envoltório – face citoplasmática – apresenta ribossomos aderidos que estão envolvidos ativamente na síntese proteica. O envoltório nuclear é interrompido regularmente, formando os poros nucleares.

Eles têm número e densidade bastante variáveis, dependendo do tipo celular e estado metabólico da célula. Pelos poros, ocorre o transporte bidirecional seletivo de proteínas e ARNs entre o citossol e o núcleo.

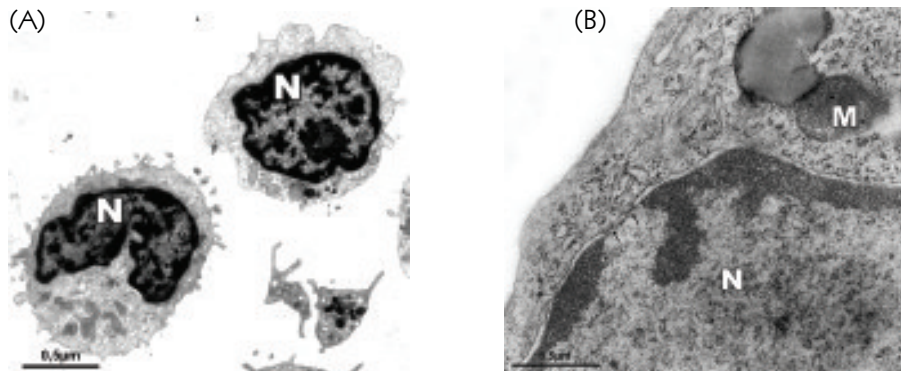
No núcleo (Figura 3) de células em intérfase encontra-se a cromatina – compactada (heterocromatina) ou frouxa (eucromatina) – composta de moléculas de DNA, proteínas histônicas e não histônicas. As histonas, proteínas básicas encontradas nos eucariotos, são importantes componentes da estrutura da cromatina, participando não somente como repressoras, mas também como ativadoras na transcrição do DNA. Por outro lado, as proteínas não histônicas desempenham papel estrutural e enzimático, participando da atividade gênica.

No núcleo interfásico também estão os nucléolos, cuja função é sintetizar ARNs e enviá-los para o citoplasma. Os nucléolos podem ter estrutura reticular ou compacta e o tamanho e a forma dependem do estado funcional da célula, variando conforme o tipo celular. Durante o ciclo celular, geralmente os nucléolos desaparecem a partir do final da prófase, reaparecendo no final da telófase.

A lâmina nuclear está presente no núcleo, tendo papel importante na reorganização nuclear após o término da divisão celular. Ela está ancorada às proteínas integrais da membrana interna do envoltório nuclear e ligada fortemente à cromatina. É constituída por proteínas filamentosas intermediárias do tipos A e B que se polimerizam em uma rede bidimensional.

Da estrutura do núcleo faz parte a matriz nuclear, que forma uma rede proteica fibrogranular alicerçando o núcleo. Ela está associada ao DNA durante os processos de duplicação e regula a transcrição nos eucariotos, juntamente com as histonas.

Figura 3. (A) Monócitos mostrando o núcleo ocupando grande extensão do citoplasma da célula; (B) célula eucariótica, apresentando núcleo com poros (setas) e mitocôndrias (M).



2.4. Retículo endoplasmático

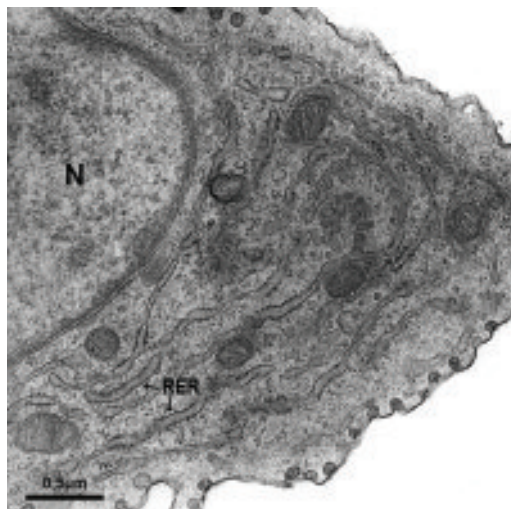
O retículo endoplasmático (RE) é encontrado na maioria das células, ocupando cerca de 10% do volume celular. É formado por uma rede de membranas interconectadas na forma de tubos ou cisternas. Dois tipos de retículo endoplasmático são observados: liso (ou agranular) e rugoso (ou granular), os quais apresentam características morfológicas e funcionais distintas.

O retículo endoplasmático liso, ou agranular, é caracterizado pela ausência de ribossomos aderidos à sua membrana e apresenta-se como uma rede de delgados túbulos que se anastomosam entre si. As funções desse retículo são muito variadas, dentre elas a síntese de hormônios e de lipídios, a desintoxicação celular – com a conversão de substâncias nocivas lipossolúveis ou insolúveis em compostos hidrossolúveis – e o armazenamento de cálcio.

O retículo endoplasmático rugoso (Figura 4), ou granular, é caracterizado pela presença de polirribossomos (ribossomos e ARNm) aderidos ao lado externo da membrana. Esta organela apresenta formas variadas, frequentemente em forma de túbulos achatados e longos ou bem dilatados, podendo estar

localizada em vários pontos da célula ou concentrada em determinadas áreas do citoplasma. O RE rugoso, em parceria com os polirribossomos, tem um importante papel na síntese e exportação de proteínas. As proteínas são capturadas pelo RE, por receptores presentes na sua membrana, assim que começam a ser sintetizadas pelo complexo de ribossomos e ARNm. As proteínas sintetizadas podem ter dois destinos: como proteínas transmembranares ou proteínas hidrossolúveis. As proteínas transmembranares podem permanecer na membrana do retículo ou serem destinadas à membrana plasmática e à membrana de outras organelas. Por outro lado, proteínas hidrossolúveis, quando sintetizadas, podem ser direcionadas para o complexo de Golgi ou encaminhadas ao *lúmen* de alguma organela e secretadas no meio extracelular.

Figura 4. Retículo endoplasmático rugoso (RE) dilatado de fibroblasto, apresentando ribossomos aderidos à membrana.

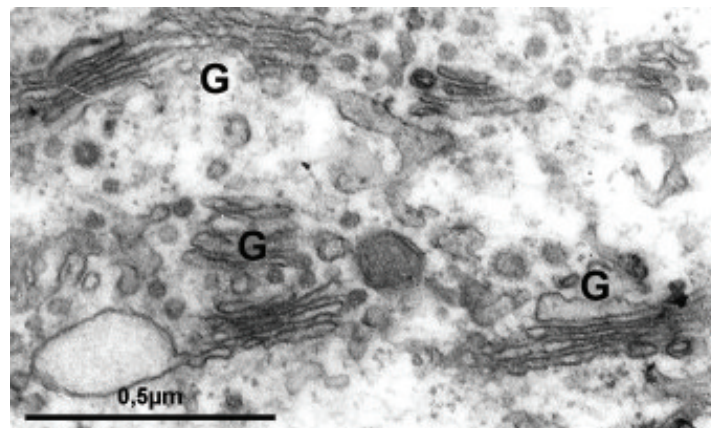


2.5. Complexo de Golgi

O complexo de Golgi, aparelho de Golgi ou simplesmente Golgi (Figura 5) foi descrito em 1898 pelo biólogo italiano Camilo Golgi e é formado por vesículas e túbulos achatados empilhados e organizados, chama-

dos de cisternas (cerca de 4 a 8 cisternas). As cisternas voltadas para o retículo endoplasmático são convexas (*cisternas cis*). As centrais são denominadas cisternas medianas, e as mais próximas ao sítio de secreção são côncavas (*cisternas trans*). O complexo de Golgi apresenta como principais funções o processamento de lipídeos e proteínas (denominados de glicosilação, sulfatação e fosforilação) e a separação e o endereçamento de moléculas sintetizadas fazendo parte da via biossintética secretora (RE – síntese; Golgi – processamento e seleção; vesículas – transporte). As vias secretoras compreendem o transporte de lipídeos, proteínas e polissacarídeos aos destinos finais e o empacotamento das macromoléculas em diferentes vesículas de transporte. Essas vesículas transportadoras direcionam proteínas/lipídeos/hormônios do retículo endoplasmático para o complexo de Golgi (face *cis*); o transporte de proteínas/lipídeos (modificados) do complexo de Golgi para o retículo endoplasmático (face *cis*) e para a superfície celular (face *trans*) e, ainda, o transporte das moléculas que originam os lisossomos (face *trans*).

Figura 5. Citoplasma de célula eucariótica apresentando complexo de Golgi (G) com suas cisternas empilhadas, vesículas e mitocôndrias.



2.6. Lisossomos

Os lisossomos são estruturas geralmente esféricas, delimitados por uma membrana, que apresentam uma grande variação no seu tamanho. Eles são formados no complexo de Golgi, e em seu interior se encontram acumuladas cerca de quarenta enzimas hidrolíticas com propriedade de digerir uma grande gama de substratos, incluindo nucleases, proteases, glicosidases, lipases, fosfolipases e sulfatases. Estas hidrolases têm um pH ótimo entre 3 e 6, e, assim, o interior dos lisossomos é ácido. A acidificação é realizada por bombas de H^+ , que usam ATP. As suas enzimas são glicoproteínas provenientes do Golgi, que saem da sua face trans em vesículas específicas. A compartimentalização destas enzimas impede a lise indiscriminada dos conteúdos celulares. A principal função do lisossomo é a digestão intracelular, permitindo, assim, que a célula seja capaz de degradar partículas, macromoléculas, microrganismos ou outras células provenientes da endocitose. Além disso, os lisossomos agem na eliminação de organelas ou partes danificadas da própria célula, por um processo denominado **autofagia**. A formação dos autolisossomos se inicia quando uma porção de RE envolve uma organela que deve ser destruída, formando uma vesícula em seu redor. Esta vesícula é posteriormente acidificada e funde-se com um lisossomo primário, que inicia a degradação. Na heterofagia, os lisossomos fundem-se com endossomos (provenientes da endocitose) ou fagossomos (provenientes da fagocitose).

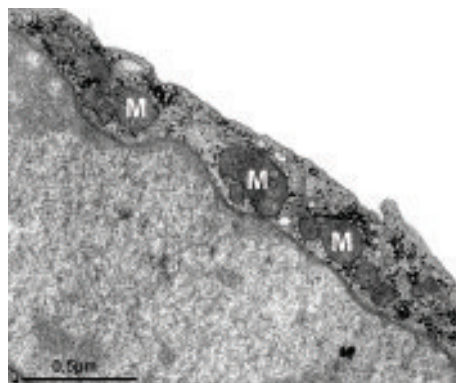
2.7. Mitocôndrias

As mitocôndrias (Figura 6) estão presentes no citoplasma das células eucarióticas, sendo caracterizadas por uma série de propriedades morfológicas, bioquímicas e funcionais. Geralmente, são estruturas cilíndricas, podendo ser esféricas, ovoides e alongadas, com aproximadamente $0,5 \mu m$ de diâmetro e vários micrômetros de comprimento. Possuem grande mobilidade, localizando-se em sítios intracelulares onde há maior necessidade de energia, pois sua função principal é a produção de ATP. Uma célula hepática normal pode

conter de 1.000 a 1.600 mitocôndrias, enquanto alguns ovócitos podem conter até 300 mil. Possuem organização estrutural e composição lipoproteica características, e contêm um grande número de enzimas e coenzimas que participam das reações de transformação da energia celular. Esta organela é caracterizada pela presença de um envoltório formado por duas membranas estrutural e funcionalmente distintas, as quais delimitam dois espaços. Existe um espaço intermembranar separando as membranas interna e externa, e um segundo gerado pela membrana interna, delimitando a matriz mitocondrial. A membrana interna apresenta uma série de invaginações para o interior da mitocôndria, gerando as cristas mitocondriais, onde estão presentes os componentes da cadeia respiratória responsáveis pela síntese de ATP. As mitocôndrias apresentam uma molécula de DNA circular, semelhante àquelas encontradas nas bactérias. Além disso, contêm todo mecanismo necessário para replicação e transcrição do DNA e tradução de proteínas. Entretanto, apenas uma pequena quantidade de proteínas é codificada pelo DNA mitocondrial. Com base nessas evidências, surge a teoria endossimbiótica.

A mitocôndria é considerada a usina da célula, uma vez que esta é capaz de processar oxigênio e glicose e convertê-los em energia na forma de ATP, por meio do ciclo de Krebs e da cadeia respiratória.

Figura 6. Fibroblasto: mitocôndrias apresentando a matriz mitocondrial eletrodensa, cristas mitocondriais e a dupla membrana.



2.8. Peroxissomos

Os peroxissomos (Figura 7) são organelas envolvidas por apenas uma membrana e não contêm DNA e nem ribossomos; todas as suas proteínas devem ser importadas do citosol. Apresentam em seu interior um conteúdo granuloso fino e são geralmente arredondadas, medindo cerca de 0,5 μm de diâmetro. No seu interior, é comum se observar a presença de uma porção fortemente eletrodensa, o nucleoide. Dentre as enzimas encontradas nos peroxissomos destacam-se a catalase, a urato oxidase, a D-aminoácido oxidase e as enzimas responsáveis pela beta oxidação dos ácidos graxos. Os peroxissomos assemelham-se ao retículo endoplasmático porque se autorreplicam sem possuir genomas próprios. Nas células animais, os peroxissomos participam da biossíntese de precursores de glicerolípídeos, do colesterol e do dolicol. O número relativo de peroxissomos na célula pode variar rapidamente em resposta às mudanças ambientais e às condições fisiológicas. Os processos de sequestro e degradação dos peroxissomos são denominados macroautofagia e microautofagia.

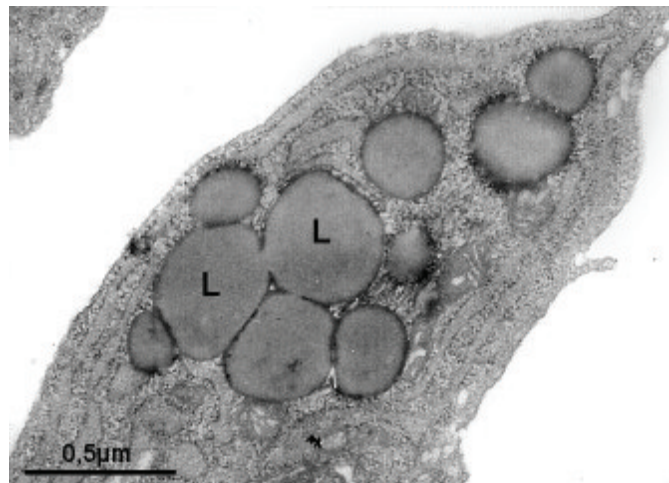
2.9. Inclusões lipídicas

Inclusões lipídicas (também chamadas de corpos lipídicos, gotas lipídicas ou adipossomas) são organelas ricas em lipídios presentes em todos os organismos, incluindo fungos, procaríotos e eucariontes. Elas variam de tamanho, têm aspecto circular e estão distribuídas por todo o citoplasma das células.

Os corpos lipídicos são circundados não pela clássica bicamada de membrana, mas por uma monocamada de fosfolipídios, a qual, no mínimo em algumas células, deve ter uma única composição de ácidos graxos. O núcleo interno dos corpos lipídicos é rico em lipídios neutros, mas estudos com leucócitos têm demonstrado que os corpos lipídicos não são simples sacos de lipídios neutros. Considera-se atualmente que sejam organelas funcionalmente ativas, altamente reguladas e dinâmicas. Pelo uso de técnicas para identificação

subcelular de frações enriquecidas de corpos lipídicos, combinado com imunodeteção de proteínas por microscopia eletrônica e de luz, tem sido demonstrado que corpos lipídicos compartimentalizam enzimas envolvidas na biossíntese, transporte e catabolismo de lipídios, caveolina e de proteínas envolvidas no transporte vesicular. A formação regulada de corpos lipídicos, seus conteúdos proteico e lipídico, e sua associação com outras organelas intracelulares, em algumas células especializadas, atuam na sinalização e ativação celulares, regulação do metabolismo de lipídios, tráfego de membrana e controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios.

Figura 7. Inclusões lipídicas.

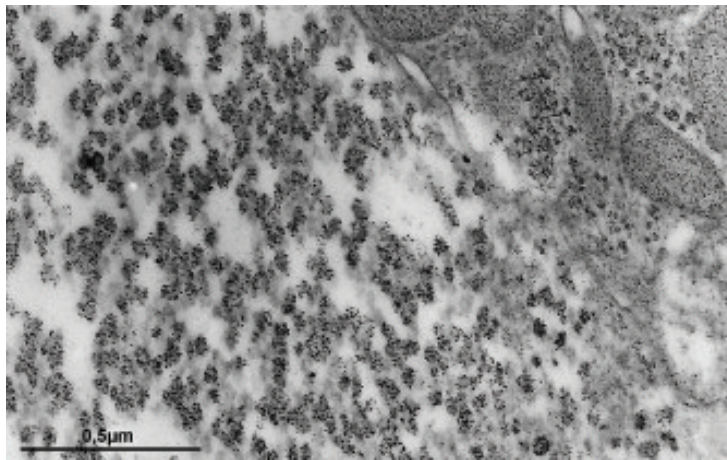


2.10. Glicogênio

O glicogênio (Figura 8) é um polissacarídeo constituído por subunidades de glicose com uma ramificação a cada oito ou dez unidades. Ocorre internamente, na forma de grandes agregados ou grânulos no citoplasma. É o meio de armazenamento mais importante nas células animais, servindo de reservatório de glicose. Os hepatócitos são responsáveis pela manutenção da glicemia, ao

mesmo tempo em que fornecem glicogênio para outras células do organismo. Principal fonte de energia no cérebro, os glicogênios produzidos pelos astrócitos são mobilizados para atividade neuronal.

Figura 8. Glicogênio distribuído no citoplasma de célula eucariótica.



2.11. Citoesqueleto

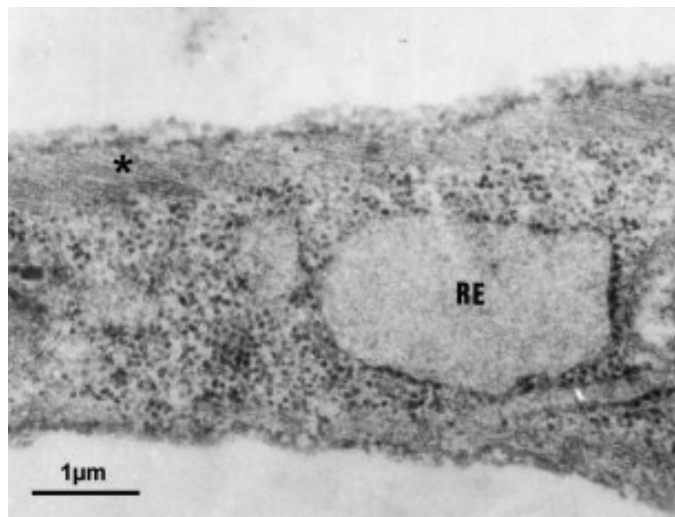
O citoesqueleto confere às células eucarióticas a manutenção da diversidade de formas, a realização de movimentos coordenados e direcionados e sua estruturação interna. Esse citoesqueleto depende de uma complexa rede de filamentos de proteínas que se estende por todo o citoplasma, sendo constituído por três principais tipos de estruturas: os microtúbulos, os filamentos intermediários e os filamentos de actina.

Os microtúbulos são formados por subunidades: β -tubulina e α -tubulina, as quais se associam uma às outras, conferindo-lhe assim uma forma cilíndrica, com o diâmetro de 25 μm . Os microtúbulos direcionam o deslocamento de vesículas, participam da divisão celular com a formação do fuso mitótico para o deslocamento dos cromossomos e estão presentes na manutenção da estrutura celular e na morfologia dos cílios e flagelos.

Os filamentos intermediários recebem esta denominação por apresentarem um diâmetro intermediário entre filamentos de actina e microtúbulos (10 μm de diâmetro). Sua composição é proteica, formando uma rede estrutural por toda a célula.

Os filamentos de actina (Figura 9) estão distribuídos por todo o citoplasma das células eucarióticas e apresentam diâmetro de 5 μm . Eles são formados por uma proteína globular, a actina, que apresenta as isoformas: α , β e γ . Estes filamentos, nas células epiteliais, estão concentrados nos prolongamentos citoplasmáticos, participando, juntamente com os desmossomos, do contato com outras células e com a membrana basal, mantendo, assim, a integridade organizacional do epitélio. Nos miofibroblastos, importantes células do tecido muscular, os filamentos de actina estão organizados paralelamente à membrana plasmática, mantendo estas células tensionadas ao substrato e são, então, denominados fibras de estresse.

Figura 9. Fibra estresse (asterisco) localizada abaixo da membrana, formada por microfilamentos de actina.



2.12. Centrossomo

O centrossomo, principal centro organizador de microtúbulos, está localizado próximo ao núcleo da célula em intérfase e contém um par de formações cilíndricas e curtas dispostas perpendicularmente entre si e envolvidas por material pericentriolar, denominadas **centríolos**. Estas estruturas são formadas por nove triplex de microtúbulos, semelhantes aos corpos basais de flagelos e cílios. Estão presentes na maioria das células animais, porém ausentes nas células vegetais.

3. Técnicas para visualização das organelas celulares

3.1. Protocolos para revelação do núcleo

O núcleo pode ser visualizado tanto por microscopia de campo claro, com a utilização do corante Giemsa, quanto por microscopia de fluorescência, utilizando o corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindole). Por ME, ele pode ser visualizado quando se utiliza acetato de uranila, que torna a cromatina eletrodensa.

3.1.1. Marcação nuclear com DAPI

- 1- Fixar com 4% de PFA por 20 minutos a 4°C;
- 2- Lavar duas vezes com PBS;
- 3- Lavar duas vezes com solução de BSA 1% diluída em PBS por 10 minutos cada;
- 4- Incubar com DAPI 1:10.000 em 0,85% NaCl por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 5- Lavar três vezes com solução de BSA 1% diluída em PBS por 10 minutos cada;
- 6- Montar com DABCO;
- 7- Selar com esmalte.

3.1.2. Coloração com Giemsa

- 1- Fixar com Bouin por 5 minutos em temperatura ambiente;
- 2- Lavar três vezes com álcool etílico a 70%;
- 3- Lavar uma vez com água destilada;
- 4- Corar com Giemsa (6 gotas de corante para cada 1 mL de tampão fosfato 0,2M – solução de uso – filtrado), por 15 minutos em temperatura ambiente;
- 5- Lavar duas vezes em água destilada. Para clarificação, passar em série de acetona / xilol (acetona 100% duas vezes, acetona 70% / xilol 30%, acetona 50% / xilol 50%, acetona 30% / xilol 70%, xilol 100% duas vezes);
- 6- Montar com Permount.

Preparação do tampão fosfato 0,2M:

Solução A:

NaH₂PO₄ . 1 H₂O (fosfato de sódio monobásico) 27,6 g
 Água tridestilada..... 1 L

Solução B:

Na₂HPO₄ (fosfato de sódio bibásico)..... 39,4 g
 Água tridestilada..... 1L

Solução estoque do tampão:

Solução A.....28 mL
 Solução B.....72 mL

Solução de uso:

Diluir 1:10 (solução estoque: água tridestilada).

3.2. Protocolo de marcação do retículo endoplasmático

O RE pode ser observado por microscopia de fluorescência pela utilização de marcador fluorescente específico, o ER-Tracker. E, por microscopia eletrônica de transmissão, utilizando-se citoquímica ultraestrutural, revelando a enzima glicose-6-fosfato.

3.2.1. ER-Tracker

• Preparação de reagentes

O ER-Tracker Green é fornecido liofilizado em 100 µg. Preparar uma solução estoque de 1 mM. Para isso, deve-se diluir todo o conteúdo do frasco liofilizado em 128 µL de DMSO. É recomendado que esta solução seja separada em alíquotas e estocada em *freezer* com dessecante.

Preparo da solução de marcação

- Diluir a solução estoque de ER-Tracker a 1 µM para a concentração recomendada de 500 µM em meio simples;
- Para células aderidas, remover o meio da cultura, lavar três vezes com meio simples e adicionar a solução de marcação pré-aquecida. Incubar as células por 30 minutos a 37 °C. Substituir a solução de marcação por meio de cultura e visualizar as células, utilizando microscópio de fluorescência. Se as células a serem marcadas precisarem ser fixadas, consultar as etapas de marcação a seguir.

Fixação das células ER-Tracker Green

Lavar as células em meio simples por três vezes. Fixar com PFA 4% por 20 minutos em temperatura ambiente. Lavar três vezes com PBS, montar entre lâmina e lamínula com DABCO.

3.3. Protocolo para marcadores seletivos de mitocôndria

Mitocôndrias podem ser reveladas com marcadores fluorescentes específicos, como MitoTracker e Rhodamine 123, os quais são visualizados por microscopia de fluorescência. Graças à sua morfologia típica, são facilmente identificadas durante as análises por microscopia eletrônica.

3.3.1. Mito-Tracker

- **Preparando a solução estoque**

Dissolver o produto liofilizado em DMSO de alta qualidade para uma concentração final de 1 μm ; o peso molecular é indicado no rótulo do produto. Soluções em que se utilizam derivados di-hidro devem ser preparadas no dia do uso. A solução estoque pode ser armazenada em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, protegida da luz.

- **Preparando solução de marcação**

A concentração para uma boa marcação varia de acordo com a sua aplicação. As condições sugeridas aqui podem necessitar de modificações baseadas nos tipos celulares utilizados ou em outros fatores, tais como permeabilidade das células ou dos tecidos a serem marcados. Diluir a solução estoque de MitoTracker a 1 μm para uma solução de uso com meio de crescimento *Dulbecco's modified Eagle medium* (D-MEM), sem soro, ou de acordo com o meio em que as células estão crescendo. Para marcação em células vivas, usar uma concentração de 100 μm .

- **Marcando células aderidas**

Crescer as células em lamínulas dentro de uma placa de Petri coberta pelo meio de cultura apropriado. Quando as células alcançarem a confluência desejada, remover o meio da placa, lavar três vezes em meio simples e adicionar o meio pré-aquecido ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) contendo MitoTracker. Incubar as células por 30 minutos sob condições de crescimento apro-

priadas para cada tipo celular. Substituir o meio com marcador por meio pré-aquecido e observar as células em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro adequado. Para fixar as células, deve-se retirar o meio com marcador e lavá-las com meio simples. Fixar com PFA 4% por 20 minutos em temperatura ambiente, lavar três vezes com PBS e montar entre lâmina e lamínula com DBCO.

3.4. Protocolo de marcação de grânulos de glicogênio

Para caracterizar a expressão de polissacarídeos – grânulos de glicogênio –, utilizamos métodos citoquímicos ultraestruturais, empregando a técnica de Thiéry. O material deve ser processado de acordo com o protocolo de microscopia eletrônica de transmissão, sendo as amostras incluídas em resina Epon. Os cortes ultrafinos são obtidos e recolhidos em grades de ouro e submetidos ao seguinte protocolo:

3.4.1. Thiéry

- 1- As células são oxidadas por 20 minutos com 1% de ácido periódico;
- 2- Lavadas rapidamente por duas vezes em água destilada;
- 3- Incubadas por 30 minutos, 24, 48 ou 72 horas, em câmara úmida, com 2% de tiocarbohidrazida diluída em 20% (v/v) de ácido acético;
- 4- Lavadas sucessivamente em concentrações decrescentes de ácido acético (10%, 5%, 3% e 1%) por 1 minuto cada;
- 5- Reveladas com 1% de proteinato de prata diluído em solução aquosa por 30 minutos. OBS: metodologia alternativa, após as etapas descritas anteriormente, a revelação será realizada pelo vapor de tetróxido de ósmio por 1 minuto;

6- Lavadas com água (uma vez rapidamente), seguidas de uma lavagem por 10 minutos, trocando a água sucessivas vezes;

7- Ao final, os cortes serão examinados diretamente ao microscópio eletrônico EM10C da Zeiss, sem prévia contrastação.

Os controles da reação serão feitos por:

- a) Omissão de tiocarbohidrazida;
- b) Omissão da oxidação com ácido periódico;
- c) Omissão dos agentes reveladores.

3.5. Protocolo para marcação de compartimentos intracelulares ácidos

A marcação de compartimentos intracelulares ácidos – lisossomos – pode ser feita utilizando os marcadores laranja de acridina e Lysotraker:

- 1- Diluir a solução estoque a 1 mM para uma solução de uso a uma concentração de 75 nM. A diluição deve ser feita em meio de cultura simples;
- 2- Remover o meio da placa, lavá-la com meio simples três vezes e adicionar o meio pré-aquecido (37 °C) contendo o marcador;
- 3- Incubar as células com laranja de acridina ou Lysotraker diluída em meio utilizado para o cultivo celular na concentração de 10µg/ml e 75 nM, respectivamente, por 30 minutos a 37 °C, sob condições apropriadas para crescimento de cada tipo celular;
- 4- Após incubação, lavar duas vezes em salina tamponada com fosfato (PBS) e observar as células em microscópio de fluorescência com o filtro adequado;
- 5- Fixar com 2% paraformaldeído durante 20 minutos a 4 °C e, em seguida, lavar três vezes com PBS;

- 6- Em seguida, incubar com 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) para visualização do núcleo por cinco minutos à temperatura ambiente;
- 7- Lavar com PBS;
- 8- Montar a lâmina com *antifading* 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO).

Referências bibliográficas

- ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 4. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2004.
- CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. *A Célula*. São Paulo: Manole, 2001.
- GIEMSA, G. Eine Vereinfachung und Vervollkommung meiner Methylenblau-Eosin-Färbemethode zur Erzielung der Romanowsky-Nocht'schen Chromatinfärbung. *Centralblatt für Bakteriologie, I, Abteilung Originale*, v. 32, p. 307-313, 1904.
- THIÉRY, J. P.; RAMBOURG, A. Cytochimie des polysaccharides. *J. Microscopie*, v. 21, p. 279-282, 1974.

Capítulo 2

Histologia

Daniel Santos Souza

Leandro Medrado

Lycia de Brito Gitirana

1. Introdução

A histologia é um ramo da ciência que estuda os tecidos de animais e vegetais e como estes tecidos se organizam e se relacionam para compor estes diferentes organismos.

A separação dos tecidos em estruturas distintas é algo “artificial” e feita com fim puramente didático, como estratégia para a compreensão de suas características principais. Só com um bom conhecimento das suas características individuais poderemos entender e avaliar a histologia nos diferentes órgãos do organismo e como os diferentes tecidos se inter-relacionam de maneira dinâmica.

O termo histologia foi usado pela primeira vez em 1819 por Mayer, ao utilizar o termo “tecido” (do grego *histos*) cunhado pelo anatomista e fisiologista francês Xavier Bichat (1771-1802). Foi Bichat quem aprofundou a análise anatomopatológica, deslocando a doença dos órgãos para os tecidos, utilizando como princípio básico o isomorfismo dos tecidos (Foucault, 2008).

De acordo com suas análises, o organismo era composto de tecidos com “texturas” semelhantes, que podiam ser “lidas”, identificando as similaridades, parentescos e inter-relações das doenças inscritas na configuração do corpo. Ao identificar estas semelhantes texturas do organismo e suas respectivas funções é que nasce a histologia como base da que conhecemos hoje.

Nos humanos, os tecidos são divididos em quatro grandes grupos de acordo com as diferenças morfológicas e suas especializações funcionais (condutibilidade, contratilidade, absorção, excreção e reprodução, dentre outras).

Esses quatro tecidos são: os tecidos epiteliais, tecidos conjuntivos, tecidos musculares e tecidos nervosos.

2. Tecido epitelial

O tecido epitelial se caracteriza principalmente por ser constituído de células bem justapostas, geralmente poliédricas, com pouca substância intercelular e ausência de vascularização.

As células epiteliais são bastante dinâmicas, possuindo uma elevada atividade mitótica que promove a constante renovação epitelial. Essa taxa de renovação, entretanto, é variável de acordo com o tecido avaliado.

As funções mais características dos epitélios são a de **revestimento de superfícies** externas e internas do organismo, e a **formação das glândulas**.

As células epiteliais são provenientes das células que constituem os três folhetos germinativos do embrião (ectoderma, endoderma e mesoderma).

A forma de suas células e a justaposição celular que apresentam é garantida por um conjunto de junções celulares especializadas. Essas junções celulares vão ter apresentação variável de acordo com a especificidade funcional do tecido no qual se encontram, mas de uma forma geral apresentam as seguintes características:

- **Zônula de oclusão:** localizada na porção apical das células epiteliais, é formada por proteínas integrais da membrana plasmática que se ligam ao cinturão adesivo das células vizinhas, impedindo a passagem de moléculas entre elas, havendo, portanto, obliteração do espaço intercelular.
- **Zônula de adesão:** localizada abaixo da zônula de oclusão, tem como função aumentar a adesividade intercelular.
- **Desmossomos:** podem ser comparados a um botão de pressão, constituídos por duas metades que se encaixam, estando uma metade localizada na membrana de uma das células e, a outra, na célula vizinha. São responsáveis por conferir maior adesão celular e resistência.
- **Junções comunicantes:** interconectam células epiteliais, mas estão presentes também em alguns tecidos musculares, permitindo a troca de moléculas por meio dos poros que constituem.

Membrana basal, lâmina basal e camada basal

Como o tecido epitelial não possui vasos sanguíneos, apesar de participar na constituição deles, ele é nutrido por meio da difusão dos nutrientes que chegam por meio de vasos sanguíneos presentes no tecido conjuntivo (este sim, rico em vasos sanguíneos). Uma fina camada composta de colágeno do tipo IV, a proteína laminina e proteoglicanos¹ é a responsável por selecionar e filtrar o que se poderá passar do tecido conjuntivo para as células epiteliais. Essa estrutura é a **lâmina basal**, que é totalmente sintetizada pelas células epiteliais, sendo somente visível em microscopia eletrônica. A lâmina basal desempenha importante função de nutrir as células epiteliais, além de sustentá-las e promover sua adesão ao tecido conjuntivo.

¹ Proteoglicanos são formados por polissacarídeos que formam ligações covalentes com proteínas. São moléculas grandes capazes de manter um grande espaço de hidratação na matriz extracelular.

Em algumas regiões, em continuação à lâmina basal, há uma camada de fibras reticulares (principalmente colágeno do tipo III) conjugadas a complexos de proteínas, produzidas pelo tecido conjuntivo. Esses elementos formam uma espessa camada, identificada na microscopia de luz pela reação do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS) ou impregnação pela prata. Nem todos os estudiosos da área concordam com esta distinção, mas é a lâmina basal somada à camada de fibras reticulares que se denomina **membrana basal** (MB).

2.1. Epitélios de revestimento

O tecido epitelial de revestimento é responsável por separar o tecido conjuntivo subjacente do meio externo ou das cavidades internas do corpo e funciona como um protetor e um controlador da passagem de substâncias do meio externo para o tecido conjuntivo (TC).

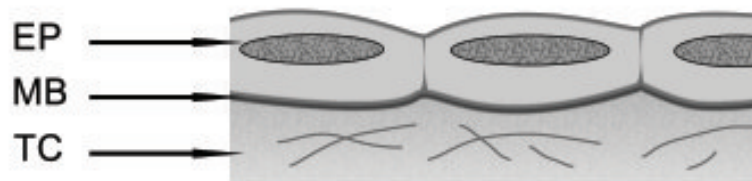
Classificação dos epitélios (EP)

Os epitélios de revestimento se classificam principalmente de acordo com a forma das células e o número de camadas nas quais essas células estão dispostas.

De acordo com a **forma** das células, os epitélios podem ser classificados em:

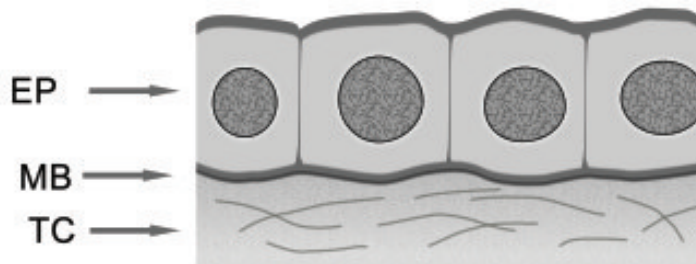
- **Epitélios pavimentosos** (Figura 1A): células mais largas do que altas, achatadas como ladrilhos e com o núcleo redondo ou alongado e central.

Figura 1A. Epitélio pavimentoso. EP – epitélio, MB – membrana basal, TC – tecido conjuntivo.



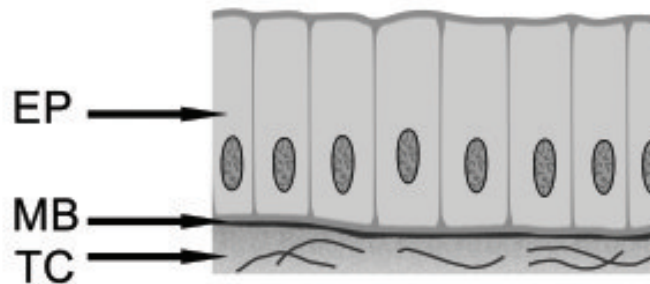
- **Epitélios cúbicos** (Figura 1B): células com altura e largura equivalentes, com forma de cubo e núcleo redondo central.

Figura 1B. Epitélio cúbico. EP – epitélio, MB – membrana basal, TC – tecido conjuntivo.



- **Epitélios cilíndricos** (Figura 1C): também chamados de prismáticos ou colunares, estes epitélios possuem células cuja altura é maior do que a sua largura. Suas células são alongadas, com um núcleo basal também alongado.

Figura 1C: Epitélio cilíndrico. EP – epitélio, MB – membrana basal, TC – tecido conjuntivo.

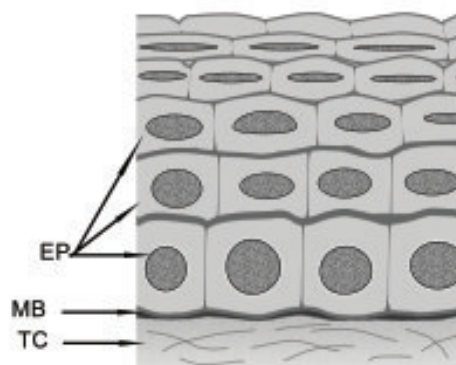


- **Epitélio especial ou de transição:** células epiteliais cuja forma varia constantemente, impedindo sua classificação nas categorias anteriores.

De acordo com o **número de camadas**, os epitélios podem ser:

- **Simplex:** formado por uma só camada celular, na qual todas as células estão em contato com a lâmina basal, como representado nas figuras 1A, 1B e 1C.
- **Estratificado** (Figura 2): formado por mais de uma camada celular, de forma que só as células da base (camada basal) têm contato com a lâmina basal.

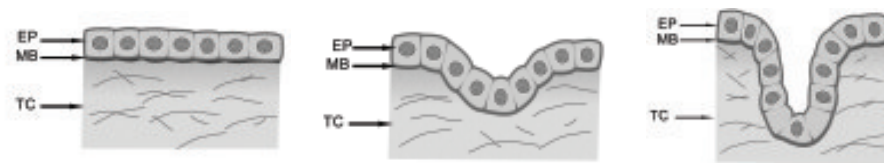
Figura 2: Tecido epitelial estratificado. EP – epitélio, MB – membrana basal, TC – tecido conjuntivo.



2.2. Epitélios glandulares

As células epiteliais glandulares são originadas durante o processo de proliferação das células do epitélio de revestimento no desenvolvimento embrionário. Essas células de revestimento invadem o tecido conjuntivo subjacente e se diferenciam, especializando-se na elaboração de produtos de secreção variados (Figura 3).

Figura 3: Formação das glândulas pela invaginação do tecido epitelial em direção ao tecido conjuntivo. EP – epitélio, MB – membrana basal, TC – tecido conjuntivo.



Os epitélios glandulares podem ser classificados de acordo com diversos aspectos:

- **Glândulas unicelulares e multicelulares**

Células que desempenham, isoladamente, função de secreção são chamadas de glândulas unicelulares. Dessas, o melhor exemplo é a célula caliciforme, presente tanto na via digestória quanto na via respiratória, atuando na produção de muco.

O termo “glândula” é, entretanto, usado de forma mais comum para se fazer referência às glândulas multicelulares, que são compostas pelo agrupamento de várias células secretoras. As glândulas sudoríparas, salivares e adrenais são alguns exemplos de glândulas multicelulares.

- **Glândulas exócrinas e endócrinas**

Durante o processo de diferenciação celular e formação das glândulas, quando ocorre a invasão do tecido conjuntivo pelo epitélio de revestimento embrionário,

algumas glândulas mantêm sua ligação às células de revestimento. Essa ligação adquire a forma de um tubo ou ducto celular pelo qual as secreções podem ser eliminadas para a superfície do tecido, do órgão, ou mesmo do organismo. Dessa forma, quando há um **ducto secretor**, a glândula é considerada **exócrina** (Figura 4).

Quando, durante este processo de diferenciação celular, as células glandulares não mantêm nenhuma ligação com o epitélio de revestimento, isolando-se no interior do tecido conjuntivo, a glândula é chamada **endócrina**. Nesse caso, devido à ausência de um ducto secretor, estas glândulas endócrinas liberam suas secreções, **os hormônios**, diretamente na corrente sanguínea (Figura 5).

Figura 4. Glândula Exócrina. EP - epitélio, MB - membrana basal, TC - tecido conjuntivo, DE - ducto excretor, PS - porção secretora

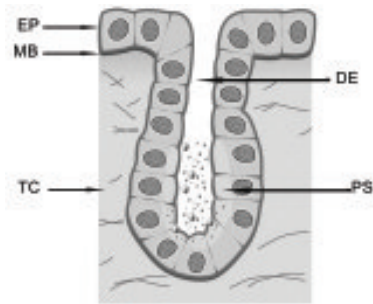
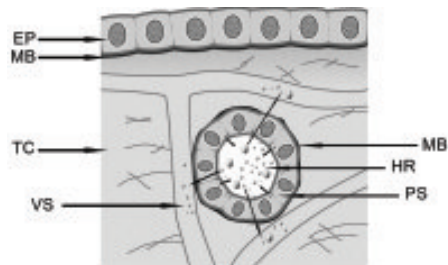


Figura 5. Glândula Endócrina. EP - epitélio, MB - membrana basal, TC - tecido conjuntivo, VS - vaso sanguíneo, PS - porção secretora, HR - hormônio



No corpo humano, o fígado² e o pâncreas³ realizam funções exócrinas e endócrinas, e são chamados **glândulas mistas**.

² A função exócrina do fígado é representada pela produção da bile, que é liberada na luz do tubo digestório (mais especificamente no duodeno). O fígado também é classificado como endócrino por produzir proteínas (como a albumina, protrombina e fibrinogênio) que são liberadas diretamente na corrente sanguínea.

³ A secreção exócrina do pâncreas é o suco pancreático, rico em enzimas digestivas e liberado no duodeno. A porção endócrina do pâncreas produz e libera os hormônios **insulina** e **glucagon**, ambos fundamentais no metabolismo da glicose no organismo.

• **Glândulas merócrinas, holócrinas e apócrinas** (Figura 6)

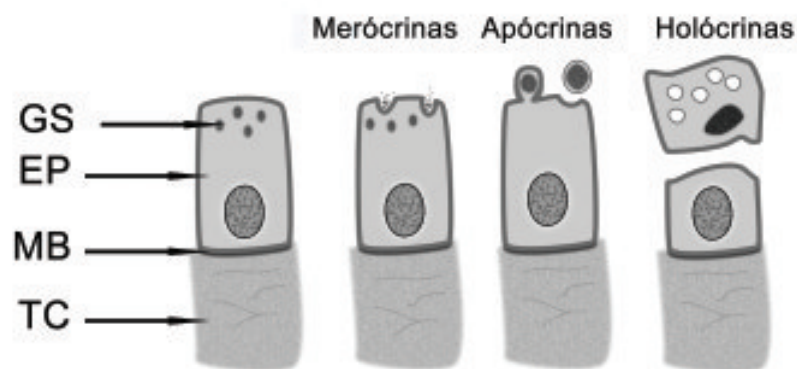
As glândulas são classificadas também pelo modo como as suas células secretam.

Nas glândulas **merócrinas**, as células glandulares eliminam somente a sua secreção, por meio de exocitose, mantendo intacto o seu citoplasma (pâncreas, por exemplo).

Nas glândulas **holócrinas**, as células glandulares acumulam os seus produtos de secreção no citoplasma, morrem em seguida, desfazendo-se e passando a constituir, elas próprias, a sua secreção (glândulas sebáceas, por exemplo).

As glândulas **apócrinas** representam um meio-termo entre estas e outras formas de secretar. Nelas, as células glandulares, ao eliminarem sua secreção, perdem certa quantidade do seu citoplasma apical (glândulas mamárias, por exemplo).

Figura 6. Diferentes modos de secretar. Glândulas merócrinas, apócrinas e holócrinas. GS - grândulos de secreção, EP - epitélio, MB - membrana basal, TC - tecido conjuntivo.



Um grupo de células que desempenha uma atividade de apoio à secreção glandular exócrina são as **células mioepiteliais**. Trata-se de células epiteliais cujo citoplasma contém filamentos de actina e de miosina, o que lhes confere a

capacidade de se contrair. Essas células possuem uma forma estrelada, e se localizam entre a lâmina basal e a célula secretora, ligando-se umas às outras, envolvendo assim a porção secretora da glândula. Elas atuam contraindo-se e ajudando a glândula exócrina a expelir seu produto pelo ducto excretor.

3. Tecidos conjuntivos

Os diversos tipos de tecido conjuntivo existentes no corpo têm a função de unir outros tecidos, conferindo-lhes sustentação e dando conjunto ao corpo, daí sua denominação.

A denominação “tecido conjuntivo”, entretanto, é um título geral que designa um grupo de diversos tecidos com várias funções. O tecido conjuntivo compreende um tecido tradicionalmente conhecido como “tecido conjuntivo propriamente dito” e um amplo grupo de tecidos chamados “tecidos conjuntivos especiais”, com funções altamente especializadas. Esse grupo de tecidos conjuntivos especiais compreende os tecidos adiposo, cartilaginoso, ósseo, sanguíneo e hematopoiético, que serão tratados mais adiante.

De uma forma geral, todos os tecidos conjuntivos são originários de células alongadas no mesênquima embrionário⁴, e são formados essencialmente por células mesenquimais e uma matriz extracelular abundante. Serão variações tanto nas características celulares quanto nas peculiaridades da matriz extracelular que determinarão, nos diferentes tecidos conjuntivos, sua especialização no desempenho de determinadas atividades e funções.

3.1. Tecido conjuntivo propriamente dito

O tecido conjuntivo propriamente dito é o que mantém as características mais elementares nos seus componentes. É ricamente vascularizado e se

⁴ Células mesenquimais ou mesenquimatosas são originadas do mesoderma, folheto germinativo intermediário dos tecidos embrionários.

encontra sempre abaixo do tecido epitelial, dando-lhe suporte e garantindo sua nutrição.

Suas células terão funções na manutenção da homeostase⁵ tecidual, mas não terão características especializadas no sentido de conferir especificidade funcional ao tecido. Da mesma forma, a matriz extracelular se apresentará em sua configuração mais básica.

Células do tecido conjuntivo propriamente dito

Grande parte das células encontradas nos tecidos conjuntivos é produzida nos próprios tecidos, mas algumas outras células, como os leucócitos, por exemplo, que transitam na corrente sanguínea, podem habitar temporariamente o interior desses tecidos. De um modo geral, as células do tecido conjuntivo propriamente dito são:

- **Fibroblastos/fibrócitos**

São as mais importantes células deste tecido conjuntivo, estando responsáveis pela produção e manutenção da matriz extracelular.

Os **fibroblastos** (Figura 7) são células jovens, com forma estrelada devido a seus vários prolongamentos celulares. Apresentam também grande basofilia⁶, devido ao seu núcleo grande e ao retículo endoplasmático granular e complexos de Golgi desenvolvidos, o que indica a sua produção ativa de componentes da matriz extracelular.

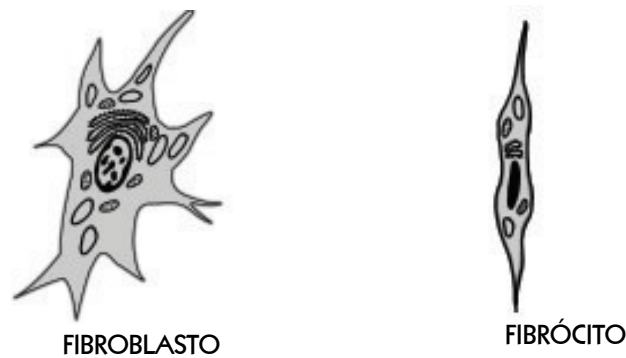
Funcionando de certa maneira como uma regra entre os tecidos conjuntivos, as células essenciais dos tecidos, jovens e encarregadas de produzir a matriz extracelular, têm em sua nomenclatura o termo “blasto”, que indica

⁵ Homeostase é a propriedade de um sistema orgânico regular o seu ambiente interno de modo a manter uma condição estável, mediante múltiplos mecanismos de ajuste.

⁶ A basofilia é caracterizada pela afinidade de uma célula ou de um tecido pelos corantes básicos por possuir caráter ácido. Indica a presença de organelas associadas à produção ativa de substâncias proteicas, como retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi e polirribossomos no citoplasma.

que esta célula está em crescimento ativo e sintetizando matriz extracelular. Essas células, porém, não se mantêm continuamente ativas, e quando entram em estado de repouso retraem-se, tornando-se menores e mais alongadas, sem os prolongamentos celulares, com organelas menos desenvolvidas. Essas células passam, então, a receber o sufixo “cito”. Nesse caso, os fibroblastos, ao entrarem em repouso, adquirem as características descritas acima, e passam a ser chamados **fibrócitos** (Figura 7), embora esse termo não deva ser mais empregado, pois sugeriria um tipo celular diferenciado, o que não é a realidade, mas representa apenas um momento funcional do fibroblasto. Esse processo pode ser revertido se o tecido for lesionado ou se, por outro motivo, houver a necessidade de novos fibroblastos para produzir novamente a matriz extracelular. Nestes casos, os fibrócitos são estimulados e passam, de novo, a produzir ativamente, readquirindo suas características peculiares de quando estavam ativos.

Figura 7. Células do tecido conjuntivo: fibroblasto e fibrócito



- **Macrófagos**

São células grandes e ameboides, com núcleo ovoide ou em forma de rim, que se deslocam continuamente entre as fibras à procura de bactérias e restos de células. Sua função principal é proteger os tecidos, fagocitando agentes infecciosos que penetram no corpo, e identificando

substâncias potencialmente nocivas ao organismo, apresentando antígenos e alertando o sistema imunológico.

Os macrófagos fazem parte do **sistema fagocitário mononuclear (SFM)**, derivando indiretamente de células da medula óssea.

- **Mastócitos**

Células globosas, grandes, com o núcleo pequeno e central e o citoplasma repleto de grânulos basófilos. Seu núcleo, às vezes, fica encoberto pela grande quantidade de grânulos e não é visto.

- **Plasmócitos**

Essas células estão presentes em pequena quantidade nos tecidos conjuntivos, sendo responsáveis pela produção de imunoglobulinas (anticorpos) importantes nos processos imunológicos. São derivadas da ativação, proliferação e diferenciação de linfócitos B originários da medula óssea.

Em caso de aumento da permeabilidade vascular, causada por processos inflamatórios, outros leucócitos podem ser também encontrados no tecido conjuntivo propriamente dito.

Matriz Extracelular

A matriz extracelular é um meio no qual as células do tecido conjuntivo estão dispostas, e lhes confere nutrição e substrato para sua organização e atuação.

É formada por um conjunto de fibras imersas em uma substância fundamental amorfa.

- **Elementos fibrosos do tecido conjuntivo**

As principais fibras que compõem o tecido conjuntivo são compostas de proteínas produzidas pelos fibroblastos (no caso do tecido conjuntivo

propriamente dito). Sua distribuição varia conforme o tipo de tecido conjuntivo, sempre de acordo com as características morfofuncionais destes tecidos.

Os elementos fibrosos observados por meio de técnicas histoquímicas nos preparados histológicos são:

Fibras colágenas

O colágeno é um tipo de proteína que possui mais de 20 variações conhecidas, apresenta um nítido padrão de estrias transversais e representa a proteína mais abundante do corpo, constituindo 30% de seu peso seco. As fibras colágenas são o principal componente da matriz extracelular e podem ter características peculiares que as diferenciam nos vários tipos conhecidos. As fibras colágenas têm como componente básico a proteína colágeno, e, para os estudos histológicos mais básicos, os tipos mais importantes de colágeno são:

- Colágeno I: é o tipo de colágeno mais abundante em todo o organismo, sendo capaz de formar fibras espessas, as quais conferem resistência aos tecidos.
- Colágeno II: é o tipo de colágeno encontrado na matriz extracelular das cartilagens, formando fibrilas e atuando como molas biomecânicas.
- Colágeno III: forma delicadas fibrilas, sendo o principal constituinte das fibras reticulares.
- Colágeno IV: são fibrilas extremamente delicadas presentes na lâmina basal.

Fibras reticulares

Apesar da designação fibras, as fibras reticulares são formadas principalmente por colágeno do tipo III e, na realidade, são fibrilas delicadas. Por essa razão, muitos autores preferem incluí-las no sistema de fibras colágenas, isto é,

elementos fibrilares que têm o colágeno como proteína básica, independente do tipo do colágeno.

As fibras reticulares são delicadas e formam uma rede de trançado firme, dando sustentação aos órgãos hematopoiéticos⁷ e às células musculares, estando presente na parede de órgãos de forma variável, como no intestino, no útero e nas artérias. São chamadas fibras argirófilas por sua grande afinidade aos métodos histoquímicos que têm como base a prata, como a reticulina de Gomori.

Fibras elásticas

São fibras delgadas que se ramificam e formam uma malha irregular. As fibras elásticas têm uma cor amarelada a fresco, que a sua presença abundante confere a alguns tecidos. As fibras elásticas são, na verdade, formadas por fibrilas maiores da glicoproteína **fibrilina**, na forma de um arcabouço, que terá sua porção central preenchida pela proteína **elastina**.

Estas fibras vão conferir elasticidade aos tecidos, sendo evidenciadas por técnicas histoquímicas especiais, particularmente nos tecidos de sustentação do pulmão, na pele e nos vasos sanguíneos.

• Substância fundamental

A substância fundamental corresponde a uma matriz gelatinosa hidratada, na qual as fibras e as células estão imersas. É composta em parte por um líquido chamado fluido tissular ou plasma intersticial, que é derivado do plasma sanguíneo e apresenta a mesma composição; porém, a água presente na substância fundamental não é água líquida, mas está sob a forma de água de

⁷Órgãos hematopoiéticos são aqueles capazes de produzir os elementos figurados do sangue, como a medula óssea hematogênica, o fígado e o baço.

solvatação. A esse meio aquoso somam-se glicosaminoglicanos⁸, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas que atuam como componentes estruturais da matriz extracelular, relacionando-se com as células e dando coesão a este conjunto.

Variedades do tecido conjuntivo propriamente dito

O tecido conjuntivo propriamente dito pode se apresentar como frouxo e denso.

O tecido conjuntivo propriamente dito **frouxo**, ou simplesmente tecido conjuntivo frouxo, é o tecido conjuntivo com ampla distribuição no corpo, estando presente em praticamente todos os órgãos. É chamado de frouxo, pois apresenta uma consistência delicada, com células e fibras esparsas, “casualmente” organizadas e largamente espaçadas, imersas em abundante substância fundamental.

O tecido conjuntivo **denso**, em contrapartida, se caracteriza pela abundância de elementos fibrosos, preferencialmente fibras de colágeno, o que lhe confere grande resistência, não deixando grandes espaços visíveis de substância fundamental. De acordo com a disposição de suas fibras, pode ser subclassificado ainda como tecido conjuntivo denso **modelado** ou **não modelado**.

- Tecido conjuntivo **denso modelado**: apresenta predomínio de fibras colágenas orientadas em um mesmo sentido, paralelas e alinhadas aos fibroblastos e às células que as produzem. Essa orientação em um determinado sentido confere ao tecido maior capacidade de resistência à tração. Esse tecido denso e modelado é o principal constituinte dos **ligamentos, tendões e aponeuroses**.

⁸ Glicosaminoglicanos são polissacarídeos grandes que contribuem para a integridade tecidual e auxiliam na difusão de substâncias pela matriz extracelular (Stevens e Lowe, 2001).

- Tecido conjuntivo **denso não modelado**: neste tecido, há grande quantidade de fibras colágenas, que estão dispostas de maneira “irregular”, orientadas em várias e distintas direções.

3.2. Tecido adiposo

○ tecido adiposo é um tecido conjuntivo especial caracterizado pela predominância de células especializadas, os **adipócitos**, associados a uma grande irrigação sanguínea.

○ tecido adiposo corresponde, em pessoas de peso normal, a 20-25% do peso corporal na mulher e 15-20% no homem.

Esse tecido é considerado a maior reserva de energia do corpo, apesar de não ser a única. Além da dimensão do depósito energético que o tecido adiposo representa, por meio dos triglicérides, esse lipídeo é ainda mais eficiente na produção de energia do que o glicogênio. Um grama de triglicérides fornece 9,3 Kcal, enquanto um grama de glicogênio fornece apenas 4,1 Kcal de energia.

○ tecido adiposo não tem só a função de armazenar energia, mas ele atua também:

- na modelagem da pele, tendo uma distribuição diferenciada em homens e mulheres, conferindo-lhes as formas que lhes são peculiares;
- na absorção de choques, amortecendo impactos externos sobre o corpo;
- no isolamento térmico, impedindo a perda de calor do corpo;
- preenchendo espaços e sustentando órgãos.

Os tecidos adiposos podem ser de dois tipos:

- **Tecido adiposo unilocular**

Nos seres humanos adultos, praticamente todo o tecido adiposo é o unilocular (Figura 8). Os adipócitos uniloculares são células arredondadas e volumosas, com um núcleo achatado localizado na periferia da célula. Seu citoplasma é escasso e aparece de forma delgada envolvendo a gota lipídica. Esse tipo de tecido adiposo possui uma cor que varia do branco ao amarelo a fresco, de acordo com a dieta do indivíduo e a ingestão de alimentos com caroteno, um corante natural que escurece a cor da gordura.

Ao nascimento, o tecido adiposo do bebê forma uma camada uniformemente distribuída sob a pele, chamada **panículo adiposo**. Com o envelhecimento do indivíduo, aspectos genéticos e a liberação de hormônios sexuais e hormônios do córtex da glândula adrenal, essa gordura é redistribuída por todo o corpo, remodelando o corpo do jovem.

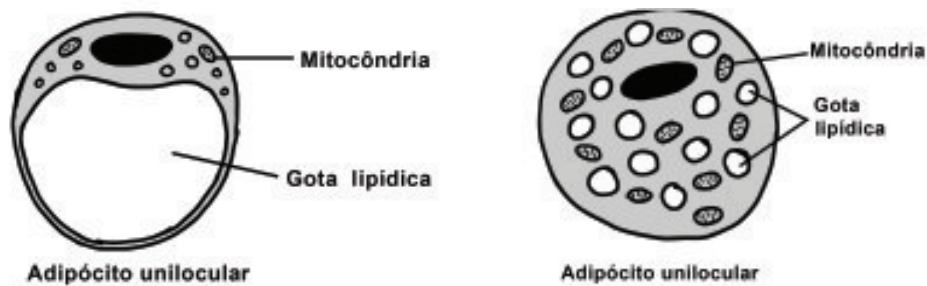
- **Tecido adiposo multilocular**

O tecido adiposo multilocular (Figura 8) recebe esse nome porque seus adipócitos apresentam várias pequenas gotas lipídicas distribuídas em seu citoplasma, em contraposição à grande e única gota do tecido unilocular. É também chamado de tecido adiposo **pardo**, devido à vascularização abundante e à presença de numerosas mitocôndrias (que têm cor avermelhada) em suas células.

Esse tecido é também chamado, em animais que hibernam, de **glândula hibernante**, por ser abundante e possuir células dispostas de forma **epitelióide**.

A principal função deste tecido é gerar energia na forma de **calor**, auxiliando na termorregulação do organismo.

Figura 8. Tipos celulares do tecido adiposo.



3.3. Tecido cartilaginoso

A cartilagem é um tipo de tecido conjuntivo formado de dois tipos celulares, condrócitos e condroblastos, e de uma matriz extracelular abundante, altamente especializada e vascular.

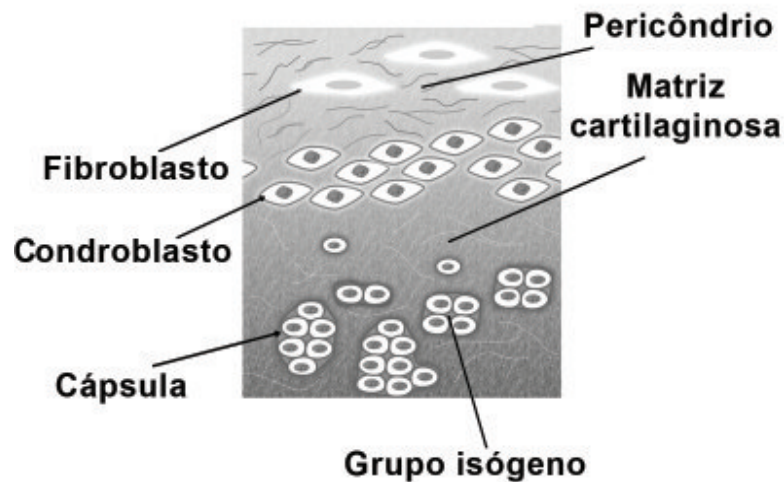
Tem as funções de conferir suporte a tecidos moles (anéis da traqueia, por exemplo), revestir as superfícies articulares dos ossos, e propiciar a formação e o crescimento dos ossos longos.

Formação da cartilagem

Durante sua formação embrionária, as células do mesênquima retraem seus prolongamentos e adquirem uma forma arredondada, multiplicando-se rapidamente e formando um aglomerado celular. Essas células jovens são chamadas condroblastos (Figura 9), e iniciam a síntese da matriz extracelular, distanciando-se umas das outras.

Quando a matriz começa a adquirir uma consistência mais rígida, os condroblastos ficam presos em espaços ligeiramente maiores do que eles, denominados cápsulas ou condroplastos. Os condroblastos multiplicam-se por mitose, dando origem a grupos de até 8 condrócitos chamados **grupos de isógenos** (Figura 9).

Figura 9. Tecido cartilaginoso



Pericôndrio

Como o tecido cartilaginoso não possui vasos sanguíneos próprios, suas células são nutridas por meio da difusão de substâncias a partir de vasos do tecido conjuntivo adjacente. Desta forma, quase todas as cartilagens são envolvidas por uma camada de tecido conjuntivo chamada **pericôndrio** (Figura 9).

O pericôndrio é responsável pela nutrição, oxigenação e eliminação de resíduos metabólicos da cartilagem, mas sua importância vai além disso. Suas células são semelhantes aos fibroblastos, mas as localizadas mais próximas da cartilagem podem se multiplicar, dando origem a novos condroblastos.

Nas cartilagens presentes em articulações sinoviais, a nutrição deste tecido é feita por difusão pelo **líquido sinovial**.

Tipos de cartilagem

- **Cartilagem hialina**

É a cartilagem mais comum no corpo humano. Possui uma cor branco-azulada e translúcida a fresco e é responsável pela formação do esqueleto

temporário no desenvolvimento fetal, até que esse esqueleto seja substituído por tecido ósseo.

É encontrada principalmente sustentando as fossas nasais, a traqueia e os brônquios, na extremidade ventral das costelas e recobre as superfícies articulares dos ossos longos. Localiza-se ainda entre a **epífise** e a **diáfise**⁹ dos ossos longos, na forma de um disco cartilaginoso chamado **disco epifisário** (Figura 10). É esse disco epifisário o responsável pelo crescimento dos ossos longos em comprimento.

- **Cartilagem elástica**

Essa cartilagem é encontrada no pavilhão auditivo e na epiglote. Possui uma matriz extracelular semelhante à da cartilagem hialina, mas possui ainda uma rede de fibras elásticas que confere a esse tipo de cartilagem, quando examinada a fresco, uma cor amarelada.

- **Cartilagem fibrosa**

Também chamada de **fibrocartilagem**, é a cartilagem mais resistente das três, apresentando características intermediárias entre o tecido conjuntivo denso e a cartilagem hialina. Durante sua diferenciação, as fibras de colágeno orientam as células, de forma que esta cartilagem vai apresentar os condrócitos dispostos em fileiras, de acordo com a disposição das fibras de colágeno.

Na cartilagem fibrosa não existe pericôndrio morfologicamente distinto, sendo esse tecido nutrido pelos vasos do tecido conjuntivo denso ao qual está intimamente ligado.

Por ser tão resistente, é encontrada em locais sujeitos a grande pressão, como nos discos intervertebrais e na sínfise pubiana.

⁹ As extremidades dos ossos longos são chamadas de epífises e o alongamento que as une é chamado de diáfise. Essas denominações serão mais bem exploradas no tópico sobre tecido ósseo.

○ crescimento das cartilagens acontece de duas formas:

- **Crescimento intersticial:** só acontece nos primeiros momentos da vida da cartilagem, referindo-se à divisão mitótica dos condroblastos, dando origem aos grupos isogênicos e à expansão da cartilagem daí resultante.
- **Crescimento aposicional:** esse tipo de crescimento se dá a partir das células condrogênicas do pericôndrio, que se diferenciam em condroblastos, se multiplicam e produzem uma nova matriz cartilaginosa, promovendo o crescimento da cartilagem.

3.4. Tecido ósseo

Os ossos são os principais componentes do esqueleto, tendo diversas funções:

- proteção para órgãos como coração, pulmões e o sistema nervoso central;
- sustentação e conformação do corpo;
- local de armazenamento de íons de cálcio e fósforo¹⁰ e a restituição desses elementos à corrente sanguínea de acordo com as necessidades do organismo, ou seja, participam da regulação da calcemia, cuja estabilidade é indispensável ao bom equilíbrio de várias funções orgânicas (ação de enzimas, permeabilidade de membranas, coagulação do sangue, transmissão do impulso nervoso, contração muscular etc.);
- constituem um sistema de alavancas que, juntamente com os músculos, permite a locomoção de partes do corpo e a ampliação da força muscular;
- alojam e protegem a medula óssea.

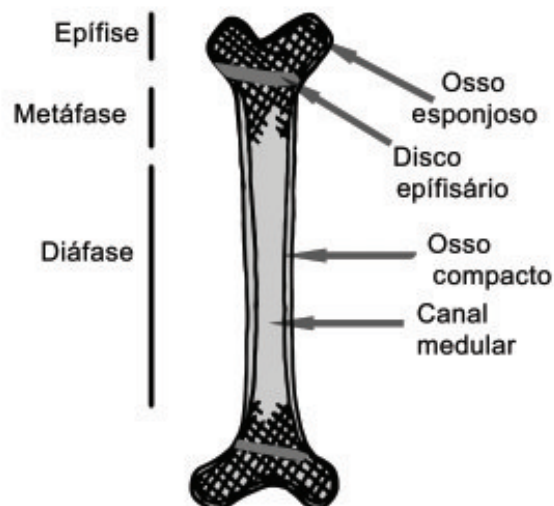
¹⁰ Durante a gravidez, a calcificação fetal se faz em grande parte pela reabsorção desses elementos armazenados no organismo materno, por isso, é recomendável a ingestão, pela mãe, de alimentos ricos em cálcio durante a gestação.

De uma forma geral, nos indivíduos adultos, os ossos são constituídos de uma parte externa de osso compacto, sem cavidades aparentes, e de uma parte interna, trabecular, com múltiplas cavidades intercomunicantes, constituindo o osso esponjoso.

As cavidades intertrabeculares do osso esponjoso e o canal medular da diáfise dos ossos longos correspondem a um espaço designado medula óssea, a qual possui duas variedades de tecido relacionadas com a produção dos elementos figurados do sangue: medula óssea **vermelha** ou hematogênica (encontrada nos ossos longos, nos ossos chatos, no esterno e nas costelas), na qual desenvolvem-se os elementos figurados do sangue, e **medula óssea amarela**, preenchida por tecido adiposo e encontrada na cavidade medular dos ossos longos.

Tanto o osso compacto quanto o osso esponjoso possuem os mesmos componentes histológicos, mudando apenas a sua disposição estrutural, que lhes confere tão distinta aparência.

Figura 10. Esquema de um osso longo, evidenciando suas porções: epífise, metáfise e diáfise.



Matriz óssea

A matriz extracelular do tecido ósseo pode ser dividida em dois tipos de constituintes: uma matriz orgânica e uma matriz inorgânica.

- **Matriz orgânica:** formada principalmente por colágeno I, cujas fibras estão imersas em um meio gelatinoso de mucopolissacarídeos, água e eletrólitos, além de glicoproteínas específicas com grande afinidade pelo cálcio (osteocalcina, por exemplo).
- **Matriz inorgânica:** representa cerca de 50% da matriz óssea, e é composta de íons, principalmente de cálcio e fosfato, além de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequenas quantidades.

Assim que é produzida, a matriz óssea ainda não está classificada e possui uma consistência delicada, sendo chamada **osteóide**. Íons de cálcio e fosfatos provenientes da circulação sanguínea se ligam, formando cristais de **hidroxiapatita** ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Esses cristais de hidroxiapatita, por sua vez, ligam-se às fibras de colágeno I do osteóide, promovendo o endurecimento característico do osso.

Células do tecido ósseo

• Osteoblastos

São as células do tecido ósseo encarregadas de produzir a osteóide, a parte orgânica da matriz óssea. São células grandes e cuboides com várias expansões citoplasmáticas que se ligam às expansões citoplasmáticas dos osteoblastos vizinhos. Mantêm essas características descritas até o enrijecimento da matriz óssea decorrente da ligação da hidroxiapatita à osteóide.

• Osteócitos

Quando ocorre o enrijecimento da matriz óssea, os osteoblastos ficam aprisionados em espaços chamados lacunas (ou osteoplastos), que circunscre-

vem a estrutura principal das células. A partir desse momento, suas características se modificam e eles passam a ser chamados osteócitos.

A interrupção da produção de matriz faz com que toda a célula se retraia, tornando-se achatada e com pouca basofilia. Os prolongamentos celulares percorrem canais, os **canalículos ósseos** que vão se ligar às lacunas e canalículos vizinhos, constituindo uma rede que vai permitir a intercomunicação entre os prolongamentos dos osteócitos, permitindo a sua nutrição a partir de vasos sanguíneos que atravessam a estrutura óssea.

Embora não produzam mais matriz, a presença dos osteócitos é essencial para a homeostase do tecido e a manutenção da matriz óssea. A morte de uma dessas células é seguida pela reabsorção da matriz que a envolve.

• Osteoclastos

Localizadas na superfície do tecido ósseo que vai ser “reabsorvido”, essas células são caracterizadas por sua grande dimensão, sua multiplicidade de núcleos, sua mobilidade e por possuir várias projeções celulares na face voltada para o tecido ósseo.

A superfície dos osteoclastos, que está em contato com a região onde ocorrerá a reabsorção da matriz óssea, é rica em microprojeções celulares irregulares, chamadas também **borda em escova**. O citoplasma, principalmente nessas áreas, contém abundantes vesículas e vacúolos, cujo material vai realizar a hidrólise enzimática da osteoide, liberando o cálcio para ser reutilizado pelo organismo.

Todo tipo de osso vai possuir dois elementos essenciais que revestem suas superfícies internas e externas. Essas estruturas são, respectivamente, o **endóstio** e o **perióstio**, e são responsáveis, principalmente, pela nutrição, crescimento e recuperação de danos nos ossos.

- **Endósteo:** é representado por uma camada de células osteogênicas achatadas que revestem a cavidade do osso esponjoso, o canal medular e os canais de Havers e de Volkmann.
- **Periósteo:** é a camada de tecido conjuntivo denso, muito fibroso na sua porção mais externa, estando ancorado ao osso por suas fibras colágenas, que a ele se ligam fortemente (fibras de Sharpey). Sua porção mais interna, mais próxima do osso, é mais celular, com células osteoprogenitoras, sendo bastante vascularizada.

Essas células osteogênicas (ou osteoprogenitoras) apresentam características semelhantes aos fibroblastos. Porém, quando ativadas, dividem-se por mitose e diferenciam-se em osteoblastos, atuando na reparação de fraturas e possibilitando o crescimento dos ossos.

Tipos de tecido ósseo

Histologicamente, o tecido ósseo pode estar estruturado de duas formas distintas: o **tecido ósseo primário** e o **tecido ósseo secundário**. As células e componentes da matriz são os mesmos nos dois tipos e essa distinção se refere à disposição das fibras colágenas na matriz óssea.

• **Tecido ósseo primário**

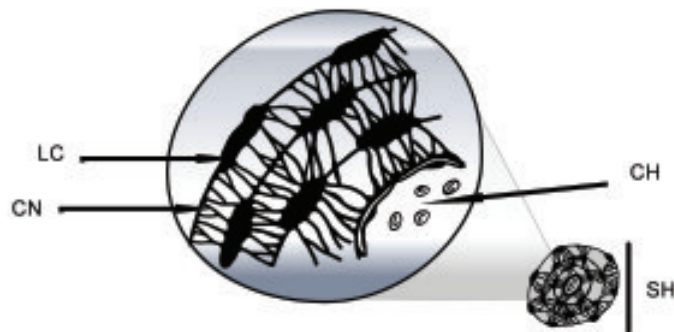
O tecido ósseo primário (ou imaturo) se estrutura durante a vida embrionária ao ocorrer a primeira ossificação, ou durante a reparação de uma fratura.

Nesse tipo de osso, as fibras colágenas estão dispostas aleatoriamente, sem orientação definida, havendo uma menor quantidade de minerais, o que confere a esse tecido ósseo resistência menor que o tecido ósseo secundário.

• Tecido ósseo secundário

O tecido ósseo secundário (ou lamelar) surge em substituição ao tecido ósseo primário. No tecido ósseo secundário, as fibras colagenosas se organizam de modo a formar lamelas concêntricas ao redor de canais onde transitam vasos sanguíneos. Esse conjunto é chamado **sistema de Havers**, e confere ao osso secundário maior resistência do que o osso primário. O canal no centro das lamelas ósseas que contém um vaso sanguíneo é chamado **canal de Havers**. Acompanhando a arquitetura ramificada dos vasos sanguíneos, há canais transversais chamados **canais de Volkmann**. Os canais de Volkmann ligam os canais de Havers entre si e os canais de Havers com a cavidade medular e com a superfície externa do osso (Figura 11).

Figura 11. Sistema de Havers ou ósteon: LC – lacunas, CN - canalículos, CH – canal de Havers, SH – sistema de Havers.



Tipos de ossificação

No embrião, a formação do osso ocorre por meio de dois mecanismos: a ossificação intramembranosa e a ossificação endocondral.

Histologicamente, não há diferenças entre os tecidos ósseos formados por esses dois tipos de ossificação, e ambos produzirão tecido ósseo primário, o qual será reabsorvido e substituído por tecido ósseo secundário.

• **Ossificação intramembranosa ou endoconjuntiva**

A designação **intramembranosa** é conferida a esse processo por ele ocorrer em uma área de densificação de elementos fibrosos do tecido conjuntivo embrionário, erroneamente denominado membrana conjuntiva. Atualmente, há autores que utilizam a designação endoconjuntiva para ressaltar que esse processo de ossificação ocorre no tecido conjuntivo.

As células mesenquimais, de determinada área do mesênquima programado a se diferenciar em tecido ósseo, começam a se diferenciar em osteoblastos, que por sua vez iniciam a produção de osteoide. O local onde se inicia a ossificação é chamado **centro de ossificação primária**. Nesse novo tecido, os osteoblastos estabelecem contato e, com a deposição de cálcio no osteoide, se transformam em osteócitos. Assim estruturam-se os canalículos ósseos, as lacunas e todas as outras estruturas características do tecido ósseo.

As regiões do mesênquima que não se diferenciam em células ósseas originam o perióstio na superfície externa e o endóstio na superfície interna do osso em formação.

Nos processos de reabsorção e reestruturação óssea que se seguem, se originam as camadas de osso compacto que constituem a superfície periférica desses ossos.

• **Ossificação endocondral**

A ossificação endocondral é o processo de formação dos ossos longos e curtos, a partir de um molde de tecido cartilaginoso.

Pode-se dizer que este processo segue os seguintes passos:

- 1- Ao redor da peça cartilaginosa, o pericôndrio começa a se ossificar, formando, assim, um cilindro ósseo ao redor da peça de cartilagem.
- 2- Os condrócitos, situados no interior deste modelo cartilaginoso, se **hipertrofiam**, dilatando as suas cápsulas. Eles também, quando

hipertrofiados, produzem **fatores angiogênicos** (fator de crescimento endotelial vascular – VEGF) que induzirão à formação de vasos sanguíneos a partir do pericôndrio.

3- Com o surgimento desses vasos sanguíneos, as células condrogênicas se transformam em osteogênicas, dando origem a **osteoblastos**. Estes osteoblastos iniciam a produção de osteoide, que enrijece formando centros de ossificação primária, colaborando na formação de um colar subperióstico ao redor da “diáfise” cartilaginosa.

4- Esse colar ósseo impede a difusão dos nutrientes para o interior da cartilagem, levando à morte dos condrócitos hipertrofiados, formando grandes **concavidades** no interior do molde cartilaginoso.

5- Osteoclastos, ao reabsorver o tecido ósseo, formam orifícios no colar ósseo, permitindo que um **broto vascular perióstico** (composto de células osteogênicas, células hematogênicas e vasos sanguíneos) penetre nas cavidades do molde cartilaginoso.

6- As células osteogênicas que penetraram no molde diferenciam-se em osteoblastos, iniciando a produção de tecido ósseo por sobre os restos de cartilagem ainda existentes, formando um complexo **cartilagem calcificada/osso calcificado**.

7- Conforme o osso subperióstico se espessa, **osteoclastos** começam a reabsorver o material do complexo cartilagem calcificada/osso calcificado, aumentando a cavidade interna da diáfise, que será a futura cavidade medular.

8- Nas epífises, ocorre um processo semelhante à ossificação da diáfise, com a diferença de não se formar um colar ósseo. As células osteogênicas invadem as cavidades ocasionadas pela destruição da cartilagem, produzindo o complexo cartilagem calcificada/osso calcificado. Esse complexo será reabsorvido pelos osteoclastos, restando apenas a cartilagem hialina do disco epifisário e a cartilagem articular.

3.5. Tecido sanguíneo

O sangue é um tecido conjuntivo especializado que circula em um sistema fechado de canais, representado pelo coração, artérias, capilares e veias. Além de transportar nutrientes a todas as células e retirar os produtos tóxicos resultantes do metabolismo, o sangue conduz, de um órgão para o outro, hormônios e outras substâncias reguladoras da atividade celular. O sangue atua também nos processos de defesa, carregando anticorpos e células que destroem agentes invasores e ajudam na cicatrização e recuperação de tecidos lesionados. O sangue ainda distribui calor, mantendo constante a temperatura do corpo, e auxilia na manutenção do equilíbrio ácido/básico e osmótico dos fluidos corporais.

No homem, o sangue consiste de um fluido viscoso, de cor vermelha e tonalidade variável. Possui um pH levemente alcalino (7,4) e é responsável por aproximadamente 7% do peso corporal (+/- 5,5 L num indivíduo adulto).

Os componentes do sangue podem ser separados por centrifugação, desde que seja coletado com uso de anticoagulantes. Dessa forma, podem-se obter:

- **glóbulos vermelhos** (hemácias): representam de 42% a 47% do volume total de sangue (**hematócrito**);
- **glóbulos brancos** (leucócitos) e **plaquetas**: vão formar a “**papa leucocitária**”, designação conferida à camada delgada e translúcida, que representa apenas 1% do volume total de sangue;
- **plasma sanguíneo**: componente líquido do sangue, no qual os outros componentes estão diluídos e que representa aproximadamente 55% do volume do sangue.

Plasma sanguíneo

O plasma sanguíneo é a parte líquida do sangue, que transporta substâncias solúveis em água. É constituído por água, proteínas, glicose, sais minerais e outros nutrientes, materiais de excreção, hormônios e anticorpos.

Dentre as proteínas presentes no plasma, destacam-se:

- as **albuminas**: encarregadas de regular a pressão osmótica do sangue;
- as **globulinas**: representam os anticorpos que atuam na defesa do organismo;
- o **fibrinogênio**: atua nos processos de coagulação sanguínea.

Na ausência de anticoagulantes, o fibrinogênio, juntamente com os outros elementos celulares do sangue, forma um coágulo. Esse processo de coagulação permite a obtenção do **soro sanguíneo**, que é, essencialmente, o plasma sanguíneo sem o fibrinogênio.

Glóbulos vermelhos

Nos vertebrados não humanos, os glóbulos vermelhos são também chamados de eritrócitos (do grego *erythros* = vermelho). Porém, em humanos, esses elementos, por não possuírem núcleo, são chamados hemácias. As hemácias são estruturas altamente diferenciadas, encarregadas de manter em estado funcional o pigmento respiratório, a **hemoglobina**.

As hemácias possuem a forma de um disco bicôncavo de 6,5 a 8,5 μm de diâmetro e 2 μm de espessura na região mais larga, sendo flexíveis, sem organelas e anucleadas¹¹.

A concentração normal de hemácias é de +/- 4,5 e 5,5 milhões por mm^3 de sangue, na mulher e no homem, respectivamente.

¹¹ As hemácias são células anucleadas somente em mamíferos. Aves, peixes e répteis, por exemplo, possuem hemácias nucleadas.

Glóbulos brancos

Essas células, também chamadas de leucócitos, são incolores e esféricas quando no sangue. São originadas na medula óssea e só permanecem na circulação sanguínea enquanto são transportadas até os locais onde atuam. Ao chegar nesses locais, orientadas pela liberação de substâncias quimiotáticas, os leucócitos atravessam a parede dos vasos, por um processo chamado **diapedese**, e, só então, ao atingirem os tecidos, é que vão desempenhar suas funções específicas.

Em um indivíduo adulto normal há entre 6.500 e 10 mil leucócitos por mm^3 . Quando esse número está alterado, pode ser classificado como **leucocitose** (número aumentado) e **leucopenia** (número reduzido).

De acordo com a presença de grânulos citoplasmáticos, os leucócitos são classificados em dois grupos:

- os **granulócitos**, que possuem grânulos primários (lisossomos) e grânulos específicos como os neutrófilos, eosinófilos e basófilos;
- os **agranulócitos**, que possuem apenas grânulos primários e são os monócitos e os linfócitos.

• Neutrófilos

Os neutrófilos são células esféricas também chamadas de leucócitos polimorfonucleares, sendo os mais numerosos, equivalendo a aproximadamente 65% da população total dos leucócitos circulantes, e possuem grânulos azurófilos.

Os neutrófilos não fagocitam quando transitam no sangue circulante, mas tornam-se ameboides e fagocitários ao atingir os tecidos, onde são muito móveis, com a função primordial de ingerir e destruir micro-organismos encontrados neles. Exerce papel principal nos estágios iniciais da resposta bacteriana aguda, em lesões teciduais, e é o principal constituinte do **pus**.

- **Eosinófilos**

Os eosinófilos representam de 2% a 4% do total de leucócitos e têm o mesmo tamanho dos neutrófilos. Seu núcleo é bilobado e os grânulos citoplasmáticos, altamente eosinofílicos, são ovoides e maiores do que os grânulos dos neutrófilos.

Representam a primeira linha de defesa contra parasitas, pois são especializados na digestão de complexos antígeno – anticorpo, característicos dos processos alérgicos.

- **Basófilos**

São os leucócitos menos frequentes no sangue, representando menos de 1% do seu total. Seu núcleo é volumoso, em forma de S retorcido e irregular. Possuem grânulos citoplasmáticos grandes, basófilos e metacromáticos, que frequentemente recobrem o núcleo. Ao deixar a circulação e penetrar no tecido conjuntivo, adquirem aparência semelhante ao mastócito.

Ao entrar em contato com algum alérgeno, os basófilos excitam seus grânulos e provocam uma reação de hipersensibilidade imediata (anafilaxia), que é, de fato, uma reação exagerada do organismo no combate ao alérgeno.

- **Monócitos**

Os monócitos são as maiores células do sangue circulante e representam de 3% a 8% da população leucocitária.

Os monócitos são constituintes da unidade funcional denominada sistema mononuclear fagocitário. Esse sistema se origina da célula mononuclear fagocitária, presente na medula óssea. A célula precursora atinge o sangue circulante, onde permanece alguns dias completando sua maturação e se torna um monócito. Enquanto circulante, essa célula continua um monócito; porém, quando realiza a diapedese e penetra no tecido conjuntivo, transforma-se num

macrófago. Dependendo do órgão no qual se encontre, esse macrófago recebe diferentes designações: células de Kupffer, no fígado; macrófagos alveolares, nos pulmões; células de Langerhans, na pele; microglia, no sistema nervoso central; dentre outros.

- **Linfócitos**

De uma forma geral, os linfócitos são células pequenas (de 9 a 12 μm) com núcleos centrais, ovoides ou reniformes, e cromatina condensada; o citoplasma é levemente basófilo e se apresenta normalmente como um anel delgado ao redor do núcleo. De 20% a 25% dos leucócitos circulantes são células desprovidas de capacidade fagocitária e podem ser divididos em dois grupos:

Linfócitos B

Os linfócitos B se originam e amadurecem na medula óssea. Durante seu amadurecimento, essas células produzem milhares de imunoglobulinas (anticorpos) que são inseridas na sua membrana plasmática, permanecendo com seus sítios de ligação expostos na superfície externa da célula. Quando esses anticorpos membranares entram em contato com os seus antígenos, o linfócito B é “ativado”, sofrendo mitoses e dando origem a dois tipos celulares: os **plasmócitos** e as **células de memória** (linfócito B de memória).

Linfócitos T

Os linfócitos T são produzidos na medula óssea, mas terminam seu processo de amadurecimento no timo, daí a origem de seu nome: linfócitos T.

Quando estas células concluem seu amadurecimento no timo, elas se diferenciam em três tipos celulares:

- **linfócito T “helper” (auxiliar)**: essas células secretam fatores que estimulam a ação de outros linfócitos T e B;

- **linfócito T “supressor”**: libera substâncias que reduzem a ação de linfócitos T e B. Desempenha papel fundamental na supressão da resposta aos antígenos do próprio indivíduo (doenças autoimunológicas);
- **linfócito T “citotóxico”**: essa célula age diretamente sobre células estranhas, como, por exemplo, células transplantadas, e sobre células infectadas por vírus. Atuam de duas formas: secretando proteínas chamadas **perforinas**, que formam orifícios na membrana das células atacadas, provocando sua lise; ou liberando substâncias que induzem as células-alvo à **apoptose**¹².

Alguns autores relatam ainda a existência de um terceiro grupo de linfócitos, os linfócitos NK (*natural killers*) ou “assassinos naturais”. Esses linfócitos representam aproximadamente 10% dos linfócitos circulantes, e recebem o nome de NK porque atacam células cancerígenas e infectadas por vírus sem a necessidade de um estímulo prévio. Em uma distensão sanguínea, não é possível distinguir essas células.

• Plaquetas

São fragmentos citoplasmáticos pequenos (2 a 4 μm) e anucleados, derivados dos **megacariócitos** residentes da medula óssea e desempenham um importante papel na hemostasia¹³, promovendo a coagulação do sangue e ajudando na reparação de danos na parede dos vasos, evitando processos hemorrágicos.

¹² A **apoptose** é um tipo de **morte celular** que possui importante papel durante o processo de diferenciação, crescimento e desenvolvimento dos tecidos adultos normais e patológicos. Fisiologicamente, a **apoptose** é um dos participantes ativos da homeostase, controlando o equilíbrio entre a proliferação e a degeneração celular, ajudando na manutenção do tamanho dos tecidos e órgãos. É erroneamente conhecida como “morte celular programada”, de vez que a definição correta é “morte celular não seguida de autólise”.

¹³ Hemostasia é um conjunto de mecanismos que o organismo emprega para coibir hemorragias, dizendo respeito às rotinas de coagulação sanguínea e reparação de vasos.

3.6. Tecido hematopoiético

O tecido hematopoiético é uma variedade do tecido conjuntivo relacionado à produção dos **elementos figurados (hemácias, leucócitos e plaquetas)**, e proporciona um microambiente tissular propício a esse processo.

Medula óssea

A medula óssea (do grego *myelon* = medula) é a cavidade óssea que aloja um tecido delicado e gelatinoso, rico em vários vasos sanguíneos e uma delicada rede de fibras reticulares. A medula óssea aloja o tecido hematopoiético.

Células-tronco, células progenitoras e células precursoras

As células mais importantes do tecido hematopoiético são as **células-tronco pluripotentes**, capazes de originar todas as células sanguíneas.

As células-tronco pluripotentes têm a importante característica de se autorrenovar. Ao se dividirem, essas células dão origem a duas células-filhas, sendo que somente uma delas vai continuar se desenvolvendo, permanecendo a outra célula-filha como uma célula-tronco de reserva, tornando seu estoque praticamente inesgotável.

Ao contrário do que se acreditava inicialmente, as células-tronco da medula óssea têm uma capacidade de diferenciação celular que não se restringe às células sanguíneas. Inicialmente, as pesquisas se restringiam à utilização de células-tronco embrionárias, mas os estudos revelam a obtenção de células-tronco de um indivíduo adulto.

Depois de retiradas da medula óssea, as células-tronco são mantidas em um meio de cultura no qual têm sua diferenciação direcionada, havendo a produção de células especializadas de um tecido específico que se deseje transplantar. Essas células são, então, utilizadas para substituir células afetadas por processos patológicos. Embora o tema ainda seja controverso e impregna-

do de problemas de caráter ético, já há experiências bem-sucedidas na reparação de tecidos nervosos e cardíacos, dentre outros.

4. Tecido nervoso

O tecido nervoso tem sua origem do ectoderma, mais especificamente no neuroectoderma, e forma o sistema nervoso. Esse sistema é responsável pelo bom funcionamento interno do organismo (sistema neurovegetativo) e por mediar sua relação com o meio ambiente (sistema nervoso cerebroespinal).

O tecido nervoso é constituído por células especializadas chamadas **neurônios**, responsáveis por definir a característica fundamental desse sistema, e por outras células que dão suporte ao neurônio, as **células da neuroglia** ou **neuroglia** ou **glia**. A especialização celular consiste na capacidade de receber informações externas ou internas e convertê-las em impulsos elétricos que serão transmitidos por redes de comunicação integradas e complexas.

O sistema nervoso pode ser dividido anatomicamente em sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP).

4.1. Neurônios

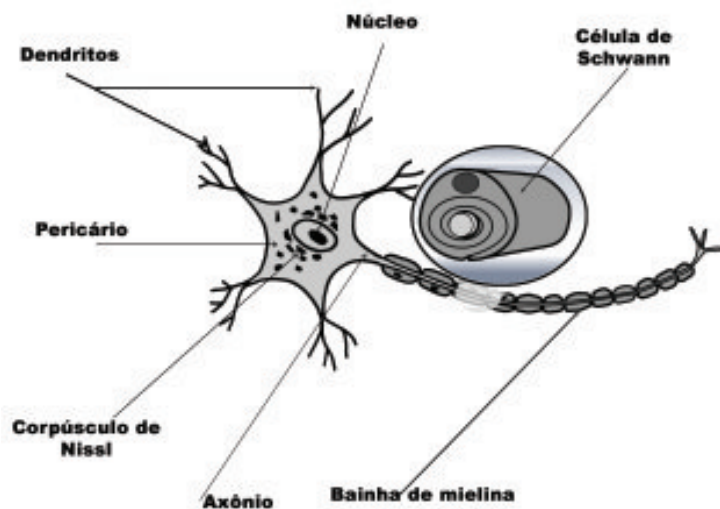
Os neurônios também são chamados de células nervosas, e representam as unidades funcionais do tecido nervoso. Seu número no sistema nervoso humano aproxima-se da ordem de grandeza de 10^{10} . Funcionalmente, os neurônios são classificados em três tipos principais: **neurônios sensoriais**, responsáveis por transportar os impulsos das terminações nervosas para o SNC; **neurônios motores**, que transportam o impulso do SNC em direção às células efetoras; e os neurônios que formam uma extensa rede intermediária que liga os neurônios sensoriais aos neurônios motores, chamados **interneurônios**¹⁴. Grande parte dos neurônios existente no corpo faz parte desta rede intermediária.

¹⁴ Os interneurônios podem ser chamados ainda de neurônios centrais, neurônios intercalados, neurônios intermediários, dentre outros.

Algumas características estruturais são comuns a todos os neurônios, sendo possível identificar três regiões morfológicas com funções específicas: dendritos, corpo celular ou pericário e axônio. O corpo celular, também conhecido como **pericário**, contém o núcleo e grande parte das organelas da célula, apresentando regiões basófilas denominadas **corpúsculos de Nissl** (Figura 12).

Do corpo celular partem prolongamentos que podem ser os **dendritos** ou o **axônio**. De acordo com o número desses prolongamentos, poderemos classificar os neurônios como **multipolares** (apresentam um axônio e dois ou mais dendritos), **bipolares** (um axônio e um dendrito), ou **unipolares** (um axônio que se divide em dois ramos em uma região próxima ao corpo celular) (Figura 12).

Figura 12. Neurônio.



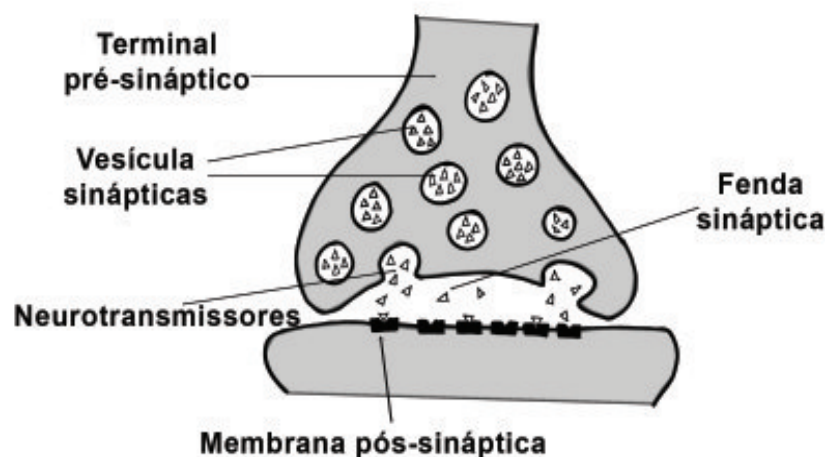
Sinapse

Representa o local de comunicação entre dois neurônios. Na sinapse química, há uma proximidade entre o botão terminal do axônio de um neurônio

(chamado de **botão pré-sináptico**) e o dendrito de outro neurônio (chamado **botão pós-sináptico**), sem que haja contato físico entre esses dois elementos. O espaço entre os dois neurônios é chamado **fenda sináptica**. O botão pré-sináptico contém mediadores químicos (**neurotransmissores**) em seu interior, armazenados em **vesículas sinápticas**, que serão liberados na fenda sináptica provocando o estímulo do neurônio seguinte. O impulso nervoso, ao chegar ao botão sináptico, provoca a entrada de cálcio, fazendo com que as vesículas sinápticas fundam-se à membrana pré-sináptica, liberando os transmissores para o espaço extracelular.

Alguns transmissores, como a **acetilcolina (ACh)**, **noradrenalina (NA)**, **dopamina (DA)** e **serotonina** foram identificados. A acetilcolina, por exemplo, é o transmissor que funciona entre o neurônio e o músculo estriado esquelético. O efeito do transmissor é rapidamente interrompido após ter sido liberado na fenda sináptica (Figura 13).

Figura 13. Representação de uma sinapse neural, demonstrando as vesículas repletas de neurotransmissores que são liberados na fenda sináptica, ligando-se aos receptores da membrana pós-sináptica e dando continuidade ao impulso nervoso.



4.2. Neuroglia

A neuroglia atua na estruturação do SNC e é conhecida como células da glia ou neuroglia. São identificados três principais tipos celulares: astrócitos, oligodendrócitos e microglia.

- **Microglia**

São os macrófagos do SNC, responsáveis pela remoção de restos celulares durante o desenvolvimento normal do sistema nervoso e pela fagocitose de outras substâncias estranhas que possam aparecer no SNC. São células ricas em lisossomos e apresentam retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido.

- **Astrócitos**

São as maiores células da neuroglia. Dividem-se em dois tipos: protoplasmáticos (predominantes na substância cinzenta) e fibrosos (predominantes na substância branca). Essas células apresentam numerosas projeções citoplasmáticas que envolvem grande parte dos vasos sanguíneos (chamadas pés-vasculares) e se expandem em direção aos neurônios (pés-terminais). Participam do processo de regulação do transporte de substâncias para os neurônios do SNC, contribuindo para a formação da barreira hematoencefálica.

- **Oligodendrócitos**

Esse tipo celular é o responsável pela formação da fibra nervosa do SNC. Seus prolongamentos são capazes de envolver os prolongamentos dos neurônios, podendo formar a bainha de mielina de vários neurônios ao mesmo tempo.

- **Células de Schwann**

São as células responsáveis pela formação da fibra nervosa no SNP. As células de Schwann podem se enrolar em volta do axônio seguidas vezes, formando a bainha de mielina. São necessárias várias células de Schwann para envolver um axônio.

• Epêndima

Geralmente classificada como constituinte da neuroglia, forma o revestimento dos ventrículos e do canal espinhal (cavidades repletas de líquido). Em muitos locais do encéfalo, o revestimento endimário é modificado de modo a permitir a produção do líquido cefalorraquidiano a partir das alças de capilares adjacentes. A união dessas alças com as células endimárias modificadas é chamada plexo coroide.

Condução do impulso nervoso

As células do nosso corpo, principalmente as células do tecido nervoso, apresentam um potencial elétrico na sua membrana plasmática. Esse potencial elétrico confere uma carga positiva na face externa da membrana plasmática e uma carga negativa na face interna. Essa polarização da membrana se deve às variações de concentrações de íons entre o meio intra e extracelular. Essa diferença é mantida pelo funcionamento da bomba de Na^+ e K^+ , graças à presença de ATPases na membrana que liberam energia para o transporte dos íons. Em uma condição de repouso, a concentração externa de Na^+ é maior do que a interna e a concentração interna de K^+ é maior do que a externa.

Quando um neurônio é estimulado com determinada intensidade, há uma modificação do funcionamento da bomba iônica. O estímulo provoca um aumento da permeabilidade da membrana plasmática do neurônio ao íon sódio, levando à entrada deste íon no citoplasma. Essa entrada de íons sódio provoca uma inversão local da polaridade da membrana: a face interna da membrana passa a ter carga positiva, e a face externa, carga negativa. Essa inversão de polaridade se propaga pela membrana da célula nervosa, normalmente dos dendritos ao axônio, sendo que as regiões iniciais tendem a voltar a seu estado inicial de polarização pela ação da bomba de Na^+ e K^+ .

Nas fibras nervosas que possuem bainha de mielina, o impulso adquire uma característica distinta de “**condução saltatória**”. A bainha de mielina não é contínua em todo o axônio. Alguns pontos entre as células formadoras da mielina ficam sem mielina, sendo estes locais chamados **nódulo** ou **nó de Ranvier**. A presença desses nós torna a condução do impulso mais rápida, visto que a onda de despolarização salta de um nó para o outro (a bainha de mielina funciona como um isolante).

A onda de despolarização, ao chegar ao botão pré-sináptico, provoca a fusão das vesículas, que contém os transmissores, à membrana plasmática. Os transmissores são liberados na fenda sináptica e, ao entrar em contato com os receptores presentes na membrana do botão pós-sináptico, provocam uma nova onda de despolarização no neurônio seguinte.

5. Tecido muscular

O tecido muscular é formado por células especializadas cuja função é a **contração**. Essas células são também chamadas fibras musculares, e são encontradas agrupadas em massas macroscópicas denominadas **músculos**, que são as estruturas ativas do aparelho locomotor, enquanto os ossos são as estruturas passivas.

Os tecidos musculares podem ser classificados em: tecidos musculares estriados, que podem ser esqueléticos ou cardíacos, e tecidos musculares lisos.

5.1. Tecido muscular estriado esquelético

O tecido muscular estriado esquelético constitui a maior parte da musculatura dos vertebrados e recobre totalmente o esqueleto, estando inserido nos ossos (Figuras 14 e 15).

Os músculos esqueléticos são de contração voluntária e se formam pela fusão de células precursoras (mioblastos), originando uma célula cilíndrica ex-

tremamente longa (atingindo vários centímetros), com muitos núcleos periféricos, e com estriações transversais.

O citoplasma das fibras musculares esqueléticas encontra-se repleto por miofibrilas, possuindo retículo sarcoplasmático, mitocôndrias e outras organelas.

As **miofibrilas** são estruturas cilíndricas que se estruturam formando **sarcômeros**, que são as unidades funcionais (contráteis) do músculo esquelético. O alinhamento dos sarcômeros é responsável pelas estriações transversais presentes nos músculos estriados.

Os sarcômeros das miofibrilas são compostos de **miofilamentos** que vão gerar a contração muscular. Esses filamentos contráteis são formados por um conjunto de proteínas, e podem ser:

- **Miofilamentos finos de actina**

São compostos por actina, tropomiosina e tropomina.

A **actina** que constitui filamentos é chamada actina F (filamentosa) e é constituída por monômeros de actina G (globosa). A actina globosa possui duas polaridades, que vão orientar a formação do filamento proteico.

A **tropomiosina** é formada por duas cadeias polipeptídicas enroladas em alfa-hélice, que vão ocupar o sulco formado pelos filamentos de actina F. Cada molécula de tropomiosina se estende por 7 monômeros de actina e se liga a um complexo troponina.

A **troponina** é um complexo formado por três proteínas: TnI, TnC e TnT. A **troponina T** se liga à molécula de tropomiosina; a **troponina I** é responsável por inibir a ligação da miosina com a actina; e a **troponina C** se liga aos íons de cálcio.

- **Miofilamentos grossos de miosina**

Esses filamentos são espessos e podem ser subdivididos em duas estruturas essenciais. A porção mais alongada, que compõe a cauda da molécula de

miosina, dá estruturação ao miofilamento de miosina de uma forma geral e é chamada **meromiosina leve**. Na extremidade dessa porção alongada, encontra-se uma “cabeça”, semelhante à extremidade de um taco de golfe, que recebe o nome de **meromiosina pesada**, juntamente com um discreto “pescoço”. A meromiosina pesada possui atividade ATPásica e é responsável pela interação com os filamentos de actina.

Nos sarcômeros, esses miofilamentos estão organizados de forma apropriada, que compõe áreas claras e escuras que se intercalam, formando todo um conjunto de bandas (I, A, H) e de linhas (Z e M) que, ao se repetirem por toda a extensão da fibra muscular, são responsáveis pela imagem das estriações transversais visualizadas ao microscópio de luz.

Figura 14. Músculo estriado esquelético (corte longitudinal).

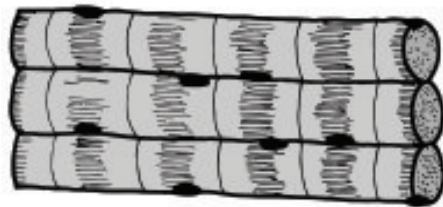
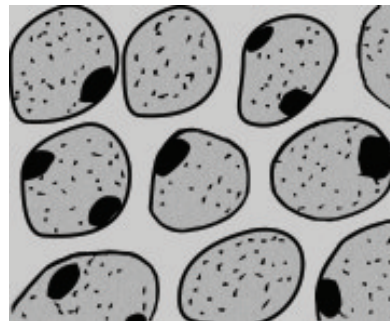


Figura 15. Músculo estriado Esquelético (corte transversal).



5.2. Tecido muscular estriado cardíaco

O músculo cardíaco é um músculo de contração **involuntária** e, assim como o esquelético, é constituído por fibras que apresentam estrias transversais, denotando a organização dos seus miofilamentos em sarcômeros (Figuras 16 e 17).

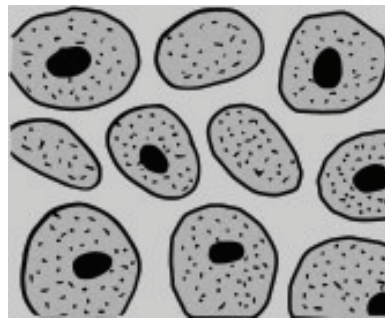
As células cardíacas são envoltas por uma delicada camada de tecido conjuntivo, e suas células são alongadas, mas não tanto quanto as esqueléticas, e ramificadas, com um ou dois núcleos centrais.

Unindo duas células cardíacas, há complexos juncionais especializados chamados **discos intercalares**. Os discos intercalares são visualizados ao microscópio de luz como uma linha mais escura, na forma de uma reta ou em degraus, e são compostos por junções de adesão, desmossomos e junções comunicantes. São estruturas características do tecido muscular cardíaco.

Figura 16. Músculo estriado cardíaco (corte longitudinal).



Figura 17. Músculo estriado cardíaco (corte transversal).



5.3. Músculo liso

As células do músculo liso são alongadas e fusiformes, com um único núcleo oval e central. São células de **contração involuntária**, presentes na parede de vários órgãos, como, por exemplo, a via digestória, na qual são responsáveis pelos movimentos peristálticos (Figura 18).

As células musculares lisas são envoltas por uma lâmina basal e uma fina rede de fibras reticulares, que recebe a denominação lâmina externa. Como nos outros tipos de tecido muscular, os seus elementos contráteis são os miofilamentos de actina e miosina. A diferença reside no fato de esses miofilamentos **não** estarem dispostos na forma de sarcômeros, mas de forma aleatória. Assim, não há estriações transversais em sua estrutura. Além

disso, os filamentos de actina são formados somente de moléculas de actina e tropomiosina.

O cálcio utilizado na contração muscular desse tecido é armazenado no interior da célula, em vesículas denominadas **cavéolas**.

Esse tipo de músculo recebe inervações simpáticas e parassimpáticas (que são antagônicas), mas não há estruturas parecidas com a placa motora. As fibras nervosas liberam neurotransmissores (acetilcolina e noradrenalina) no espaço intercelular que se difundem, alcançando e despolarizando as células musculares. Quando despolarizadas, as cavéolas liberam o cálcio e se inicia a contração dos miofilamentos.

Figura 18. Músculo liso (corte longitudinal).



Referências Bibliográficas

GITIRANA, Lúcia de Brito. *Histologia: conceitos básicos dos tecidos*. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2007.

STEVENS, A.; LOWE, J. *Histologia humana*. 2. ed. São Paulo: Manole, 2001.

Para saber mais

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de histologia em cores*. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KIERSZERBAUM, A. L. *Histologia e biologia celular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

LULLMANN – RAUNCH, R. *Histologia: entenda, aprenda, consulte*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

YOUNG, B. et al. *Wheater histologia funcional*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

Capítulo 3

Técnicas histológicas

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Lycia de Brito Gitirana

Pedro Paulo de Abreu Manso

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação delas com os constituintes da matriz extracelular. A histotecnologia proporciona o entendimento dos fundamentos técnicos para a análise dos elementos teciduais, normais ou patológicos, isto é, suas células e os elementos da matriz extracelular, abrangendo diversas técnicas histoquímicas.

Os procedimentos técnicos aplicados na histotecnologia incluem técnicas citoquímicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas, voltadas para a pesquisa científica e para o diagnóstico patológico, além de análises em nível de microscopia eletrônica. Neste capítulo, serão realizadas considerações somente sobre as técnicas histológicas voltadas para a análise histoquímica e imuno-histoquímicas dos tecidos.

A técnica histológica representa um conjunto de procedimentos técnicos que, inicialmente, se difundiu entre os diversos profissionais das ciências naturais, como os botânicos e zoologistas, sendo empregada também pelos anatomistas e histologistas da época. Geralmente, os estudiosos utilizavam um

microscópio simples para descrever os tecidos; porém, somente duzentos anos após a descoberta do microscópio, a utilização da técnica histológica foi utilizada como ferramenta para diagnóstico histopatológico. Por volta de 1828, Rudolph Virchow, médico alemão e antropologista, utilizou a análise histopatológica como ferramenta básica e essencial em qualquer laboratório de histologia e/ou anatomia patológica para elaborar as bases da patologia celular.

Histotecnologista, ou histotécnico, é a designação conferida ao profissional responsável por executar a técnica histológica para atuar em instituições de saúde, instituições voltadas à pesquisa científica e ao controle de qualidade, normalmente em laboratórios de histo ou anatomopatologia. Sua função, além de ser essencial aos serviços de saúde, pelo apoio ao diagnóstico e ao tratamento de pacientes, está também localizada de forma central no moderno paradigma médico anatomoclínico.

Os procedimentos utilizados para se obterem amostras de tecido ou preparados histológicos retirados de um organismo para exame microscópico incluem: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia (corte) e coloração. No caso de tecidos calcificados, o material é descalcificado após a fixação e, em seguida, realizam-se os outros procedimentos, os quais discutiremos um a um.

Vale a pena ressaltar a importância do planejamento para a execução de qualquer procedimento que envolva a técnica histológica, pois tal planejamento facilita e evita acontecimentos indesejados durante a realização de qualquer etapa desse processo. De forma geral, a organização é um dos principais fatores para se criar um ambiente seguro para o desempenho do trabalho. Um laboratório limpo e organizado é fundamental para se desenvolver um bom trabalho, ao contrário de um que apresente bancada entulhada por materiais e sem espaço adequado para a realização dos procedimentos. Deve-se evitar também empilhar caixas e deixar coisas pelo chão, obstruindo ou dificultando o trânsito dos trabalhadores no laboratório.

1. Coleta, fixação e clivagem

A . Coleta

Consiste em remover amostras de tecido de um determinado organismo. Essa coleta pode ser feita quando o organismo ainda está vivo, por meio de biópsia ou durante uma cirurgia, ou mesmo *post mortem*, durante a realização de necropsia de animais ou seres humanos.

Quando a coleta é realizada para diagnóstico de determinada enfermidade, o material originado de necropsia ou biópsia deve ser previamente analisado por um patologista, o qual fornecerá o laudo macroscópico, ressaltando aspectos macroscópicos da peça anatômica, como cor, tamanho e aparência do órgão analisado. Durante a coleta, também devemos respeitar algumas regras que são fundamentais para a boa qualidade final da amostra, que serão abordadas mais adiante.

Após a coleta, o material deve ser registrado em um livro próprio de protocolo, para registro. Por meio desse registro, o material será identificado por um número, que o acompanhará durante todos os procedimentos da técnica histológica. Em instituições credenciadas para realizar procedimentos histopatológicos, o material obtido cirurgicamente deve ser acompanhado de uma ficha com o pedido da análise histopatológica, contendo a identificação do órgão e as datas da fixação e de entrada do material no laboratório. Essa ficha técnica deverá conter a identificação do paciente (nome, sexo, cor, idade, estado civil, nacionalidade, naturalidade e profissão) e, no caso de paciente de rede hospitalar, deverão ser informados sua qualificação (registro ou número do leito), registro ambulatorial, ou consultório particular, identificação do médico responsável, data da intervenção cirúrgica, descrição da biópsia, morte ou necropsia, e outros dados que o médico julgar importantes, que auxiliarão o histopatologista no diagnóstico.

Para material proveniente de trabalhos experimentais com animais em instituições de pesquisa credenciadas, o registro deverá ser feito após a eutanásia, em livro próprio. No livro de registro experimental devem constar a identificação do laboratório, a data da eutanásia, os órgãos colhidos, o tipo de procedimento realizado com o animal experimental (por exemplo, infecção), o título do projeto e as observações necessárias para avaliação do pesquisador ou tecnologista. Atualmente, deve-se realizar também o registro no comitê de ética da instituição, que aprovará a realização da pesquisa, fornecendo o número de protocolo. Esse número é importante, pois deve ser informado ao se elaborar um trabalho científico, seja uma dissertação de mestrado, tese de doutorado, publicação em revista indexada, ou outro meio de divulgação científica. Tratando-se de animal experimental nativo, originário diretamente do meio ambiente, o pesquisador deve submeter o seu projeto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) a fim de obter uma autorização para coleta, sem a qual poderá estar sujeito a sanções da legislação vigente. Sem esses registros, o material não poderá ser manipulado no laboratório, podendo o responsável pela coleta responder a processo na Justiça por desrespeito às leis vigentes no território nacional.

Notas de biossegurança

Todo material biológico coletado para análise é potencialmente infectante. Assim, deve-se ter muito cuidado durante a coleta e a manipulação dos espécimes, utilizando sempre os equipamentos de proteção individual (EPI). É imprescindível, durante os procedimentos de coleta, o uso de luvas, jaleco, máscara e óculos de proteção. Você deve ainda procurar se informar na instituição sobre qual é a política de descarte de material infectado. Nunca descarte material biológico ou seus derivados em lixo comum.

B. Fixação

Você alguma vez refletiu sobre o que acontece quando esquecemos um pedaço de carne fora da geladeira? Por que a carne apodrece? O que, realmente, acontece com esse material?

Ao se remover qualquer material (órgão ou tecido) de um organismo após a sua morte, esse material inicia um processo de autólise, ou seja, por não receber o suprimento necessário de oxigênio e de substâncias essenciais ao seu funcionamento, começa a haver acúmulo de dióxido de carbono nos tecidos e, em suas células, inicia-se o processo autolítico, no qual enzimas lisossomais atuam no citoplasma da própria célula.

Ao se colocar um pedaço de carne na geladeira, esse processo é atrasado; porém, fora da geladeira a autólise é acelerada.

Assim, ao se analisar as estruturas teciduais de um determinado órgão ao microscópio, precisa-se preservar os tecidos, sendo imprescindível a realização do processo de *fixação*.

A fixação é uma das etapas mais importantes da técnica histológica, pois visa interromper o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais, além de permitir a penetração de outras substâncias subsequentes à fixação.

Diversos protocolos de fixação e tipos de fixadores são citados na literatura técnica; porém, nenhum desses procedimentos de fixação é reconhecido como perfeito. Alguns fixadores se revelam excelentes para determinadas estruturas tissulares, enquanto outros são preferenciais para as células ou mesmo excelentes para análise da bioquímica tecidual. Além disso, há, também, fixadores indicados para a preservação da antigenicidade dos elementos teciduais que serão analisados pela imuno-histoquímica, em contraste com aqueles que não preservam as moléculas antigênicas. Porém, não existe um fixador ideal que

alcance todos os objetivos da fixação, mas deve-se investigar qual o fixador mais apropriado para o tipo de material a ser analisado. Por essa razão, deve-se consultar a literatura científica antes de se realizar qualquer tipo de experimento ou intervenção cirúrgica.

Basicamente, existem dois tipos de fixação: a física e a química. De fato, sempre se utiliza uma associação dos dois tipos de fixação, pois mesmo a fixação química sempre pode sofrer a influência de um fator físico ambiental, como a temperatura. Outros fatores físicos podem influenciar na fixação, como as ondas eletromagnéticas (micro-ondas) e a agitação molecular (ultrassom).

A fixação química é obtida quando se utilizam substâncias químicas capazes de formar reações com os sítios das biomoléculas, estabilizando-as e impedindo a alteração tecidual, tanto química quanto física.

Inicialmente, os fixadores eram divididos em duas classes: (1) fixadores coagulantes ou desnaturantes, que precipitam as proteínas dos tecidos. Esses fixadores também são chamados de fixadores não aditivos, pois não se ligam às proteínas; (2) fixadores não coagulantes ou aditivos, que se ligam às proteínas, precipitando-as.

Sabe-se pouco sobre os efeitos dos fixadores químicos; porém, na técnica histológica se utiliza uma ou mais substâncias químicas, denominadas líquidos ou misturas fixadoras, reunindo várias substâncias numa tentativa de superar as desvantagens de uma determinada substância pela vantagem de outra substância adicionada à mistura. Tais misturas são capazes de agir sobre os tecidos de forma a buscar a melhor preservação dos elementos teciduais.

A escolha de um fixador depende da natureza do processo patológico presente no tecido, da estrutura celular e/ou tecidual, ou, então, da natureza bioquímica do elemento que se deseja preservar. Por essas razões, o histotécnico deve conhecer os diversos tipos de fixadores e saber qual a compatibilidade do fixador com os diversos métodos de coloração, com a propriedade antigênica

do elemento tecidual, visando adequar o tipo de fixador com a propriedade dos vários tipos de tecidos. Essas informações são importantes para auxiliar o pesquisador ou o patologista.

Atualmente, com frequência se utiliza a classificação de fixadores descrita por Leong (1996), que teve como base a classificação desenvolvida por Hopwood (1977), sem muitas alterações. Leong classificou as substâncias fixadoras da seguinte maneira:

- **Fixadores aldeídos:** formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído comercial.
- **Agentes oxidantes:** tetróxido de ósmio, dicromato de potássio, permanganato de potássio e ácido crômico.
- **Agentes desnaturantes ou coagulantes de proteínas:** metanol, etanol, acetona e ácido acético.
- **Mecanismo desconhecido:** cloreto de mercúrio, ácido pícrico e sais de zinco.
- **Combinação de reagentes:** tetróxido de ósmio e glutaraldeído, tetróxido de ósmio e iodeto de zinco, glutaraldeído e carbodiamida e formaldeído com glutaraldeído.
- **Fixação a seco:** carbowax 6000 (20% de polivinil – álcool ou 20% de polietileno glicol) ou fixação no vapor.
- **Micro-ondas:** fixação pelas ondas eletromagnéticas com ou sem a utilização de agentes fixadores.

Será dada maior atenção aos fixadores aldeídos, pois estes são fixadores à base de aldeídos de amplo uso nos laboratórios de anatomia patológica e de histologia.

Os fixadores aldeídos comumente utilizados são o formaldeído, o glutaraldeído, e o paraformaldeído, que é o próprio formaldeído na sua forma

pura polimerizada. Esses fixadores formam ligações cruzadas com as proteínas tissulares, tornando-as insolúveis em forma de um gel.

Dentre os fixadores aldeídos, o formaldeído comercial é o mais usado na rotina histológica devido ao seu baixo custo financeiro, além de ser de fácil preparo. Contudo, algumas considerações se fazem necessárias. O formaldeído comercial, um gás incolor, é comercialmente fornecido em solução na concentração de 37% ou 40%. Ao se preparar uma solução à base de formaldeído comercial a 10%, de fato a solução estará a 3,7% ou 4%; apesar disso, convencionou-se chamar essa solução de formalina, ou formaldeído a 10%. Outro ponto importante a se mencionar é que o formaldeído, na presença de água, encontra-se na sua forma monomérica. Já o paraformaldeído, por ser livre de metanol, é muito utilizado para a fixação de tecidos a serem analisados pela microscopia eletrônica, pois o metanol pode ocasionar grandes prejuízos, interferindo nas análises ultraestruturais. Porém, o paraformaldeído comercial tem sido recomendado para análise imuno-histoquímica. Na realidade, o formaldeído contém polímeros de paraformaldeído comercial, mas que só serão hidrolisados quando diluídos em água.

Quando o formaldeído é exposto à luz, isto é, ao oxigênio atmosférico e tecidual, ocorre a oxidação do formaldeído, formando ácido fórmico. O ácido fórmico pode se precipitar nos tecidos sob a forma de um pigmento de coloração marrom, sendo considerado um artefato. Para se evitar a formação desse precipitado, deve-se preparar o fixador em soluções tamponadas, ou, então, adicionar carbonato de cálcio (giz) para neutralizar a ação do pH da solução. Contudo, o giz só é recomendado em último caso, pois poderá deixar áreas de pseudocalcificação tecidual.

A seguir, encontram-se alguns dos fixadores aldeídos e suas principais características:

• **Formalina 10%**

Formaldeído comercial	100 mL
Água destilada	900 mL

Características:

- solução hipotônica (células intumescidas);
- pode levar à deposição de pigmento formólico;
- baixo custo;
- fixa bem as proteínas.

Tempo de fixação: 24-48 horas.

Lavagem: água corrente por 1 ou 2 horas.

Tratamento prévio dos cortes para a retirada do pigmento formólico

- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.
- Imergir os cortes em uma solução saturada de ácido pícrico em etanol 95% por 24 horas.
- Lavar as lâminas em água corrente até desaparecer a cor amarela do ácido pícrico.
- Seguir com o protocolo da coloração desejada.

Notas de biossegurança

Ao manipular formaldeído, ou soluções contendo essa substância, deve-se fazer uso de luvas, máscara com filtro próprio para vapores orgânicos, em local arejado e com exaustão. O preparo de soluções fixadoras deve ser feito em capela de exaustão. Por serem muito voláteis e sensíveis à luz, as soluções contendo formaldeído devem ser guardadas ao abrigo da luz em vidro âmbar firmemente fechado. O formaldeído é tóxico quando ingerido, inalado ou em

contato com a pele. A inalação deste composto pode causar irritação nos olhos, nas mucosas e no trato respiratório superior. Em altas concentrações, pode causar bronquite, pneumonia ou laringite. Este composto é classificado como carcinogênico e teratogênico. Nunca descarte soluções contendo formaldeído ou outras soluções fixadoras em esgoto sanitário convencional; procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

• **Formol-salino**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Cloreto de sódio.....	9 g

Características:

- solução isotônica;
- pode levar à deposição de pigmento formalínico;
- indicado para algumas reações histoquímicas.

Tempo de fixação: 24 a 48 horas.

Lavagem: água corrente por 1 a 2 horas.

Indicado para algumas reações histoquímicas.

• **Formalina tamponada de Carson ou formalina em tampão Millonig**

Formaldeído comercial	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Fosfato de sódio monobásico.....	18,6 g
Hidróxido de sódio.....	4,2 g

Características:

- utilizar solução isotônica em pH 7,2 - 7,4 (310 mOsm);

- indicado para a microscopia eletrônica e microscopia de luz;
- provoca menor extração de elementos celulares;
- microtomia sofrível de tecidos com muito sangue;
- não interfere na maioria das colorações;
- fixa muito bem a maioria dos tecidos;
- preserva a imunoreatividade de hormônios gastrintestinais, quando preparado com paraformaldeído comercial no lugar do formaldeído comercial.

Tempo de fixação: 24 a 72 horas.

Lavagem: água corrente por 1 a 2 horas.

• Formalina-alcoólica

Formaldeído comercial.....	100 mL
Álcool 95%.....	900 mL

Características:

- utilizada para a observação de minerais (cobre, magnésio, ferro e cálcio); indicada para tecido nervoso, parasitas, glicogênio, amiloide e mucossubstâncias.

Tempo de fixação: 24 a 48 horas.

Lavagem: álcool 95% por 1 hora iniciando a desidratação.

• Formalina neutra tamponada 10%

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Fosfato de sódio monobásico.....	4 g
Fosfato de sódio dibásico.....	6,5 g

Características:

- solução hipotônica (células intumescidas);
- aproximadamente 165 mOsm;
- pH 6,8;
- é indicada para células pancreáticas, bactérias, alguns tipos de carboidratos, células do tecido conjuntivo, fungos, minerais, tecido nervoso, pigmentos e glândulas.

Tempo de fixação: 24-72 horas.

Lavagem: água corrente por 1 ou 2 horas.

• **AFA ou FAA – álcool - formalina - ácido acético:**

Etanol (95 - 100%).....	85 mL
Formaldeído comercial.....	10 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

Características:

- é um fixador de rápida penetração;
- preserva relativamente bem a morfologia, ácidos nucleicos e carboidratos;
- os lipídeos não são preservados;
- misturar no momento do uso;
- muito utilizado para fixar helmintos.

Tempo de fixação: 4 a 48 horas em tecidos e 10 a 30 minutos para esfregaços e/ou distensões.

Lavagem: direto para o álcool 95% do processador.

Vários são os fatores que influenciam no processo da fixação, interferindo diretamente na preservação tecidual e, em última instância, no tecido que se deseja observar. Assim, deve-se analisar criteriosamente o protocolo de fixação para identificar os fatores que podem influenciar diretamente na fixação do tecido a ser analisado e conseqüentemente interferir na preservação tecidual.

Esses fatores são:

- temperatura;
- espessura do tecido;
- penetração;
- tempo de fixação;
- escolha do fixador;
- relação volume do fixador tamanho do espécime;
- estocagem apropriada;
- pH do fixador;
- osmolaridade da solução fixadora;
- adição de sais na mistura;
- concentração dos fixadores.

C. Clivagem

A clivagem consiste em reduzir as dimensões dos fragmentos dos tecidos coletados. Dependendo do tipo de fixador empregado, a clivagem poderá ocorrer em até algumas horas após a fixação. Na clivagem ideal, os fragmentos devem atingir cerca de 3 mm de espessura; porém, dependendo do tipo de órgão, esse fragmento pode chegar a mais do que 5 mm (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Clivagem de coluna vertebral de camundongos Swiss webster.



Figura 2. Clivagem com 3mm de espessura.



A redução das dimensões do fragmento facilita a penetração dos fixadores e a difusão dos reagentes durante as demais etapas do processamento dos tecidos.

Para uma boa análise histológica, devemos respeitar algumas regras durante a coleta, a fixação e a clivagem:

- fixar o tecido logo após a coleta da amostra;
- retirar, primeiramente, os órgãos conhecidamente com alto metabolismo, pois são os primeiros a sofrer autólise;
- nunca comprimir o material a ser fixado com pinça ou qualquer outro instrumental, pois a força imprimida pode causar distorção da estrutura tecidual;
- para se obter uma boa fixação de órgãos encapsulados, a cápsula deve ser removida;
- os fragmentos devem possuir preferencialmente 3 mm de espessura, pois geralmente os fixadores não penetram mais do que isto em tempo hábil de evitar a autólise.

- para se obterem fatias delgadas de órgãos compactos, como fígado, baço, rins, entre outros, coloque-os sobre uma placa de cortiça ou placa de Petri, previamente revestida com parafina, e com uma gilete nova e afiada proceda à confecção dos fragmentos;
- como os fragmentos frequentemente se deformam durante a fixação, é conveniente que, após essa etapa, sejam novamente clivados com gilete, de modo que cada fragmento apresente uma superfície lisa de corte que servirá não somente de orientação ao técnico durante o processo de inclusão, mas também auxiliará a etapa subsequente, ao se desbastar o bloco;
- usar, no mínimo, vinte vezes o volume de fixador em relação ao volume dos fragmentos a serem fixados. Agitar, suave e periodicamente, os fragmentos dos órgãos durante a fixação do material para que o fixador se misture uniformemente no frasco;
- os frascos utilizados para a fixação devem ter boca larga, pois, além de facilitar o acesso aos fragmentos, ou mesmo aos órgãos inteiros, esses costumam aumentar seu volume após a fixação;
- nunca coloque o material a ser fixado em um frasco vazio, pois este pode se aderir à superfície do vidro, impedindo que o fixador penetre na área em contato com o vidro;
- acondicionar os tecidos clivados em cassetes histológicos identificados (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Espécime clivado e acondicionado em cassetes histológicos.



Figura 4. Cassete identificado pronto para o processamento.



Notas de biossegurança

Durante o procedimento de clivagem do material, tome muito cuidado com as navalhas e giletes utilizadas. O material perfurocortante, bem como os restos de material biológico, devem ser descartados em lixo próprio.

2. Descalcificação

Em muitos tecidos, verifica-se a deposição de sais minerais, como cálcio e fosfato. Por exemplo, o tecido ósseo é uma especialização do tecido conjuntivo, sendo rígido e inflexível devido à presença de cristais de hidroxiapatita em sua matriz extracelular.

Em microscopia de luz, existem dois procedimentos técnicos que auxiliam o estudo do tecido ósseo: (1) a descalcificação, que remove a porção mineral e analisa somente os constituintes orgânicos do tecido ósseo; e (2) o desgaste, que permite analisar os componentes inorgânicos do tecido.

Comentaremos neste capítulo somente o procedimento da descalcificação, que visa à retirada dos componentes inorgânicos, como fosfato de cálcio presente em tecidos ósseos, em tumores ósseos ou em determinadas patologias.

A descalcificação, por remover os sais de cálcio, se faz necessária para tecidos mineralizados, pois os cristais de cálcio destroem o fio da navalha, criando “dentes” que impedem a confecção de bons cortes e levam à formação de artefatos técnicos, impedindo a análise histológica adequada.

A escolha do método de descalcificação depende da urgência, do grau de mineralização, do interesse da investigação, das técnicas de coloração que se pretende empregar e do tipo de fixador utilizado. Quanto mais rápida for a ação de um descalcificador, pior será a preservação morfológica do tecido.

A prática da descalcificação

Após a coleta o tecido, este deve ser fixado, lavado para retirar o excesso de fixador e, só então, submetido à descalcificação.

A descalcificação pode ser realizada por métodos químicos e físicos. Os métodos químicos utilizam soluções descalcificadoras em pH ácido, soluções quelantes e meios de troca iônica. Os métodos físicos estão sempre associados a descalcificação química, englobando a dissociação eletrolítica e submissão do material contido em soluções descalcificadoras, ao ultrassom e às micro-ondas, que aceleram o processo de descalcificação.

Descalcificação química

A. Descalcificação por ácidos

Os descalcificadores ácidos possuem a propriedade de solubilizar sais minerais. Na matriz inorgânica dos tecidos mineralizados, ocorrem principalmente sais de fosfato e de carbonato, que são pouco solúveis na água. Esse método possui a vantagem de ser simples; porém, recomenda-se fazer um banho neutralizante com hidróxido de amônia ou oxalato de amônia ou sódio após a descalcificação.

A desvantagem desse método é a ocorrência de dilatação e hidrólise da matriz óssea e destruição de enzimas, ácidos nucleicos e polissacarídeos.

A solução descalcificadora ácida age removendo o cálcio dos sais de carbonato ou fosfato presentes no osso, efetuando uma troca iônica que resulta na formação de um sal de cálcio solúvel. Algumas das soluções descalcificadoras constituem-se de ácidos orgânicos ou inorgânicos, que serão citados a seguir.

Existe um grande número de agentes descalcificadores ácidos, incluindo ácidos fracos ou fortes, que podem ser aquosos ou alcoólicos, diluídos ou não em agentes fixadores.

• **Ácidos fortes** - possuem maior poder descalcificante, causando dano aos tecidos, principalmente aos núcleos que são hidrolisados, o que prejudica a utilização posterior de corantes nucleares. Esse tipo de descalcificador é empregado para análises urgentes; para material não urgente, aconselham-se agentes quelantes pelos motivos que serão descritos mais adiante.

Ácido nítrico (HNO_3) - não causa o intumescimento dos tecidos e proporciona maior nitidez nas colorações. Geralmente é utilizado em concentrações de 5% a 10%, não se devendo expor o tecido a esta solução por mais de 48 horas. É um descalcificador rápido muito prejudicial ao tecido.

Ácido clorídrico (HCl) - é um dos ácidos de ação rápida mais utilizados. Geralmente é usado em solução tampão, como, por exemplo, o sulfato de sódio a 5% ou 10%, ou, ainda, diluído em álcool.

Ácido nítrico aquoso a 5%:

Ácido nítrico.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Ácido nítrico aquoso a 10%:

Ácido nítrico.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

Formalina - ácido nítrico:

Formaldeído.....	10 mL
Água destilada.....	80 mL
Ácido nítrico.....	10 mL

Fluido de Perennyi:

Ácido nítrico 10%.....	40 mL
Etanol absoluto.....	30 mL
Ácido crômico 0,5%.....	30 mL

• **Ácidos fracos** - os ácidos mais usados nas misturas descalcificadoras são o ácido acético, ácido pícrico e ácido fórmico. Os ácidos acético e pícrico também são muito utilizados em misturas fixadoras, fixando ao mesmo tempo em que descalcificam os tecidos pouco mineralizados, como os tecidos embrionários. Dentre os ácidos, o ácido fórmico é o mais utilizado na solução de 5% a 10 %.

Ácido fórmico (HCOOH) - pode ser utilizado em solução a 5% aquosa ou alcoólica, ou em mistura fixadora com o formol 10% a 20%. Geralmente é usado em soluções tampões, como o tampão citrato de sódio, que proporciona uma melhor coloração em relação ao método com ácido nítrico.

Ácido fórmico a 5%:

Ácido fórmico 90%.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Ácido fórmico a 5%:

Ácido fórmico 90%.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Formalina – ácido fórmico:

Ácido fórmico 90%.....	10 mL
Formaldeído comercial.....	5 mL
Água destilada.....	85 mL

Mistura descalcificadora ácido fórmico-clorídrico:

Solução A – ácido clorídrico 8%:

Ácido clorídrico concentrado	40 mL
Água destilada.....	460 mL

Solução B – ácido fórmico 8%:

Ácido fórmico.....	40 mL
Água destilada.....	460 mL

Solução de uso: (preparar antes de usar):

Solução A.....	500 mL
Solução B.....	500 mL

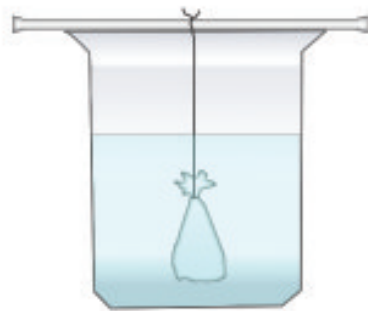
Ácido pícrico ($C_6H_2(NO_2)_3OH$) - esse ácido age muito lentamente e é utilizado principalmente em solução aquosa saturada para descalcificar tecidos embrionários. Os tecidos devem ser lavados em álcool 70% após a descalcificação para remover o precipitado amarelo.

Procedimentos gerais para a descalcificação por misturas ácidas:

1- A peça a ser descalcificada não deve possuir mais do que 5 mm de espessura. Esta deve ser clivada para isso.

- 2- O volume da mistura descalcificadora deve ser de dez a vinte vezes as dimensões da peça a ser descalcificada.
- 3- O material a ser descalcificado deve estar suspenso na mistura descalcificadora, pois o cálcio, ao sair do tecido, se deposita no fundo do frasco (Figura 5).
- 4- A mistura descalcificadora deve ser substituída a cada 24 horas. O tempo de descalcificação dependerá das dimensões da peça e do tipo de solução descalcificadora.
- 5- Ao término da descalcificação, deve-se neutralizar, os tecidos com uma solução alcalina de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% por 24 horas.
- 6- Lavar com vários banhos de água por um período de 48 horas.
- 7- Seguir a rotina de processamento histológico.

Figura 5. Suspensão dos tecidos durante a descalcificação.



B. Descalcificação por resinas de troca iônica

Essa resina promove a aceleração do processo de descalcificação pela rápida troca iônica entre o ácido fórmico e os fosfatos ou carbonatos de cálcio tecidual, proporcionando, além da rapidez, boa preservação dos detalhes

celulares, com qualidade superior aos métodos de descalcificação por ácidos. Essa resina pode ser reaproveitada.

Resina :

WIN 3000 (resina de troca iônica)..... 100 g
Ácido fórmico em solução aquosa a 10%800 mL

Figura 6. Resina de troca iônica.



C. Métodos histoquímicos

São métodos escolhidos quando se deseja preservar enzimas (fosfatase alcalina e desidrogenases), ácidos nucleicos e polissacarídeos (glicogênio) presentes no tecido ósseo. Os métodos habituais que utilizam descalcificadores ácidos não permitem a análise dessas moléculas e substâncias.

Os métodos histoquímicos incluem dois procedimentos para a descalcificação.

• **Mistura de tampões** - nesse procedimento, os sais de cálcio são removidos do osso, quando imersos em solução tampão de citrato com pH 4,5. Uma desvantagem desse método é a inativação reversível da fosfatase alcalina, que se torna ativa após a neutralização com a solução de sódio barbital.

Procedimento para a descalcificação:

- 1- Fixar os tecidos em álcool 80% de 24 a 48 horas.
- 2- Descalcificar com a solução tampão (4°C) – o tempo de descalcificação varia de acordo com o tamanho da peça e seu grau de mineralização.
- 3- Lavar em água corrente e depois em água destilada.
- 4- Neutralizar em solução de sódio barbital a 37°C por 6 horas.
- 5- Lavar em água corrente por 6 horas.

Tampão ácido cítrico-citrato (pH 4,5):

Ácido cítrico 1N.....	50 mL
Citrato de amônio 1N.....	50 mL
Sulfato de zinco 1%.....	2 mL
Clorofórmio.....	0,1 mL

• **Agentes quelantes** - são compostos orgânicos que se ligam ao íon cálcio (metal, ver tabela periódica) formando um metal quelado, por exemplo, sequestrante ou versene (ácido etilenediaminetetracético ou EDTA). Esse método é bem lento, sem dano ao tecido. Assim, como as misturas de tampões, ele inativa a fosfatase alcalina, que é reativada após um banho de 2 a 6 horas em solução de cloreto de magnésio 6%. A descalcificação por agentes quelantes não produz artefatos durante a maioria das colorações histológicas, diferente da descalcificação por ácidos, que gera artefatos quase irreversíveis.

Descalcificantes quelantes (EDTA)

EDTA neutro:

Sal de EDTA dissódico.....250 g
Água destilada.....1.750 mL

A solução fica esbranquiçada e deve ser neutralizada (pH=7,0) pela adição de aproximadamente 25g de hidróxido de sódio.

Hilleman e EDTA de Lee:

Sal de EDTA dissódico.....5,5 g
Água destilada.....90 mL
Formaldeído comercial.....10 mL

Solução descalcificadora EDTA em Tampão Fosfato 0,1M:

1) Tampão fosfato 0,1 M para o preparo final da solução descalcificadora de EDTA:

Tampão fosfato 0,1 M (pH=7,0):

Solução A:

Fosfato monobásico de sódio.....13,7g
Água destilada.....1 L

Solução B:

Fosfato dibásico de sódio.....35,8g
Água destilada.....1 L

Para 1 litro coloca-se em um béquer 750 mL da solução B e adiciona-se gota a gota a solução A até o pH atingir o pH 7,0.

Solução de uso do descalcificador EDTA em tampão fosfato 0,1 M:
 EDTA.....100 g
 Tampão fosfato 0,1 M (solução 1)..... 1000 mL
 Acertar o pH do EDTA para 7,0 com hidróxido de sódio 10 M

Procedimento:

- 1- Suspender o espécime no líquido (Figura 5) descalcificador, com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça.
- 2- Trocar a solução descalcificadora diariamente. Se possível, manter o frasco em agitação.
- 3- Testar após duas a três semanas, para ver se já ocorreu a descalcificação.
- 4- Lavar em água por algumas horas.
- 5- Proceder ao processamento histológico.

Descalcificação física

A. Descalcificação eletrolítica ou ionização elétrica

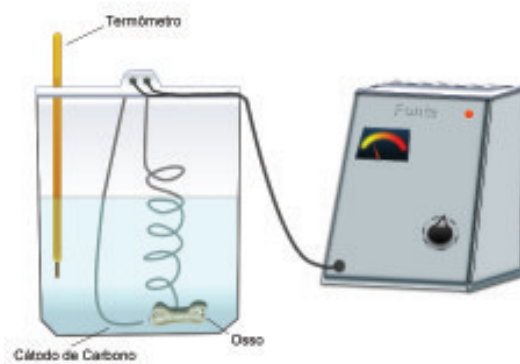
Esse método permite a formação de um campo elétrico entre dois eletrodos, fazendo os íons de cálcio migrarem rapidamente do osso (anodo) para o eletrodo de carbonato (catodo). Os radicais ácidos migram para o anodo.

É um método rápido; porém, a temperatura não deve exceder 45°C. Após a descalcificação, recomenda-se a neutralização das peças, com solução sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% por 24 horas, para evitar a formação de artefatos durante a coloração. Após a neutralização, as peças devem ser lavadas em vários banhos de água por no máximo 48 horas.

Solução descalcificadora eletrolítica:

Ácido fórmico a 90%	100 mL
Ácido clorídrico.....	80 mL
Água destilada.....	820 mL

Figura 7. Descalcificação eletrolítica.



B. Descalcificação com auxílio das micro-ondas

O efeito benéfico do calor foi reconhecido antes da era das micro-ondas e foi primeiramente utilizado durante o procedimento de fixação por Ehrlich (1898) para acelerar a fixação química por meio de calor externo.

As micro-ondas penetram vários centímetros para dentro dos tecidos biológicos, e o calor produzido pode ser controlado pela potência e o tempo de exposição. O calor é o principal responsável pelos efeitos produzidos pelas micro-ondas, assim como a agitação molecular e o fluxo eletromagnético, acelerando o processo de descalcificação. Durante o aquecimento, a energia termal aumenta a dinâmica molecular, na qual a agitação molecular induzida pela oscilação do campo eletromagnético aumentará a colisão de moléculas, acelerando as reações químicas. Esse método reduz o tempo de descalcificação; o que normalmente levaria dias, nesse método levará somente algumas horas.

Deve-se imergir a peça na mistura descalcificadora de escolha e irradiar as micro-ondas.

C. Descalcificação com auxílio do ultrassom

Assim como as micro-ondas, o ultrassom acelera o processo de descalcificação, promovendo a agitação molecular, com a vantagem de não elevar a temperatura, mantendo as estruturas celulares.

Como é possível saber se a peça está totalmente descalcificada?

Existem métodos físicos e químicos que permitem controlar o momento de finalização da descalcificação.

Métodos físicos

- Manipulação do operador: tenta-se dobrar a peça ou inserir uma agulha bem fina e verificar, assim, o grau de mineralização.
- Teste radiológico: o raio-X é o método mais sensível e confiável para acompanhar a descalcificação.

Métodos químicos

- Teste do oxalato de amônia: esse método detecta a presença de cálcio no líquido descalcificador, indicando se a descalcificação está completa ou não.

Teste do oxalato de Amônia / Hidróxido de Amônia:

Soluções estoque:

Solução A – solução estoque de hidróxido de amônia 5%:

Hidróxido de amônia 28%.....5 mL
Água destilada.....95 mL

Solução B – estoque de oxalato de amônia 5%:

Oxalato de amônia.....5 mL
Água destilada.....95 mL

Solução de uso de oxalato de amônia / hidróxido de amônia

Solução A – solução estoque de hidróxido de amônia 5% - 5 mL

Solução B – solução estoque de oxalato de amônia 5% - 5 mL

A solução deve ser preparada no momento do uso.

Procedimento:

- 1- retirar 5 mL de líquido descalcificador do fundo do frasco que em se encontra a peça;
- 2- colocar em um tubo Falcon de 15 mL;
- 3- adicionar ao tubo 10 mL da solução de uso de oxalato de amônia-hidróxido de amônia;
- 4- misturar bem e deixar repousar em pé por 12 horas;
- 5- se a descalcificação for completa, o líquido se manterá límpido; caso contrário, haverá precipitação do cálcio;
- 6- esse processo deve ser repetido até que o líquido descalcificante se encontre límpido por dois dias.

Muitos inconvenientes podem ser gerados durante o processo de descalcificação e, para minimizá-los, devemos tomar alguns cuidados

Regras gerais para uma boa descalcificação:

- somente descalcificar tecidos muito bem fixados;
- reduzir ao máximo o tamanho da peça a ser descalcificada, reduzindo assim o tempo de descalcificação;

- a lavagem do material é essencial antes da descalcificação e antes do processamento subsequente;
- renovar o descalcificador diariamente, pois esse vai perdendo sua concentração original;
- o volume do líquido descalcificador deve ser no mínimo vinte vezes o tamanho da peça;
- verificar constantemente se a descalcificação foi finalizada;
- neutralizar sempre os tecidos após a descalcificação por substâncias ácidas.

Notas de biossegurança

Ao manipular soluções ácidas e agentes quelantes, deve-se fazer uso de luvas específicas para manipulação química, de máscara com filtro próprio para vapores ácidos e orgânicos, e deve-se fazê-lo em local arejado e com exaustão. O preparo dessas soluções deve ser feito em capela de exaustão. Deve-se, previamente, consultar as fichas de emergência química das soluções ácidas e quelantes antes da sua manipulação. A inalação destes compostos pode causar irritação e queimaduras.

Nunca descarte soluções ácidas em esgoto sanitário convencional, procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

3. Processamento

O princípio do processamento histológico consiste na difusão de reagentes para o interior dos tecidos e na remoção do líquido tecidual que, após a fixação do material, é o próprio fixador empregado.

O processamento tecidual também torna os fragmentos rígidos capazes de proporcionar o seccionamento de fatias finas e delicadas para a observação ao microscópio.

Diversas substâncias podem ser utilizadas como meio de inclusão; porém, no processamento convencional, comumente se utiliza a parafina.

O processamento para inclusão de material em parafina passa por três etapas: desidratação, clarificação e impregnação.

A. Desidratação

A desidratação consiste na remoção da água dos tecidos, pois as substâncias previamente utilizadas para inclusão em parafina não se combinam homogeneamente com a água.

Vários são os agentes desidratantes. A substância utilizada na rotina histológica é o álcool etílico, por produzir bons resultados e possuir baixo custo. Contudo, outros agentes desidratantes também são eficientes, variando apenas o tempo de desidratação.

B. Clarificação ou diafanização

A clarificação visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos, preparando-os para as etapas subsequentes. A remoção do álcool é de extrema importância, pois a parafina não se mistura homogeneamente com o álcool. Dessa forma, é fundamental a completa remoção do álcool para que a parafina possa penetrar completamente no interior dos tecidos.

Para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina utiliza-se, nessa etapa, o xilol. Conforme o xilol penetra o tecido, em substituição ao álcool, o material se torna mais claro, transparente. Por essa razão, essa etapa é denominada clarificação.

C. Infiltração em parafina

A infiltração dos elementos teciduais em parafina é importante, pois a parafina também é o meio de inclusão tecidual. Para a infiltração, ela deve ter

sido previamente aquecida, pois a parafina é líquida somente em temperatura entre 56°C a 60°C, sendo sólida à temperatura ambiente.

Os tecidos também podem ser infiltrados por outros meios de inclusão, necessitando de processamentos especiais dependendo do meio de inclusão.

Meios de inclusão como polietilenoglicol (carbowax), resinas hidrofílicas e hidrófobas, gelatina, dentre outros, funcionam como meios alternativos de inclusão dependendo do objetivo da análise.

O processamento dos tecidos possui variáveis que podem afetar consideravelmente os resultados do processo histológico. Dentre as variáveis, temos: condições de operação (manual ou equipamentos automático), temperatura, características e concentração dos reagentes utilizados e as propriedades químicas dos tecidos.

- **Processamento manual** (Figura 9)

Limitaremos aqui a descrição para material destinado a inclusão em parafina.

Desidratação

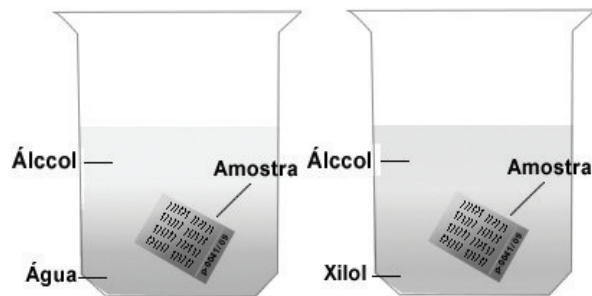
Para a desidratação adequada, é necessário que o volume do álcool seja vinte vezes o volume da amostra. Contudo, sendo a água mais densa do que o álcool, ela tende a se localizar no fundo do frasco após a sua retirada do tecido, exatamente onde a amostra se encontra (Figura 8).

Para que a desidratação seja satisfatória e a água se acumule no fundo do frasco, recomenda-se:

- agitar constantemente o recipiente, para que a água se misture ao álcool;
- realizar várias trocas de álcool, pois a água será eliminada com o álcool desprezado;

- usar recipientes de fundo largo para diminuir o nível de água;
- nunca aquecer o álcool, pois, além de ser perigoso, o meio ficará hidratado mais facilmente.

Figura 8. Material sendo desidratado e clarificado.



Clarificação

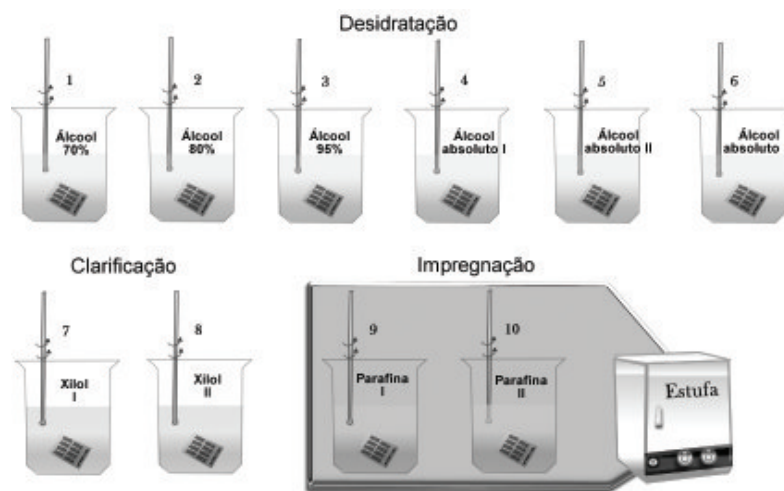
Apesar de as substâncias diafanizadoras serem insolúveis em água e solúveis no álcool, que é removido da peça durante a clarificação, deve-se tomar algumas precauções:

- agitar o frasco para melhorar a difusão (saída do álcool e entrada do xilol); antigamente, esse procedimento seria reprovado, pois como o álcool é menos denso do que a água, ele ficaria na superfície do frasco e não estaria em contato com a peça (Figura 8);
- proceder, no mínimo, a duas trocas com a substância clarificadora;
- não deixar o material por muito tempo em xilol, pois ele resseca muito o material, interferindo na sua qualidade.

Impregnação

A impregnação deve ser realizada em estufa a 60°C. Os fragmentos serão transportados de uma parafina a outra em intervalos de tempo predeterminados. Não se deve realizar somente uma passagem pela parafina, pois será insuficiente para remover todo o xilol dos tecidos. Contudo, recomenda-se nunca deixar o material permanecer na parafina por muito tempo, pois como a parafina somente é líquida em temperatura alta, o calor em um longo período de tempo poderá causar grande dano ao tecido.

Figura 9. Processamento manual de tecidos.



• Processamento automático

Existem dois tipos de equipamentos automáticos (processadores) acessíveis no mercado e que são também chamados histotécnicos ou autotécnicos.

Um tipo de processador é o carrossel (Figura 10), mais tradicional e de baixo custo, no qual os cassetes contendo os fragmentos são colocados em uma cesta que é transportada mecanicamente de forma a imergir os cassetes em cada reagente. Outro tipo possui uma câmara fechada, na qual

os reagentes são transferidos de recipiente a recipiente e, esses processadores automáticos, chamados processadores com transferência de fluidos. Ambos os equipamentos possuem doze estágios de processamento.

Alguns processadores estão acoplados a um sistema de vácuo (Figura 11) que, no do tipo carrossel, está no último banho de parafina. Nos processadores com transferência de fluidos, o vácuo pode ser incluído em todos os banhos do processo. Todo o processamento ocorre em vácuo, revelando significativa melhoria dos resultados em períodos de tempo reduzido, em comparação aos resultados obtidos no processamento sem vácuo.

É importante salientar que os recipientes com parafina para infiltração possuem termostatos que controlam a temperatura ideal de infiltração. Além disso, todos os processadores possuem agitação automática.

O trabalho com processadores automáticos é mais confiável, pois não ocorre falha humana durante o processamento. O técnico somente deve programar o aparelho e trocar os reagentes para obter um bom processamento do material. O protocolo de execução também é elaborado pelo próprio técnico e pode ser alterado a qualquer momento de forma simples e rápida.

Geralmente, os aparelhos são programados para trabalhar durante toda a noite e, no dia seguinte pela manhã, o material estará pronto para ser incluído. Outro fato considerado é quando se quer ganhar tempo na rotina laboratorial, pois se pode programar o equipamento para trabalhar durante feriados e finais de semana.

Figura 10. Processador de tecidos automático.



Figura 11. Sistema de vácuo.



Protocolos de processamento

Os protocolos de processamento variam de acordo com:

- as dimensões dos fragmentos do material a ser processado;
- tipo de reagentes utilizados;
- tipo do espécime biológico (material humano, de rato, de camundongo, entre outros);
- tipo de tecido;
- processamento automático ou manual;
- presença de vácuo.

Citaremos um dos protocolos utilizados para processamento de tecidos clivados com 3mm de espessura:

Passo	Estágio	Reagente	Duração
1	Desidratação	Álcool 70 %	1 h
2	Desidratação	Álcool 80 %	1 h
3	Desidratação	Álcool 90 %	1 h
4	Desidratação	Álcool 95 %	1 h

5	Desidratação	Álcool 100 %	1 h
6	Desidratação	Álcool 100%	1 h
7	Desidratação	Álcool 100%	1 h
8	Desidratação	Álcool 100%	1 h
9	Clarificação	Xilol I	1 h
10	Clarificação	Xilol II	1 h
11	Impregnação	Parafina I	1 h
12	Impregnação	Parafina II	2 h

Fatores que influenciam no processamento

- Temperatura;
- Vácuo;
- Agitação.

Notas de biossegurança

Todo material utilizado no processamento de tecidos é altamente inflamável. Use luvas, jaleco e máscara com filtro de proteção contra vapores orgânicos. Durante a manipulação dos reagentes, evite contato com o líquido e o vapor de xilol. Este elemento é tóxico para as vias aéreas. Quando inalado por tempo prolongado, pode causar a morte. Em caso de incêndio, extinguir com espuma, pó químico seco ou dióxido de carbono. O vapor de xilol é mais pesado do que o ar, exigindo capela com exaustão inferior. Não descarte os resíduos do processamento em esgoto sanitário comum, procure saber em sua instituição qual é a política de descarte de substâncias químicas.

4. Inclusão

A inclusão se baseia em colocar, com o auxílio de uma pinça previamente aquecida, os tecidos que foram previamente infiltrados em parafina no interior de um molde que já contém parafina líquida com a superfície a ser seccionada (a ser cortada ao micrótomo) para baixo (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Os fragmentos devem ser colocados na parafina enquanto aquecidos, evitando-se a formação de bolhas de ar em torno deles. Após o resfriamento, os blocos de parafina com o material incluído são obtidos.

Para se realizar uma boa inclusão, é necessário que o fragmento esteja completamente desidratado, clarificado e corretamente impregnado.

Quando se observa que uma dessas etapas não foi corretamente efetuada (observando áreas opacas ou esbranquiçadas no material), deve-se, nesse caso, retroceder o processamento executando-o da seguinte forma:

- remover a parafina de infiltração com vários banhos do agente clarificador (xilol);
- após a completa remoção da parafina, proceder à remoção do xilol, passando o fragmento por várias trocas do agente desidratante (álcool), ou mesmo água, caso o tecido não tenha sido desidratado corretamente;
- em seguida, desidratar e clarificar novamente;
- infiltrar e incluir o material novamente em parafina.

É importante que logo após o término da infiltração seja efetuada a inclusão, evitando que o material se torne quebradiço e retraído pelo efeito da temperatura da parafina aquecida.

Figura 12. Central de inclusão.



Figura 13. Inclusão do material.

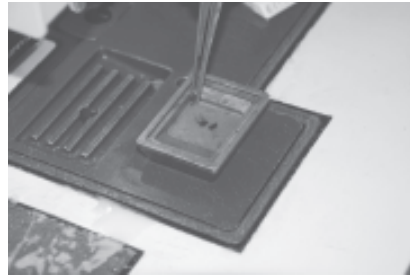
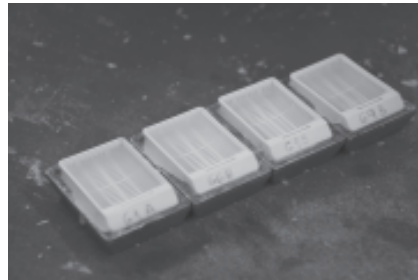


Figura 14. Coloração do suporte com identificação do tecido.



Figura 15. Blocos prontos para a microtomia.



Em alguns laboratórios de histologia, observa-se que o técnico remove os fragmentos da parafina de infiltração e deixa-os esfriar até o momento da inclusão. Esse comportamento está totalmente errado. O fragmento, ao ser novamente submetido à ação da temperatura elevada (56-58°C), pode ter sua textura consideravelmente prejudicada pelo calor. Assim, devemos incluir o fragmento logo após o término da infiltração.

A temperatura da parafina de inclusão pode estar cerca de 5°C acima do ponto de fusão da parafina. Essa temperatura é necessária para que possamos manusear o fragmento dentro do molde, que por vezes é metálico e esfria rapidamente. No mercado existem aparelhos que possuem dispositivos que auxiliam no processo de inclusão, como tanques de acondicionamento da

amostra. Nesses equipamentos, o termostato permite o controle mais preciso da temperatura.

As centrais de inclusão (Figura 12) possuem normalmente duas placas, uma aquecedora para efetuar a inclusão, e outra refrigerada para resfriar os moldes com as amostras incluídas. Essas centrais também possuem um local para aquecimento das pinças que serão utilizadas durante a inclusão. Esses aparelhos facilitam o procedimento da inclusão, principalmente por manterem a mesma temperatura de infiltração em todos os tanques e placas, diminuindo consideravelmente o tempo gasto com a inclusão propriamente dita.

Dependendo do fabricante, alguns produtos, ao serem adicionados à parafina de inclusão, alteram a sua consistência, tornando-a mais macia ou mais densa. A mudança de consistência deve ser avaliada, pois sua consistência é um fator importante na microtomia. Dentre as substâncias que podem ser adicionadas à parafina, têm-se: cera de abelha, estearina, cera de carnaúba, dietileno glicol, dentre outras.

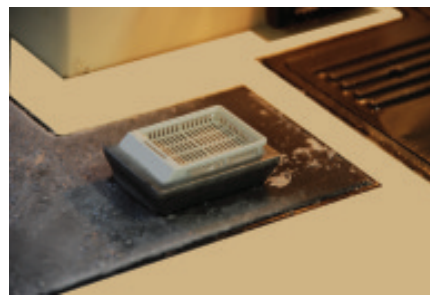
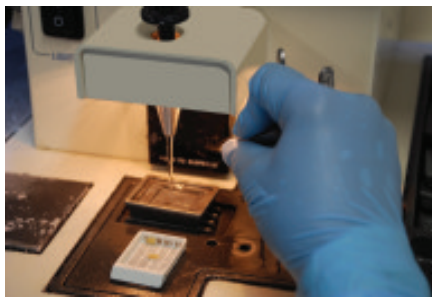
Outro fato a ser considerado é o uso de cassetes durante o procedimento até a inclusão. Os cassetes de plástico são aconselhados, pois permitem escrever, a lápis, o número de registro do material. Os cassetes também são importantes para a microtomia, pois podem ser adaptados ao micrótomo.

Procedimentos para inclusão (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17)

- Abrir o cassete e verificar o número de fragmentos contidos no cassete.
- Selecionar o molde a ser utilizado de acordo com as dimensões dos fragmentos a serem incluídos de maneira a sobrar cerca de 2 mm de parafina nas margens do bloco.
- Preencher o molde com parafina líquida pré-aquecida.
- Com o auxílio de uma pinça, selecionar o fragmento, sem deixá-lo esfriar, e colocá-lo no molde preenchido previamente com parafina.

- Colocar a base do cassete, ou suportes, sobre o molde de maneira que a parafina entre em contato com o cassete. Se para a inclusão não se utilizar o cassete, deve-se utilizar um papel para escrever a identificação do bloco.
- Levar o molde com o material incluído para a placa resfriada.
- Quando o molde começar a “suar”, é o momento certo de retirar o bloco do molde.

Figura 16. Procedimento de inclusão. Figura 17. Molde com material que foi incluído.



Orientação dos fragmentos

A orientação dos fragmentos de órgãos no molde é um processo importante na confecção dos cortes e análise dos tecidos. Por exemplo, órgãos tubulares, como intestinos, devem ser incluídos no plano transversal; fragmentos de músculos também devem ser incluídos, considerando-se seus planos longitudinais e transversais. Ao se incluir um fragmento de pele, deve-se considerar a análise de suas estruturas básicas, isto é, a epiderme e a derme.

Pequenos fragmentos de tecidos podem ser incluídos paralelamente, enquanto fragmentos alongados são orientados longitudinalmente.

Para melhor compreensão do sentido desses materiais durante a inclusão, sugere-se que o técnico procure atualizar seu conhecimento básico sobre a

histologia, consultando a literatura especializada ou buscando orientação com o chefe ou pesquisador do setor.

Notas de biossegurança

A parafina é altamente inflamável, mantenha esta substância longe de chamas. Evite queimaduras, pois as placas e pinças utilizadas neste procedimento são aquecidas. A inclusão deve ser realizada em local arejado ou com exaustão. Os vapores de parafina são tóxicos às vias respiratórias.

5. Microtomia

Para permitir a análise dos tecidos ao microscópio de luz, eles devem ser seccionados em fatias bem finas e uniformes. A espessura ideal varia de acordo com o objetivo de estudo; recomenda-se a espessura de 4 a 6 μm na rotina dos laboratórios.

O instrumento capaz de confeccionar cortes com tal precisão é o **micrótomo** (Figura 18), sendo constituído por três partes: corpo, porta-bloco e porta-objeto. Considera-se, ainda, que em alguns modelos possua duas manivelas, uma manivela de ajuste e outra de corte.

Existem dois tipos de micrótomos: do tipo **rotatório**, também conhecido como do tipo Minot, em que o material, no porta-objeto, vai de encontro à navalha que está imóvel no porta-navalha; e o do tipo **corrediça**, que avança o porta-navalha e vai de encontro ao porta-objeto onde se encontra a amostra.

Encontram-se à venda no mercado diversos modelos dos dois tipos de micrótomo, podendo ser automáticos ou manuais. Muitos micrótomos foram desenvolvidos para confeccionar cortes a partir de blocos de parafina, outros, para realizar cortes congelados, e há ainda aqueles micrótomos específicos para a microscopia eletrônica, chamados ultramicrótomos, capazes de confeccionar cortes ultrafinos. A título de conhecimento geral, iremos descrever alguns destes modelos.

Figura 18. Micrótomo.



Micrótomos

- *Micrótomo rotativo* – ou modelo Minot: são instrumentos pequenos e mais utilizados para microscopia de luz para tecidos incluídos em parafina.
- *Criostato*: é utilizado para confeccionar cortes de tecidos que foram congelados. Esse equipamento consiste de um micrótomo rotatório acondicionado dentro de uma câmara frigorífica com temperatura abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 19).

Figura 19. Criostato.



- *Micrótomo de corredeira*: é indicado quando os blocos contêm fragmentos grandes, podendo ser utilizado para bloco de gelatina ou parafina. É um micrótomo muito pesado, o que evita qualquer tipo de vibração mecânica. Muito utilizado para a confecção de cortes de tecido nervoso.
- *Micrótomo de congelação*: esse tipo de micrótomo é usado para cortes de material fresco congelado. O sistema desse micrótomo é igual ao do micrótomo de corredeira, em que a navalha é que se move em direção à amostra, que permanece imóvel. É equipado com um cilindro de dióxido de carbono líquido que congela as amostras de tecidos e a navalha. Esse tipo de micrótomo é muito utilizado em centros cirúrgicos para um diagnóstico rápido.
- *Ultramicrótomo*: é utilizado para confeccionar cortes de material incluído em resinas acrílicas ou epoxi. Esse equipamento permite seções semifinas (com espessura em micrômetros) de pequenas amostras para microscopia de luz, e ultrafinas (com espessura em nanômetros) em microscopia eletrônica. O ultramicrótomo vem adaptado com suporte para navalhas de vidro para a confecção de cortes semifinos, e suportes para facas de diamante ou safira, utilizadas para confeccionar cortes ultrafinos. É um micrótomo automático que possui um controle de operação mecânica.
- *Micrótomo do tipo serra*: é um micrótomo especial utilizado para cortar ossos calcificados, vidros ou cerâmicas. As amostras incluídas em resinas são movidas contra uma serra de diamante.
- *Micrótomo vibratório*: é utilizado para fazer seções de tecidos frescos de material não fixado, ou tecidos moles; também é utilizado para a obtenção de cortes de tecidos vegetais. O nome do micrótomo deriva do fato de ele possuir um sistema de alta vibração da navalha para cortar o tecido. Diferentes graus de vibrações podem ser produzidos para cortar os tecidos de diferentes densidades.

Notas de biossegurança

Utilize luvas ao cortar em criostatos, e lembre-se de que no caso de material congelado, os espécimes não estão fixados.

Navalhas (ou “facas”)

Existe uma variedade de navalhas disponíveis no mercado, variando de qualidade conforme o grau de dureza do material, o meio de inclusão ou o tipo de micrótomo.

- *Navalhas de aço*: são fabricadas com aço de alta qualidade. A superfície de corte do aço não deve possuir impurezas e nem ser revestida por substâncias anticorrosivas. Essas navalhas são tradicionalmente usadas para microtomia de material incluído em parafina.
- *Navalhas de aço para criostato*: são navalhas mais resistentes e totalmente livres de impurezas, contendo ainda 12% a 15% de material cromado ou de teflon, pois não oxidam na presença de água e oferecem maior durabilidade.
- *Navalhas descartáveis*: possuem adaptadores próprios, além de produzirem cortes de alta qualidade por não comprimirem os tecidos e permitirem cortes sequenciais, denominados cortes em fita. Essas navalhas são confeccionadas em platina ou material cromado para prolongar o uso do gume ou fio da navalha muito afiado. Para confecção de cortes incluídos em parafina, são comercializadas navalhas descartáveis de alto e baixo perfil; as navalhas de alto perfil servem para microtomia de tecidos mais sólidos, enquanto as de baixo perfil servem para cortar tecidos mais delicados.

As navalhas descartáveis são recomendadas por possuírem custo menor em relação às de aço, além de dispensarem a utilização de equipamentos, como afiadores automáticos, que são muito caros. Assim, representam economia de tempo para o técnico, que não mais precisará amolar suas navalhas.

Existem também navalhas descartáveis de tungstênio para a execução de cortes de órgãos ou osso inclusos em resinas acrílicas.

Execução dos cortes

Com o auxílio de uma navalha bem afiada, um micrótomo bem aferido e um bloco contendo material condizentemente incluído, é possível iniciar a microtomia.

Material e equipamento necessário:

- micrótomo;
- pinça histológica com ponta curva;
- banho-maria;
- cuba com gelo;
- pincel (opcional);
- gaze;
- bloco de tecido;
- navalha bem afiada;
- suporte para lâminas;
- lâminas com adesivo;
- placa aquecedora (opcional);
- estufa a 58°C.

Procedimento para a microtomia (Figuras 20, 21, 22 e 23)

- 1- Fixar o bloco no micrótomo.
- 2- Colocar o maior eixo do bloco verticalmente ao fio (gume) da navalha. Se o órgão possuir cápsula, essa deve ficar no lado superior do bloco.
- 3- Acertar o bloco para que a sua superfície fique paralela à navalha.

- 4- Colocar no micrótomo uma navalha já utilizada (velha) para desbastar o bloco (retirar o excesso de parafina até se alcançar o material).
- 5- Aparar o bloco (desbastar).
- 6- Substituir navalha velha por nova e afiada.
- 7- Resfriar o bloco para endurecer mais a parafina e umedecer a superfície do tecido. Pode-se utilizar um cubo de gelo, o qual deve ter a superfície lisa para entrar em contato com a superfície do material.
- 8- Secar a navalha e o bloco com cuidado para não atingir o fio da navalha nem causar ranhuras.
- 9- Efetuar a microtomia propriamente dita, obtendo os cortes com o auxílio de uma pinça, a qual auxilia na manipulação da fita formada.
- 10- Retirar a fita do micrótomo, com o auxílio da pinça, e transportá-la para o banho-maria, para realizar a distensão dos cortes. A temperatura do banho-maria deve estar em torno de 40°C para que os cortes se distendam sobre a superfície da água, evitando-se a formação de “pregas”. Pode-se, também, após a execução dos cortes, colocá-los em banho-maria em temperatura ambiente e distendê-los em placa aquecedora com a temperatura em torno de 40 °C a 45 °C.
- 11- Se o tecido formar dobras, ainda no banho-maria, elas devem ser removidas com o auxílio de uma pinça curva, pois tais dobras interferem na análise histológica.
- 12- Coletar o corte com lâmina limpa e adesivada.
- 13- Transferir a lâmina com o corte para uma placa aquecedora.
- 14- Levá-la à estufa aquecida a 60 °C para retirar o excesso de parafina e melhorar a adesão do corte a lâmina.

Figura 20. Microtomia de tecidos.

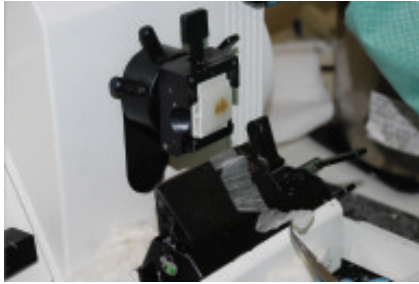


Figura 21. Distensão dos cortes em banho-maria.

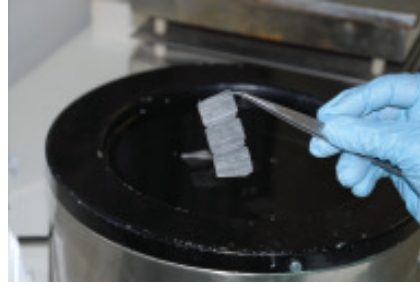


Figura 22. Coleta ou “pescagem” dos cortes.

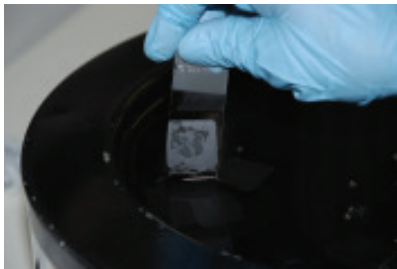
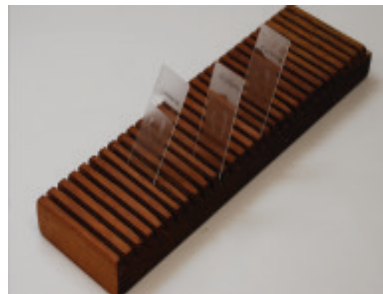


Figura 23. Lâminas em um suporte para secar.



Preparo prévio das lâminas

As lâminas devem ser muito bem limpas e desengorduradas para que os cortes não se desprendam da lâmina durante as etapas subsequentes.

- Marcação: as lâminas devem ser identificadas com o número de registro correspondente ao bloco, o que pode ser feito com lápis de diamante (permanente) ou lápis dermográfico.

Adesivos

Geralmente, como os cortes podem se soltar das lâminas durante a coloração, para evitar que se desprendam podem-se usar adesivos colocados antes da microtomia nas lâminas lavadas e secas.

Os adesivos mais usados são:

- albumina de Mayer;
- gelatina;
- celoidina
- polyisina (para imuno-histoquímica);
- silano (para técnicas imuno-histoquímicas, hibridização *in situ* e PCR).

Problemas que podem ocorrer durante a microtomia

A maioria dos artefatos observados nos cortes é causada por problemas com a navalha durante a microtomia ou durante o processamento. Vamos listar alguns dos problemas:

Problemas	Principais causas
1. Fitas de cortes curvas ou irregulares	<ol style="list-style-type: none"> 1. A navalha e o bloco não estão paralelos 2. O bloco de forma irregular de paredes não paralelas 3. Borda de corte da navalha irregular 4. Parafina misturada não homoganeamente ou impura
2. Cortes comprimidos, irregulares ou pregueados	<ol style="list-style-type: none"> 1. Faca mal afiada 2. Faca ou bloco quente 3. Ângulo irregular da navalha 4. Parafuso do micrótomo solto
3. Fragmentação dos cortes ou rasgados	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inclusão imperfeita 2. Parafina quente demais durante a infiltração ou inclusão

4. Arranhaduras nos cortes ou cortes divididos em segmentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Parafina suja (não filtrada durante a inclusão) 2. Sujeira no molde de inclusão 3. Sujeira no bloco ou na navalha 4. Dente na faca
5. Os cortes que se aderem no bloco ao subir o braço do micrótomo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ângulo da navalha grande demais 2. Borda da faca suja 3. Faca sem fio 4. Borda do bloco suja de parafina
6. Espessura desigual no mesmo corte, lembrando veneziana	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tecido duro demais 2. Parafuso solto 3. Bancada do micrótomo com vibração 4. Tecido “queimado” durante a infiltração ou inclusão
7. Enrolamento dos cortes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Parafina muito dura 2. Navalha cega 3. Ângulo incorreto da navalha
8. Fragmentação do tecido durante a microtomia ou separação do tecido do bloco de parafina	<ol style="list-style-type: none"> 1. O álcool ou o clarificador não foram completamente removidos 2. Parafina de infiltração ou inclusão muito quente 3. Excessiva clarificação do tecido 4. A infiltração foi insuficiente
9. Cortes aparecem alternadamente finos e grossos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bloco grande demais 2. Parafusos soltos 3. Ângulo da faca pequeno demais

Notas de biossegurança

Uma causa frequente de acidente em laboratórios de histotécnica é a falta de atenção na manipulação de navalhas durante a confecção do corte. A microtomia deve ser realizada em local calmo, onde o técnico possa se concentrar exclusivamente no seu trabalho. Muito cuidado ao descartar as navalhas. Utilize sempre caixas de descarte especial para perfurocortantes. Lembre-se de que os funcionários do setor de limpeza podem se acidentar com navalhas descartadas indevidamente.

6. Coloração dos tecidos

A utilização de corantes é fundamental para visualizar os tecidos ao microscópio de luz. Após a microtomia, as células e o material extracelular são habitualmente transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas teciduais.

Os corantes aplicados para corar tecidos que foram previamente fixados são chamados corantes não vitais, como a hematoxilina, eosina, fucsina, entre outros.

Podemos também corar células em cultura ou células de organismos ainda vivos; nesse caso, é necessária a utilização de corantes chamados vitais, que não causam danos às células e também não interferem no metabolismo celular. Dentre eles, temos: o azul de tripan, verde janus B, vermelho tripan, azul de metileno, vermelho neutro, entre outros.

Para compreender os conceitos básicos sobre colorações, devemos conhecer algumas definições importantes.

O que são corantes?

Os corantes (Figura 24) são compostos orgânicos, aromáticos e ionizáveis, fundamentalmente baseados na estrutura do benzeno. Contudo, esses corantes

são incolores e necessitam da adição de novos grupos químicos à sua estrutura chamados **cromóforos** ($C=O \rightarrow$ cetona, $C=N \rightarrow$ carboamínico, $N=N \rightarrow$ azoico, $N=O \rightarrow$ nitroso, $NO_2 \rightarrow$ nitro e $C=C \rightarrow$ etileno). Quanto mais cromóforos em um corante, mais intensa será a sua cor.

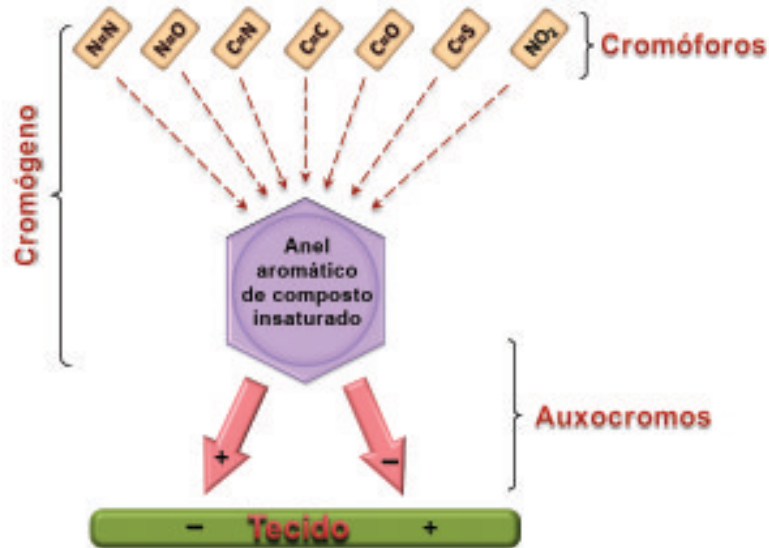
A união do cromóforo aos compostos aromáticos constitui os **cromógenos**, compostos benzênicos contendo grupamentos cromóforos. Para que o corante se ligue especificamente aos elementos tissulares, é necessário que um grupo auxiliar do corante, denominado **auxocromo**, se ligue ao cromógeno. O auxocromo determina o caráter ácido ou básico do corante. As aminas básicas ($-NH_2$) e os grupos hidroxila ácidos ($-OH$) são exemplos de auxocromos.

Simplificando:

Corantes são compostos orgânicos aromáticos formados pelo cromógeno e auxocromo e coram seletivamente os componentes teciduais, como as células e a matriz extracelular. De acordo com a carga iônica, os corantes podem ser ácidos, básicos ou neutros.

- **Corantes ácidos:** possuem auxocromo aniônico (carga elétrica negativa (-)), com afinidade por componentes básicos do tecido (catiônico (+)). As estruturas coradas pelos corantes ácidos são chamadas **acidófilas**, como, por exemplo, o citoplasma e matriz extracelular. Um exemplo de corante ácido é a eosina.
- **Corantes básicos:** possuem auxocromo catiônico (+) com afinidade por componentes ácidos dos tecidos (aniônico (-)). As estruturas coradas pelos corantes básicos são chamadas **basófilas**, como o núcleo. A hematoxilina é um exemplo clássico de corante básico.

Figura 24. Esquema da associação do corante com os tecidos.



Os corantes podem ser naturais ou sintéticos (artificiais), sendo também chamados corantes biológicos, por revelar estruturas biológicas dos tecidos.

- **Naturais:** hematoxilina, índigo, orceína, brasilina, entre outros.
- **Artificiais:** são aqueles derivados do benzeno.

As colorações podem ser classificadas segundo a **ação** do corante, o **tempo** de coloração e a sua **cromatização**.

Para compreender essa caracterização, é necessário conhecer a definição de dois termos da técnica histológica: o *mordente* e a *diferenciação*.

Mordente: é um elemento, metal ou íons de metal, que se liga covalentemente ao corante e facilita a ligação do corante ao tecido. O mordente é empregado para reforçar a ação dos corantes e tornar as colorações mais seletivas, podendo ser usado antes, durante (adicionado à solução corante) ou após a utilização do corante.

Diferenciação: esse termo se refere à remoção do excesso de corante do tecido, descorando seletivamente determinada estrutura e melhorando a sua visualização.

As colorações podem ainda se caracterizar segundo a:

A. Ação

- **Diretas:** quando o corante penetra no interior dos tecidos sem tratamento intermediário com mordente.
- **Indiretas:** quando é necessário um tratamento intermediário com uma solução mordente para o corante se ligar ao tecido durante a coloração.

B. Tempo

- **Progressiva:** a coloração é feita gradualmente sem a necessidade de se proceder à sua diferenciação, isto é, que seja retirado o excesso do corante.
- **Regressiva:** hipercora-se o tecido e posteriormente remove-se seu excesso pela diferenciação para melhor visualização dos elementos teciduais.

B. Cromatização

Depende da quantidade de corantes utilizados durante a execução de uma determinada técnica de coloração.

- **Monocrômica** = 1 cor.
- **Bicrômica** = 2 cores.
- **Tricrômica** = 3 cores.
- **Policrômica** = mais de 3 cores.

Após os comentários apresentados, deve-se ainda aprofundar alguns conhecimentos sobre a coloração.

Após a microtomia, o preparado histológico está pronto para ser corado. Deve-se, inicialmente, utilizar uma coloração que proporcione uma visão geral de todo o tecido de modo a permitir a identificação dos elementos teciduais, propiciando o diagnóstico histológico. A coloração pela hematoxilina (H) e pela eosina (E) cumpre muito bem esse papel. Nessa coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados em rosa. Havendo a necessidade de se identificar certos elementos teciduais específicos, empregam-se técnicas histoquímicas especiais.

Há diversos métodos especiais de coloração que propiciam uma melhor identificação de determinados componentes teciduais. Por exemplo, a coloração pelo método tricromático de Masson, que utiliza corantes especiais, permite evidenciar tecido muscular e fibras colágenas; a coloração pela resorcina fucsina de Weigert demonstra fibras do sistema elástico; o azul de toluidina em pH ácido é uma coloração específica para mastócitos.

Outros métodos utilizados para identificação de elementos teciduais podem utilizar sais pesados a base de prata metálica e não corantes. Nessa categoria podem-se citar o método da reticulina de Gomori, que identifica especificamente as fibras reticulares do tecido conjuntivo, sendo o método de Grocott específico para fungos, e o método de PAMS, específico para membrana basal.

Em determinadas colorações histoquímicas, certas substâncias, ao se combinarem com o tecido, formam uma nova substância, e essa ligação pode ser irreversível. Essa é a base da coloração com o azul da Prússia (ou Perls) e do método que utiliza o ácido periódico associado ao reativo de Schiff (PAS). Na coloração com o azul da Prússia, devido à ação do ácido clorídrico, o ferro

conjugado às proteínas é ionizado e evidenciado após reação com o ferrocianeto de potássio. O resultado dessa reação produz um precipitado azul e insolúvel de ferrocianeto férrico.

Na reação do método do PAS, o ácido periódico oxida os grupos hidroxila vicinal dos hidratos de carbono do glicogênio, mucoproteínas e glicoproteínas, os quais são convertidos a grupamentos aldeídicos, de modo que a cadeia polissacarídica se transforma numa cadeia polialdeídica. Os compostos aldeídos se combinam com o reagente de Schiff, que é incolor, e esse complexo formado revela-se como um composto colorido.

As colorações histológicas de rotina e especiais, quando surgiram na patologia clássica, constituíram uma grande revolução e avanço na metodologia de estudo da célula, fornecendo subsídios importantes para a análise dos tecidos, e representam o ponto de partida para o uso de técnicas mais modernas incorporadas à rotina de investigação.

A seguir, encontram-se algumas sugestões de técnicas histoquímicas.

Para evidenciar	Células
Núcleo e citoplasma	HE, Feulgen, Papanicolau, Shorr, Giemsa, azul de toluidina, metil green-pironina
Melanócitos	Fontana-Masson
Células do tecido nervoso	Violeta cresil, azul de toluidina, Golgi (Prata)
Secreções celulares	PAS, PAS alcian blue pH 1,0 ou 2,5
Mastócitos e eosinófilos	AB-safranina, Geimsa, azul de toluidina, sirius red em pH 10,2

Para evidenciar	Elementos da matriz extracelular
Glicoproteínas neutras	PAS
Proteoglicanos	PAS-alcian blue em pH 1,0 ou pH2,5
Glicoproteínas não colagenosas	PAMS, reticulina
Elementos fibrosos à base de colágenos	Tricomática de Masson, tricomática de Gomori, picrossirius red
Fibras do sistema elástico	Resorcina fucsina de Weirger

Para evidenciar	Tecidos específicos
Tecido conjuntivo	Tricomática de Masson, tricomática de Gomori, Goldner, picrossirius red, reticulina de Gomori
Tecido linfoide e mieloide	Giemsa, reticulina de Gomori
Tecido adiposo	Sudan black
Tecido muscular	Colorações tricromáticas, azul de toluidina
Tecido cartilaginoso	Colorações tricromáticas, PAS - alcian blue em pH1,0 ou pH 2,5

Para evidenciar	Micro-organismos
Fungos de forma geral	Grocott e PAS
<i>Treponema pallidum</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	Warthin-Starry, Giemsa
<i>Mycobacterium leprae</i>	Método de Fite, Wade, Kinyoun
<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoebahistolytica</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>	Giemsa, HE, leishman, PAS, hematoxilina férrica, Feulgen
Helmintos	HE
Inclusões virais	HE
Criptococcus	Mucicarmin, PAS, prata metenamina

Considerações importantes

Geralmente as estruturas teciduais são visualizadas na mesma cor, ou muito semelhante em tom ao do corante utilizado. Essa propriedade é conhecida como **ortocromasia**. Porém, em alguns casos, certos elementos teciduais, ao serem visualizados após a sua interação com o corante, exibem uma cor distinta do corante. Esse fenômeno é designado **metacromasia**. Algumas técnicas de coloração podem demonstrar a metacromasia, como a coloração pelo azul de toluidina em condições específicas, que evidencia em magenta os grânulos dos mastócitos e os proteoglicanos da matriz cartilaginosa.

Procedimentos gerais para colorações

Antes de iniciar qualquer coloração, devemos nos lembrar de que, após a microtomia, os cortes dos tecidos estão impregnados pela parafina, que precisa ser removida para que os corantes penetrem e se combinem com os elementos teciduais.

O procedimento geral para qualquer coloração é o seguinte:

- *Desparafinização*: visa à retirada da parafina dos cortes após a microtomia. Esse procedimento é realizado com o auxílio do xilol, a mesma substância utilizada para a clarificação dos tecidos durante o processamento para a confecção do bloco contendo o fragmento do material a ser analisado.
- *Hidratação*: é realizada por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, ou seja, álcool 100%, 95%, 80%, 70%, até a água destilada. Cabe ressaltar que a maioria dos corantes se encontra diluída em água, devendo o último banho ser com água. Porém, quando se utiliza um corante alcoólico, deve-se interromper a hidratação em álcool 70%.
- *Coloração*: é a imersão propriamente dita dos cortes no corante, favorecendo a combinação de suas estruturas com o corante para posterior visualização em microscópio de luz.
- *Desidratação*: retira a água do tecido, pois os meios de selagem não são miscíveis em água, e são necessários para a confecção dos preparados histológicos permanentes. Assim, utiliza-se com concentrações alcoólicas crescentes: álcool 70%, 80%, 95% e 100%.
- *Clarificação*: utiliza-se o xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meio de selagem.
- *Selagem* ou *montagem da lâmina* propriamente dita: é a etapa final da preparação da lâmina para análise ao microscópio de luz. Essa etapa consta em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula (selagem).

Protocolos de coloração para os tecidos

• Coloração pela hematoxilina mayer e eosina-floxina

Soluções:

A) Hematoxilina de Mayer (Mayer, 1903):

Hematoxilina.....	1 g
Água destilada.....	1000 mL
Iodato de sódio.....	0,2 g
Alúmen de amônia ou potássio.....	50 g
Ácido cítrico.....	1 g
Hidrato de cloral.....	50 g

Dissolver a hematoxilina na água destilada agitando (aquecer um pouco até 60 °C). Acrescentar o iodato de sódio e o alúmen. Agitar até dissolver totalmente. Adicionar, então, o ácido cítrico e o hidrato de cloral. Deixar agitando para que todos os componentes se dissolvam totalmente. A cor final do corante é vermelho-violeta. O corante estará pronto para o uso imediato e poderá ser usado por cerca seis meses (no máximo), sem que ocorra o amadurecimento exagerado.

Nota técnica: existem vários tipos distintos de soluções para o preparo da hematoxilina, como a de Mayer, Harris, Delafield e Erlich. Esses tipos de soluções variam de acordo com o tempo de coloração, aplicação e composição química do corante. A hematoxilina de Harris é muito utilizada nos laboratórios de anatomia patológica por produzir bons resultados com um tempo curto de coloração. A hematoxilina de Mayer apresenta bons resultados, porém com um tempo maior de coloração. As hematoxilinas de Erlich e

Delafield são empregadas em tecidos ósseos que sofrerão a ação por descalcificadores contendo ácidos fortes. A seguir, serão descritos os métodos de coloração pela hematoxilina e eosina, utilizando a hematoxilina de Mayer e a de Harris.

B) Eosina-floxina:

1- Solução estoque de eosina 1% em água destilada.

2- Solução estoque de floxina 1% em água destilada.

3- Solução de uso de eosina-floxina:

Eosina 1% (solução estoque 1)..... 100 mL

Floxina 1% (solução estoque 2)..... 10 mL

Álcool etílico 95%..... 780 mL

Ácido acético glacial PA..... 4 mL

Procedimento:

1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.

2- Corar com a hematoxilina de Mayer durante 20 minutos¹.

3- Lavar em água corrente durante 25 minutos.

4- Começar a desidratação com álcool 70% durante 1 minutos.

5- Corar pela eosina-floxina durante 2 minutos.

6- Lavar rapidamente em álcool 95%.

7- Desidratar em 3 banhos de álcool absoluto por 1 minuto cada.

8- Clarificar em 3 banhos de xilol e selar.

Resultados: núcleos em azul e citoplasma em várias tonalidades de rosa.

¹ Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

Notas de biossegurança

Atenção, pois o xilol e o álcool são altamente inflamáveis. Use luvas nitrílicas, jaleco e máscara com filtro de proteção contra vapores orgânicos. Durante a manipulação dos reagentes, evite contato com o líquido e o vapor de xilol. Esse elemento é tóxico para as vias aéreas e, quando inalado por tempo prolongado, pode causar a morte. Em caso de incêndio, extinguir com espuma, pó químico seco ou dióxido de carbono. O vapor de xilol é mais pesado do que o ar, exigindo capela com exaustão inferior.

- **Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina-floxina**

Soluções:

A) Ácido-álcool a 1%:

Ácido clorídrico (HCl).....	1 mL
Etanol a 70%.....	99 mL

B) Água amoniacal:

Hidróxido de amônio (NH ₄ OH).....	2 a 4 mL
Água destilada.....	800 a 1000 mL

C) Carbonato de lítio saturado:

Carbonato de lítio (LiCO ₃).....	1,54 g
Água destilada.....	100 mL

D) Eosina-floxina (ver o método de hematoxilina de Mayer e eosina-floxina)

E) Hematoxilina de Harris (Harris, 1900):

Hematoxilina	5,0 g
Etanol a 100%.....	50,0 mL
Alúmen de potássio ou de amônio.....	100 g
Água destilada.....	1.000 mL
Óxido mercúrio (pó vermelho) (HgO).....	2,5 g

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente. Dissolva a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente, em recipiente separado. Lentamente, misture as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e, com cuidado, acrescente lentamente o óxido mercúrio, que faz com que a solução entre rapidamente em ebulição, podendo transbordar do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que adquira a cor púrpura-escura. Esfrie, e a solução estará pronta.

Para o uso:

Acrescente 20 mL de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos.

Filtre sempre antes de cada uso.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Corar com solução recém-filtrada de hematoxilina de Harris por 6 a 10 minutos².

² Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

- 3- Lavar em água de torneira por 5 minutos.
- 4- Diferenciar em álcool-ácido, com 1 ou 2 mergulhos.
- 5- Lavar rapidamente em água de torneira.
- 6- Colocar em solução fraca de água amoniacal ou de carbonato de lítio saturada até que os cortes fiquem azul-brilhantes.
- 7- Lavar completamente em água de torneira por 10 minutos.
- 8- Colocar em álcool etílico a 80% por 1 a 2 minutos.
- 9- Contracorar em solução de eosina-floxina por 2 minutos³.
- 10- Desidratar a partir do álcool 95%.
- 11- Desidratar com 3 banhos de álcool absoluto.
- 12- Clarificar em 3 banhos de xilol e selar.

Resultados:

Núcleos.....azul
Citoplasma.....róseo a vermelho
Demais estruturas tissulares.....róseo a vermelho

Nota de biossegurança: O óxido mercúrio é tóxico, venenoso e combustível (oxidante).

• **Método de coloração pelo Giemsa de Lennert (Lennert, 1978)**

Soluções:

A) Ácido acético 0,5%.

B) Álcool isopropílico.

³ Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

C) Álcool etílico 95%.

D) Xilol

E) Solução de Giemsa:

Giemsa Merck em solução estoque.....	20 mL
Água destilada.....	80 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.
- 2- Corar utilizando a solução de uso de Giemsa por 1 hora.
- 3- Diferenciar em ácido acético 0,5% - 3 mergulhos
- 4- Continuar a diferenciação em álcool etílico 95%, olhando sempre ao microscópio (o tempo varia de acordo com o tipo e espessura do tecido).
- 5- Desidratar em álcool isopropílico - 3 banhos, de 3 minutos cada.
- 6- Clarificar em xilol e selar.

Nota: A solução de Giemsa descora com o tempo; aconselha-se examiná-la e fotografá-la o mais rápido possível.

Resultados:

Citoplasma.....	rosa
Núcleos.....	azul
Hemácias.....	vermelho

Grânulos de mastócitos.....	púrpura
Bactérias.....	azul
Parasitas da malária.....	azul

• **Método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS)**
(McManus, 1946)

Soluções:

A) Ácido Periódico 0,5%.

B) Reagente de Schiff:

Fucsina básica.....	1 g
Metabissulfito de sódio ou bissulfito de sódio.....	2 g
Água destilada.....	200 mL
Ácido clorídrico 1 N.....	20 mL

Procedimento:

- 1- Dissolver em 200 mL de água destilada quente, 1 g de fucsina básica.
- 2- Deixar entrar em ebulição.
- 3- Esfriar até 50 °C.
- 4- Adicionar 2 g de metabissulfito ou dissulfito ou bissulfito de sódio anidro.
- 5- Filtrar.
- 6- Colocar uma pitada de metabissulfito de sódio anidro e em seguida adicionar 20 mL de ácido clorídrico 1 N.
- 7- Agitar, esfriar e guardar na geladeira em frasco âmbar ou envolvido em papel alumínio.

8- No dia seguinte, colocar uma pitada de carvão ativado e filtrar. O filtrado deve ficar branco ou cor-de-palha; caso contrário, deve-se colocar mais uma pitada de metabissulfito de sódio anidro e filtrar novamente.

C) Solução sulfurosa:

Solução estoque:

Metabissulfito de potássio ou bissulfito de potássio...	10 g
Água destilada.....	200 mL
Ácido clorídrico 1 N.....	10 mL

Solução de uso:

Solução estoque.....	6 mL
Água destilada.....	114 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Colocar as lâminas na solução de ácido periódico 1% por 15 minutos.
- 3- Lavar em água destilada por 5 minutos.
- 4- Corar pelo Schiff (guardado na geladeira e no escuro⁴), por 15 minutos à temperatura ambiente.
- 5- Colocar em três trocas de solução sulfurosa de uso durante 5 minutos cada e desprezar após o uso.

⁴ Envolver o vidro com papel alumínio.

- 6- Lavar em água destilada por 4 minutos.
- 7- Corar pela hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.
- 8- Lavar em água corrente durante 5 minutos.
- 9- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Membrana basal, mesângio, fibrina, muco, amiloide, coloide, de coloração rósea a vermelho púrpura.

• **Método de Gomori para fibras reticulares (Gomori, 1937)**

Soluções:

A) Solução de permanganato de potássio 1%.

B) Solução de ácido oxálico 3%.

C) Solução de alúmen de ferro 2%.

D) Solução de nitrato de prata amoniacal de uso:

Nitrato de prata 10% (aquoso).....20 mL

Hidróxido de potássio 10% (aquoso).....5 mL

Hidróxido de amônia 28% (aquoso): adicionar aos poucos, gotejando até que o precipitado marrom desapareça, sempre agitando.

A solução se tornará transparente. Acrescentar então 3 gotas de nitrato de prata 10%, agitando. Acrescentar água destilada na proporção de 1:1. Acrescentar finalmente 25 mL de água.

E) Formaldeído 10%: (1 parte de formaldeído comercial + 3 partes de água destilada)

F) Cloreto de ouro 1%.

G) Tiosulfato de sódio 5%.

Observação: Os cortes devem ser aderidos em lâminas quimicamente limpas e desengorduradas, com uma fina camada de albumina de Mayer.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Mergulhar em solução de permanganato de potássio 1% por 1 minuto.
- 3- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 4- Descorar pelo ácido oxálico 3% por 3 minutos.
- 5- Lavar em água corrente por 3 minutos.
- 6- Colocar as lâminas no alúmen de ferro 2% ou sulfato de ferro e alumínio por 1 minuto.
- 7- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 8- Solução de nitrato de prata amoniacal (solução de uso) por 1 minuto.
- 9- Lavar em água destilada por 5 minutos.
- 10- Formaldeído 10% por 3 minutos.
- 11- Água corrente por 5 minutos.

- 12- Solução de cloreto de ouro 1% por 10 minutos.
- 13- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 14- Tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto.
- 15- Lavar em água corrente por 2 minutos.
- 16- Desidratar, clarificar e selar.

Resultado:

Fibras reticularesnegro.

Método de coloração tricromática de Masson (Masson, 1929)

Soluções:

A) Solução aquosa, saturada, de ácido pícrico:

Ácido pícrico.....1,2 g
Água destilada.....100 mL

B) Solução fixadora de Bouin:

Solução aquosa, saturada, de ácido pícrico ...750 mL
Formalina (37-40%).....250 mL
Ácido acético, glacial.....50 mL

C) Solução de uso de hematoxilina férrica de Weigert:

Misturar, em partes iguais, as soluções estoques A e B (100 mL da solução A + 100 mL da solução B).

Solução estoque 1:

Hematoxilina, cristais.....1 g
Etanol, 95%.....100 mL

Solução estoque 2:

Cloreto férrico (FeCl ₃), 29%.....	4 mL
Água destilada.....	95 mL
Ácido clorídrico concentrado (HCl).....	1 mL

D) Solução de fucsina ácida - Biebrich Scarlet:

Biebrich Scarlet (C.I. 26905), solução aquosa a 1%....	90 mL
Fucsina ácida (C.I. 42685), solução aquosa a 1%.....	10 mL
Ácido acético glacial.....	1 mL

E) Solução de ácido fosfotúngstico - fosfomolibdico:

Ácido fosfotúngstico.....	5 g
Ácido fosfomolibdico.....	5 g
Água destilada.....	200 mL

F) Solução de azul de anilina:

Azul de anilina.....	2,5 g
Ácido acético glacial.....	2 mL
Água destilada.....	100 mL

G) Solução de ácido acético glacial a 1%:

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até a água destilada.
- 2- Colocar no líquido de *Bouin* por 1 hora a 56 °C ou à

temperatura ambiente, por uma noite, se os cortes foram fixados em formalina. *Essa etapa não é necessária se a fixação for feita no líquido de Bouin.*

- 3- Deixar esfriar por 10 minutos.
- 4- Lavar em água corrente até que os cortes fiquem claros. Em seguida, enxaguar em água destilada.
- 5- Corar na solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos.
- 6- Lavar em água corrente por 10 minutos. Após, enxaguar em água destilada.
- 7- Corar em solução aquosa de Biebrich Scarlet a 1% por 5 minutos.
- 8- Enxaguar em água destilada.
- 9- Colocar na solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 a 30 minutos.
- 10- Corar em solução de azul de anilina por 15 a 30 minutos.
- 11- Enxaguar em água destilada.
- 12- Diferenciar na solução aquosa de ácido acético a 1%, por 3 a 5 minutos.
- 13- Desidratar a partir do etanol a 95%, clarificar com xilol e selar.

Resultados:

Núcleos.....preto
Músculo, citoplasma, queratina.....vermelho
Colágeno.....azul

• **Método de Weigert (Weigert, 1898)**

Soluções:

A) Resorcina fucsina de Weigert:

Fucsina básica.....	2 g
Resorcina.....	4 g
Água destilada.....	200 mL
Cloreto férrico 30 %.....	25 mL

Dissolver 2 g de Fucsina básica e 4 g de Resorcina em 200 mL de água destilada em ebulição. Adicionar 25 mL de cloreto férrico a 30%, deixando ferver por mais 5 minutos. Filtrar e desprezar o filtrado. O precipitado que ficou no papel de filtro deve ser dissolvido em 200 mL de etanol 90% aquecido. Após esfriar, completar para 200 mL com etanol 90% e juntar 4 mL de ácido clorídrico concentrado. O corante deve ser guardado na geladeira, pois o álcool pode evaporar com o calor.

B) Solução de persulfato de potássio 10% ou monopersulfato de potássio 10% ou oxona 10%

C) Solução de Van Gieson:

Fucsina ácida, solução aquosa a 1%.....	5 mL
Ácido pícrico, solução saturada aquosa (21 g para 1 L de água)	100 mL
Ácido clorídrico concentrado.....	0,25 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até o álcool 70%.
- 2- Oxidar pela oxona 10% (desprezar após o uso).
- 3- Corar pela resorcina-fucsina durante 1 hora.
- 4- Passar por 3 banhos de álcool 95% (em borréis), para retirar o excesso de corante por alguns segundos em cada banho.
- 5- Lavar em água destilada.
- 6- Contracorar ou não com a solução de Van Gieson
- 7- Desidratar rapidamente em 3 banhos de álcool absoluto (em borréis).
- 8- Clarificar em 3 banhos de 3 minutos de xilol.

Resultados:

Fibras elásticas marrom-avermelhado.

• **Método da prata metenamina de Grocott (Grocott, 1955)**

Soluções:

- A) Solução de ácido crômico (trióxido de cromo) a 4%.
- B) Solução de nitrato de prata a 5%.
- C) Solução de metenamina (hexametenotetramina) a 3%.
- D) Solução de bórax a 5%.

E) Solução estoque de nitrato de prata-metenamina:

Solução de nitrato de prata a 5%.....5 mL
Solução de metenamina a 3%.....100 mL

F) Solução de trabalho de nitrato de prata-metenamina:

Solução estoque de nitrato de prata-metenamina.....25 mL
Água destilada.....25 mL
Solução de bórax a 5%.....2 mL
Prepare no momento de usar. Não use se ficar turva.

G) Solução de bissulfito de sódio ou metabissulfito de sódio a 1%:

Prepare no momento de usar.

H) Solução de cloreto de ouro a 0,1%.

I) Solução de tiosulfato de sódio (hipossulfato de sódio) a 5%.

J) Solução estoque de *light green* a 0,2%:

Light green SF yellow.....0,2 g
Água destilada.....100 mL
Após misturar, acrescente 0,2 mL ácido acético glacial.

K) Solução de uso de *light green*:

Solução estoque de *light green*10 mL
Água destilada.....50 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Oxidar pela solução de trióxido de cromo a 4%, preparada no momento de usar, e deixar por 1 hora.
- 3- Lavar em água de torneira por poucos segundos.
- 4- Colocar na solução de bissulfito de sódio a 1% por 1 minuto.
- 5- Lavar em água corrente por 5 a 10 minutos.
- 6- Enxaguar em água destilada; 3 trocas.
- 7- Colocar os preparados na solução de trabalho de nitrato de prata-metenamina, preparada no momento de usar, e deixar na estufa a 58°C - 60°C, por 50 a 60 minutos.
- 8- Enxaguar em água destilada várias vezes.
- 9- Colocar na solução de cloreto de ouro a 0,1% e deixar por 2 a 5 minutos.
- 10- Enxaguar em água destilada.
- 11- Colocar na solução de tiosulfato de sódio a 5%, e deixar por 2 a 5 minutos.
- 12- Lavar em água de torneira.
- 13- Contracorar na solução de trabalho de *light green* por 30 a 45 segundos (esse tempo pode variar).
- 14- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Fungosnitidamente delineados em preto
Mucina.....cinza-escuro
Parte interna de micélios e hifas.....rosa-acinzentado
Fundo.....verde

• **Método de Warthin-Starry (Kerr, 1938)**

Soluções:

A) Ácido cítrico 1%.

B) Solução de Água acidulada:

Água tridestilada deionizada.....1000 mL

Acrescentar a solução de ácido cítrico a 1%, o suficiente para alcançar o pH 4,0.

C) Solução impregnante de nitrato de prata a 1%:

Nitrato de prata.....1 g

Água acidulada.....100 mL

D) Solução de nitrato de prata 2% para revelação:

Nitrato de prata.....2 g

Água acidulada.....100 mL

E) Solução de hidroquinona a 0,15%:

Hidroquinona cristalina qualidade fotográfica.....0,15 g

Água acidulada.....100 mL

F) Solução de gelatina a 5%:

Gelatina pura.....10 g

Água acidulada.....200 mL

Conservar as soluções de nitrato de prata 2%, gelatina 5% e hidroquinona 0,15% em frascos de Erlenmayer de 50 mL, em banho-maria 54 °C, até preparar a solução G:

G) Solução reveladora:

Nitrato de prata 2%.....	1,5 mL
Gelatina 5%.....	3,75 mL
Hidroquinona 0,15%.....	2,0 mL

Misturar num pequeno béquer os ingredientes acima na ordem descrita, assegurando-se que a mistura do nitrato de prata e gelatina esteja totalmente completa. Após isso, adicionar a hidroquinona. **Preparar a solução somente na hora de usar.**

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Impregnar pela solução de nitrato de prata a 1%, por 30 minutos em banho-maria pré-aquecido à 43 °C.
- 3- Preparar a solução reveladora. Usar a solução imediatamente após colocar a hidroquinona.
- 4- Recobrir os cortes com a solução reveladora, preparada no momento do uso. Os cortes tornam-se marrons-claros ou amarelos. Controlar ao microscópio. As espiroquetas aparecem em negro com fundo amarelo ou marrom-claro.
- 5- Lavar rapidamente em água morna comum (56°C).
- 6- Mergulhar em água destilada.
- 7- Desidratar a partir do álcool 95%, clarificar e selar.

Resultados:

Espiroquetas, corpos de Donovan...negro

Coloração de fundo.....de amarelo a marrom-claro

Referências:

C. H. Bridges e L. G. Luna estudaram várias modificações da técnica, que se encontra publicada em *Lab. Invest.*, 1957.

• **Sirius red em pH 10,2 (Bogomoletz, 1980; Luque, 1989)**

Solução:

A) Solução de *sirius red* em pH 10,2:

Sirius red ou *direct red* 80.....0,5g

Água destilada.....45 mL

Álcool absoluto.....50 mL

- Adicionar NaOH 0,1N, até atingir o pH 10,2.
- Deixar repousar por 2 horas.
- Gotejar lentamente o cloreto de sódio 20% em baixo de luz forte até aparecer o precipitado.
- Deixar repousar durante a noite sob luz forte e filtrar na manhã seguinte.

Esta solução dura um mês à temperatura ambiente; mas pode durar mais, caso fique na geladeira. Após um mês, aumentar o tempo de coloração.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Corar por 5 minutos pela hematoxilina de Mayer.
- 3- Lavar em água corrente por 5 minutos.
- 4- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 5- Passar pelo álcool 70% por 3 minutos.
- 6- Corar pela solução de *sirius red* pH 10,2 por 1 hora ou mais.
- 7- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- 8- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Grânulos do eosinófilos.....vermelho
Núcleos.....azul

• Método de Fite (Fite, 1947)

Soluções:

A) Vaselina terebentina:

Terebentina.....70 mL
Vaselina.....30 mL

ou Solução de Óleo de Anilina - Xilol:

Óleo de anilina.....30 mL
Xilol.....70 mL

B) Solução de carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen:

Fenol, cristais fundidos.....	2,5 mL
Etanol absoluto.....	5 mL
Fucsina básica.....	0,5 g
Água destilada.....	50 mL

Primeiro, deve-se dissolver a fucsina básica no etanol, juntar o fenol e, por último, adicionar a água destilada. Esta solução deve ser filtrada.

C) Solução de álcool-ácido a 1%:

Ácido clorídrico.....	1 mL
Álcool etílico (etanol) a 70%.....	99 mL

D) Solução estoque de azul de metileno:

Azul de metileno.....	1,4 g
Etanol a 95%.....	100 mL

E) Solução de trabalho de azul de metileno:

Solução estoque de azul de metileno.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL
Ácido acético glacial.....	0,5 mL

Procedimento:

1- Desparafinizar as lâminas em 2 trocas, de 10 minutos cada, em solução de vaselina terebentina ou óleo de anilina – xilol em estufa 60°C. *Lembrar-se de que essas soluções devem estar a 60°C antes de imergir as lâminas.*

- 2- Deixar os cortes secarem ao ar por 15 minutos. O filme de óleo remanescente prevenirá a retração e os danos aos cortes.
- 3- Corar na solução filtrada de carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen por 30 minutos.
- 4- Lavar em água de torneira por 10 minutos.
- 5- Diferenciar os cortes na solução de álcool-ácido a 1% até que fiquem rosa-pálidos.
- 6- Lavar em água corrente por 3 minutos.
- 7- Contracorar com a solução de trabalho de azul de metileno por 30 segundos a 1 minuto.
- 8- Enxaguar, em água de torneira, o excesso de solução de trabalho de azul de metileno.
- 9- Desidratar os cortes rapidamente, em 2 trocas cada, em etanol a 95% e etanol absoluto.
- 10- Clarificar em xilol; 2 trocas de 2 minutos cada.
- 11- Selar.

Resultados:

Bacilos da lepra e outros ácido resistentes.....vermelho.
Fundo..... azul-pálido.

• **Método do mucicarmim** (Southgate, 1927)

Soluções:

A) Solução estoque mucicarmim de Southgate:

Carmim..... 1 g
Hidróxido de alumínio..... 1 g

Etanol a 50%.....100 mL
Cloreto de alumínio, anidro.....5 g
Faça essa solução em banho-maria. Quando frio, filtre.

B) Solução de trabalho de mucicarmim de Southgate:

Solução-estoque de mucicarmim de Southgate.....10 mL
Água destilada.....90 mL

C) Solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weigert:

Partes iguais das soluções estoque A e B (100 mL de A + 100 mL de B). Ver o método de coloração pela tricromática de Masson.

D) Solução de amarelo metanil a 0,25%:

Amarelo metanil.....0,25 g
Água destilada.....100 mL
Ácido acético glacial.....0,25 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até a água destilada.
- 2- Deixar na solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weigert por 7 minutos.
- 3- Lavar em água corrente de torneira por 10 minutos.
- 4- Corar na solução de trabalho de mucicarmim de Southgate por 30 minutos e descartá-la após o uso.
- 5- Enxaguar rapidamente em água destilada.

- 6- Contracorar na solução de amarelo metanil por 1 minuto.
- 7- Desidratar a partir do etanol 95%.
- 8- Clarificar e selar.

Resultados:

Mucina.....	rosa-escuro
Cápsula de <i>Cryptococcus sp</i>	rosa-escuro
Núcleos.....	preto
Fundo.....	amarelo

Método de Feulgen para DNA (Feulgen e Rossenbeck, 1924)

Soluções:

A) Ácido clorídrico 1N:

Ácido clorídrico.....	8,3 mL
Água destilada.....	91,7 mL

B) Metabissulfito de sódio 0,5%.

C) Reagente leuco fucsina de Schiff (ver método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS)).

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar dos cortes até a água destilada.
- 2- Lavar os cortes em ácido clorídrico 1N em temperatura ambiente.

3- Transferir para o ácido clorídrico 1N pré-aquecido, a 60°C para hidrolisar os cortes.

○ tempo de hidrólise depende do fixador utilizado:

- Formaldeído = de 8 a 12 minutos.
- Bouin = de 5 a 8 minutos.
- Helly = em torno de 5 minutos.

4- Transferir para a solução o reagente leuco fucsina de Schiff durante 45 minutos.

5- Lavar em 3 banhos de metabissulfito de sódio 0,5%, de 2 minutos.

6- É opcional contracorar com light green 1% durante 1 minuto.

7- Desidratar, clarear e montar.

Resultados:

DNA..... vermelho-púrpura

Citoplasma.....verde

• **Método de Coloração pelo *alcian blue* em pH 2,5 (Lev. e Spicer, 1964).**

Soluções:

A) Solução de ácido acético glacial a 3%.

B) Solução de *alcian blue*:

alcian blue, 8GX..... 1 g

Solução de ácido acético a 3%..... 100 mL

C) Solução de *nuclear fast red* (*kernechtrot*):

Nuclear fast red (*kernechtrot*)0,1 g

Solução de sulfato de alumínio a 5% 100 mL

Aqueça a solução lentamente, até ferver. Esfriar e filtrar. Acrescente timol para preservar.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até água destilada.
- 2- Colocar em solução de ácido acético glacial a 3% e deixar por 3 minutos.
- 3- Corar na solução de *alcian blue* por 30 minutos.
- 4- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- 5- Enxaguar em água destilada.
- 6- Contracorar com a solução de *nuclear fast red* filtrada por 5 minutos.
- 7- Lavar em água corrente por 1 minuto.
- 8- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Mucossubstâncias ácidas sulfatadas e carboxiladas..... azul escuro
Núcleos.....vermelho a rosa
Citoplasma.....rosa-pálido

• **Método de coloração pelo *alcian blue*, pH 1,0
(Lev e Spicer, 1964)**

Soluções:

A) Solução de ácido clorídrico 1N:

Ácido clorídrico.....	83,5 mL
Água destilada.....	916,5 mL

B) Solução de ácido clorídrico 0,1 N:

Solução de ácido clorídrico 1N.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

C) Solução de *alcian blue*:

<i>Alcian blue</i> , 8GX.....	1 g
Solução de ácido clorídrico 0,1 N.....	100 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até água destilada.
- 2- Colocar na solução ácido clorídrico 0,1N e deixar por 3 minutos.
- 3- Corar pela solução de *alcian blue* por 30 minutos.
- 4- Retirar o excesso de corante com papel de filtro. Não enxaguar em água.
- 5- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Mucossubstâncias sulfatadas azul-escuro

Notas de biossegurança

Ao manipular vários produtos químicos para os métodos de coloração, use máscara com filtro próprio para vapores orgânicos, em local arejado e com exaustão. O preparo dessas soluções deve ser feito em capela de exaustão, evitando sempre o contato com a pele ou a vias respiratórias. Observe a ficha de segurança de cada produto químico utilizado para os métodos de coloração, muitos são danosos à saúde se inalados, engolidos, ou se entram em contato com a pele. Nunca descarte as soluções corantes ou qualquer solução preparada para o desenvolvimento das colorações em esgoto sanitário convencional, procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

7. Técnicas imuno-histoquímicas

Os corantes auxiliam o estudo histológico das características químicas teciduais e, no caso de algumas colorações especiais, destacam regiões específicas do tecido ou até mesmo classes de proteínas. Contudo, para se identificar alguns elementos teciduais, em situações normais ou patológicas, é preciso reconhecer certas proteínas específicas, o que não é possível por meio das técnicas histoquímicas. Para tal, recomenda-se a utilização de métodos imuno-histoquímicos, que, como o próprio nome sugere, reúnem conhecimentos próprios da imunologia, histologia e química.

A imuno-histoquímica se baseia na capacidade de certas substâncias com afinidade específica para determinados elementos, isto é, anticorpos. Os anticorpos, ao reconhecerem especificamente uma proteína-alvo, possibilitam a identificação molecular de elementos teciduais com observação nos diferentes tipos de microscópio.

A imuno-histoquímica tem diversas aplicações como método de auxílio ao diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias, além de ser utilizada para determinar fatores preditivos e prognósticos no câncer.

O que são anticorpos?

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são um grupo especial de glicoproteínas produzidas naturalmente por células do sistema imunológico de diversas espécies animais e são classificados em cinco isotipos (tipos de imunoglobulinas): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

O antígeno é uma substância que, em condições apropriadas, é capaz de estimular a produção de um determinado anticorpo. Quando um antígeno originário, por exemplo, de bactérias, fungos, vacinas, penetra no organismo, ele é reconhecido como elemento estranho, desencadeando uma série de eventos, como a produção de anticorpos que reconhecerão especificamente esse antígeno.

O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo ocorre de duas formas: *química*, pela afinidade entre essas moléculas; e *estrutural*, pois os anticorpos possuem uma estrutura tridimensional que se adapta perfeitamente à estrutura do antígeno, realizando uma ligação designada *chave-fechadura*.

Ao se introduzir um antígeno específico em um animal, este reagirá contra esse antígeno e, após um determinado tempo, será possível isolar anticorpos que reconheçam o antígeno do soro desse animal. Os anticorpos são utilizados para determinar a presença desse antígeno em um tecido de outro animal. Atualmente, os anticorpos comercializados por grandes empresas são obtidos a partir de diferentes animais, como, por exemplo: camundongo, rato, coelho, macaco, porco, dentre outros, utilizando metodologias avançadas.

Aplicabilidade do uso de anticorpos

Os anticorpos podem ser utilizados em células em cultura, ou em cortes histológicos de tecidos processados segundo a técnica de inclusão em parafina, em cortes obtidos pelo método de congelação ou ainda incluído em resina.

É importante notar que, independentemente do método de processamento histológico, deve-se ter o cuidado de preservar o antígeno no tecido, evitando modificações na sua conformação tridimensional ou na composição química.

A preservação adequada dos antígenos depende de uma boa fixação e de um bom processamento. O fixador utilizado em imuno-histoquímica deve ser capaz de preservar tanto a morfologia tecidual quanto o antígeno, além de impedir sua extração e deslocamento durante o processamento do material. Não existe o fixador ideal; porém, deve-se conhecer o mecanismo de ação tecidual de cada solução fixadora para escolher o método de fixação mais adequado.

O formol, assim como os demais fixadores aldeídicos, ao estabelecer ligações cruzadas com as proteínas teciduais, torna as proteínas insolúveis na forma de um gel. Essas ligações formam uma malha que pode impedir a ligação do anticorpo ao antígeno tecidual, além de mudar a configuração tridimensional dos antígenos. Quanto maior o tempo de fixação, isto é, o tempo em que um determinado tecido é submetido ao fixador, mais pontes serão formadas. Por essa razão, é importante controlar o tempo de fixação necessário para preservar as estruturas teciduais.

Para haver reação entre o antígeno e o anticorpo em materiais fixados por aldeídos, é necessário “desmascarar” os antígenos, desfazendo as pontes intermoleculares formadas durante a fixação. Com esse objetivo, utiliza-se um procedimento denominado *recuperação antigênica*. Existem diversos mecanismos para se recuperar os antígenos em um tecido. A escolha do método ideal depende do tipo de tecido a ser analisado e da prática do laboratório.

Os principais métodos de recuperação antigênica são:

- Método enzimático, empregando-se enzimas como a tripsina ou pepsina.

- Método físico-químico por aquecimento, utilizando-se panela de pressão, panela a vapor, banho-maria e micro-ondas, devendo o material ser imerso em uma solução de tampão citrato ou tris-EDTA.
- Método físico-químico por sonicação⁵, isto é, realiza-se a sonicação em tampão citrato ou tampão tris-EDTA.

A reação imuno-histoquímica deve ocorrer em temperatura e pH controlados. Por essa razão, as lâminas devem ser mantidas em estufa ou geladeira durante o procedimento e os cortes cobertos por uma solução tamponada. Temperaturas elevadas aceleram a reação entre antígeno e anticorpo, embora diminuam a especificidade do anticorpo ao antígeno. Temperaturas mais baixas diminuem a velocidade da reação, aumentando tal especificidade.

Geralmente, na rotina laboratorial, utilizam-se estufas reguladas a 37°C em um tempo de reação de 1 hora, ou geladeira a 4°C em um tempo de reação de um dia para o outro (*over night*).

A reação imuno-histoquímica também pode variar dependendo do pH do meio em que a reação ocorre. Assim, utiliza-se uma solução de tampão fosfato (PBS) ou tampão tris (TBS) em pH 7,0 para recobrir os cortes durante as lavagens ou para diluir as demais soluções.

Tampão fosfato (PBS) pH 7,2 0,1M:

Fosfato de sódio, dibásico (Na_2HPO_4), anidro.....	1,48 g
Fosfato de sódio, monobásico (NaH_2PO_4), anidro.....	0,43 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	7,2 g
Água destilada.....	1000 mL

⁵ **Sonicação** é o procedimento que utiliza a energia das ondas sonoras, mais comumente o ultrassom, aplicado sobre determinados sistemas químicos.

Outro fator que influencia a reação é a concentração do anticorpo. Os anticorpos devem estar diluídos em uma concentração que permita o reconhecimento do antígeno pelo seu respectivo anticorpo, sem haver perda de sua especificidade. Para se encontrar a diluição ideal de cada anticorpo, deve-se proceder a um teste utilizando-se um controle positivo, isto é, um material que se tenha conhecimento prévio da sua positividade ao anticorpo que se deseja testar. Assim, usam-se diversas diluições até se encontrar a diluição onde a marcação seja bem evidente e não haja reação inespecífica de modo a mascarar a reação.

Para visualizar a reação, os anticorpos devem estar marcados com alguma substância capaz de exibir cor. Em geral, utiliza-se um anticorpo associado a enzimas que, em etapa posterior, reagirão com substâncias cromógenas, ou anticorpos diretamente associados a fluoróforos, radioisótopos ou ouro coloidal.

A técnica enzimática mais usual na rotina laboratorial utiliza várias substâncias. Inicialmente, empregam-se anticorpos associados a uma vitamina chamada biotina (anticorpo biotinilado). Esse anticorpo reage com a estreptavidina, uma proteína que possui quatro sítios de ligação. A estreptavidina que se encontra complexada a três moléculas de biotina ligadas à enzima peroxidase reconhecerá, através de um sítio vazio, a biotina presente no anticorpo secundário. A peroxidase reage com o peróxido de hidrogênio na presença de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que funciona como um doador de elétrons para a reação. O DAB reduzido se precipita no local da reação, sendo o produto dessa reação visualizado como um precipitado castanho (Figuras 25 e 26).

Figura 25. Representação da técnica imuno-histoquímica indireta. O antígeno presente no tecido é reconhecido pelo anticorpo primário. Um anticorpo secundário biotilado se liga ao anticorpo primário. A estreptavidina se ligará por meio do seu sítio livre à biotina, que está associada a peroxidase. Uma solução contendo peróxido de hidrogênio reage com a peroxidase na presença do DAB, formando um precipitado insolúvel castanho no local da reação.

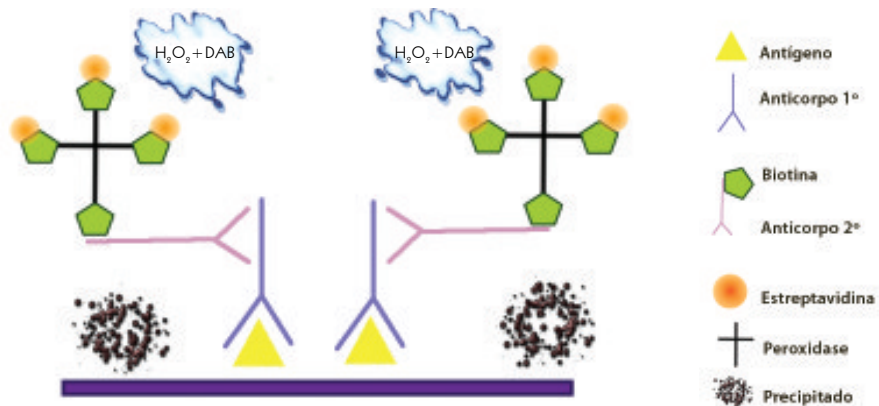
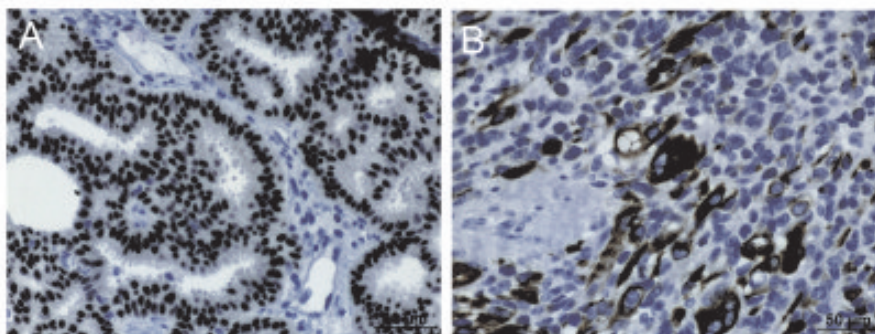


Figura 26. Técnica imuno-histoquímica indireta utilizando o método de estreptavidina biotina-peroxidase revelada por DAB. (A) Marcação nuclear identificando o receptor de progesterona. (B) Marcação citoplasmática identificando a desmina.



Existem outros métodos enzimáticos, assim como outros cromógenos, que são relatados em literatura mais específica.

Pode-se também utilizar anticorpos associados a fluoróforos. As primeiras técnicas imuno-histoquímicas descritas utilizavam fluoróforos associados a anticorpos como marcadores, e são utilizadas até hoje. Diversas substâncias são utilizadas com este propósito, como FITC (isotiociano de fluoresceína), TRITC (isotiocianato de tetraodamina), Alexa 488, Cy5, dentre outras, mas necessitam de um microscópio de fluorescência para visualizar a reação, o que torna por vezes esta técnica mais onerosa.

Normalmente, os anticorpos que fazem ligação com os antígenos teciduais (anticorpos primários) não estão associados a enzimas ou fluoróforos. Dessa forma, para visualizá-los, utilizam-se anticorpos secundários complexados à peroxidase ou a fluoróforos. Assim, denomina-se esse método como *método indireto*. Contudo, há anticorpos primários comerciais já associados com enzimas, e, por essa razão, chama-se esse tipo de reação *método direto*. A marcação direta diminui o risco de reações inespecíficas pela diminuição de etapas, em contraste com reações indiretas, que amplificam o sinal facilitando a identificação dos antígenos.

Mesmo com o cuidado na escolha da concentração adequada dos anticorpos e na manutenção da temperatura e do pH, podem ocorrer reações inespecíficas com componentes teciduais carregados eletricamente ou com receptores de imunoglobulinas teciduais. Podemos eliminar essa marcação “recobrando” esses sítios inespecíficos antes da reação com uma solução contendo albumina e um soro.

Solução de bloqueio de sítios inespecíficos :

PBS.....200 mL

Leite em pó desnatado.....5 g

Filtrar a solução.

Solução de uso:

Filtrado de leite 2,5%.....	100 mL
Albumina bovina.....	2,0 g
Soro fetal bovino.....	8 mL
Guardar solução em geladeira.	

Outro elemento capaz de causar reações inespecíficas é a peroxidase endógena tecidual. Esse problema só ocorre quando o método escolhido é o enzimático, pois o substrato cromógeno reagirá tanto com a peroxidase ligada ao anticorpo da reação quanto com a peroxidase tecidual. Nesse caso, devemos inibir a ação da enzima, utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3%.

Para garantir a sua qualidade, é sempre importante incluir um controle positivo e controle negativo da reação. O controle positivo é obtido com um material que sabidamente possui o antígeno analisado. Esse material permitirá confirmar, por sua marcação positiva, a qualidade da reação, caso as lâminas testadas forem negativas. O controle negativo é feito omitindo-se o anticorpo primário nas lâminas testadas, ou utilizando o mesmo isotipo do mesmo animal no qual foi produzido o anticorpo primário. Assim, com esses cuidados, o resultado da reação permite garantir que as demais etapas da reação não estão reconhecendo inespecificamente nenhum componente tecidual.

A seguir, segue uma sugestão de protocolo de reação indireta para material incluído em parafina. Nesse procedimento, utiliza-se a panela de pressão como equipamento para auxiliar na etapa de recuperação antigênica e um anticorpo secundário biotinilado, isto é, associado à biotina.

Protocolo:

- 1- Após confeccionar os cortes e aderi-los em lâminas previamente tratadas com adesivo, deixar o corte aderir à lâmina por um dia em estufa à 37 °C.
- 2- Desparafinizar e hidratar as lâminas, deixando-as por 5 minutos em cada banho nas respectivas soluções (ver pré- etapa da coloração).
- 3- Colocar cerca de 2 litros de tampão citrato em pH 6,0 em uma panela de pressão. Deixar esquentar e, quando o tampão estiver fervendo, colocar as lâminas imersas no tampão e fechar a panela. Quando a panela começar a “apitar”, deixar por mais 1 minuto e apagar o fogo. Aliviar a pressão pela válvula de segurança da panela e deixar a panela destampada para esfriar um pouco a solução (cerca de 10 minutos). Após esse tempo, lavar os cortes em água corrente por mais 10 minutos.
- 4- Lavar as lâminas por 10 minutos em PBS (tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2) trocando o tampão por duas vezes.
- 5- Incubar com anticorpo primário de um dia para o outro (*overnight*) em geladeira a 4°C. Cobrir os cortes delicadamente com o anticorpo, mantendo as lâminas em câmara úmida.
- 6- Lavar as lâminas em PBS em três banhos consecutivos de 5 minutos.
- 7- Incubar as lâminas por 20 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em PBS.
- 8- Lavar as lâminas em PBS em três banhos consecutivos de 5 minutos.

9- Incubar com anticorpo secundário biotilado por 1 hora em estufa a 37°C. Cobrir os cortes delicadamente com o anticorpo, mantendo as lâminas em câmara úmida.

10- Lavar as lâminas em PBS em 3 banhos consecutivos de 5 minutos.

11- Incubar com a estreptavidina-peroxidase por 30 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente.

12- Lavar as lâminas em PBS em 3 banhos consecutivos de 5 minutos.

13- Incubar as lâminas em uma solução contendo 10mg de DAB diluídos em 10 mL de PBS e cerca de 150 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Controlar o tempo de reação ao microscópio, observando o precipitado castanho se formar nos locais onde o anticorpo reagiu. Essa reação pode durar em torno de 3 minutos.

14- Lavar as lâminas em água por 5 minutos.

15- Contracorar as lâminas em hematoxilina diluída por 30 segundos.

16- Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos.

17- Desidratar, clarificar e montar.

Importante: nunca deixe secar os cortes durante a reação imuno-histoquímica!

Notas de biossegurança

Durante o procedimento, tomar os cuidados citados anteriormente para o manuseio do xilol e do álcool. Manusear a panela de pressão com cuidado para evitar queimaduras ou explosões. Como o DAB é um produto altamente tóxico e tem potencial carcinogênico por exposição prolongada, evite respirar o pó seco e o contato com a pele ou mucosas e sempre utilize luvas

e jaleco durante a manipulação. Esse elemento também é tóxico para o meio ambiente, despreze a solução de DAB num frasco plástico e adicione 10 mL de hipoclorito de sódio para cada 100 mL dessa solução. Procure saber a política de descarte de substâncias prejudiciais ao meio ambiente de sua instituição.

8. Meios de selagem

Os meios de selagem, comumente chamados montagem, podem ser permanentes ou provisórios. Os meios permanentes são meios resinosos e hidrofóbicos, sendo necessária a completa remoção da água do interior dos tecidos pela desidratação e pela clarificação com o diluente do meio de selagem. Os meios provisórios são meios hidrofílicos e não necessitam da remoção da água dos tecidos, sendo os preparados descartados após a observação ao microscópio.

Meios de selagem hidrofóbicos e permanentes

Esses meios podem ser sintéticos, como o DPX e o Entelan®, ou naturais, como o bálsamo do Canadá ou a goma de Damar. Existem vários protocolos para diluição desses meios. Citaremos apenas o da goma de Damar.

Goma de Damar.....	200 g
Xilol.....	100 mL

Misturar, e esperar dissolver. Acrescentar mais goma ou xilol caso se queira uma textura mais ou menos viscosa.

Meios de selagem hidrofílicos ou provisórios

Esses meios são utilizados quando os corantes aplicados perdem a sua capacidade tintorial, ou mesmo quando o conteúdo de determinadas estruturas teciduais se altera quando os tecidos são submetidos a desidratação ou aos meios de selagem que tem o xilol como diluente.

A seguir, citamos um dos meios de selagem hidrofílicos mais utilizados, a gelatina - glicerina, por ser de baixo custo e de fácil aplicação.

Gelatina.....10 g
Água destilada.....60 mL

Aqueça até que a gelatina esteja dissolvida. Acrescente, depois, 70 mL de glicerina.

9. Artefatos de técnica

São alterações das imagens de tecidos quando os preparados histológicos são observados ao microscópio. Isso pode ocorrer devido a manipulações físicas ou químicas durante as etapas da técnica histológica.

Os artefatos, por exemplo, podem ser ocasionados por:

- dente na navalha de corte, causando fendas;
- talco na luva utilizada pelo técnico;
- precipitado de corantes ou mesmo pigmentos que se depositaram sobre o tecido;
- retração ou intumescimento tecidual provocado por algum componente químico do fixador;
- autólise associada à proliferação bacteriana devido à demora em se fixar o material;
- fragmentação e/ou rachadura do tecido provocada por elevação da temperatura da parafina durante o processamento.

- dobras no tecido formadas durante a microtomia;
- bolhas provocadas durante a selagem da lamínula sobre o preparado histológico.

Referências bibliográficas

- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4. ed. Nova York: Churchill Livingstone, 1996.
- BOGOMOLETZ, W. Avantages de la coloration par le rouge sirius de l'amyloïde et des eosinophiles. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.*, n. 28, p. 253-253, 1980.
- CAPUTO, L. F. G. *Manual da disciplina de Histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.
- CARSON, F. L. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 2. ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1997.
- CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.*, n. 59, p. 365-373, 1973.
- FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thyminucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Phys. Chem.*, n. 135, p. 203-248, 1924.
- FITE, G. L.; CAMBRE, P. J.; TURNER, M. H. Procedure for Demonstrating Lepra Bacilli in Paraffin Sections. *Arch. Pathol.*, n. 43, p. 624, 1947.
- GOMORI, G. Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. *Amer. J. Path.*, n. 13, p. 993-1.002, 1937.
- GRIMALDI FILHO, G. *Manual de técnica histológica*. Rio de Janeiro: CME/IOC/Fiocruz, 1981.
- GROCOTT, R. G. A Stain for Fungi in Tissue Sections and Smears using Gomori Methenamine Silver Nitrate Technique. *Am. J. Clin. Pathol.*, n. 25, p. 975, 1955.
- JUNQUEIRA C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983.
- KERR, D. A. Improved Warthin-Starry Method for Tissue Sections. *Amer. J. Clin. Path. Tech.*, supp. 8, p. 63-67, 1938.

- KIERNAN, J. A. *Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice*. 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.
- LENNERT, K. *Malignant Lymphomas other than Hodgkin's Disease*. Histology. Cytology. Ultrastructure. Immunology. Berlin: Springer-Verlag, 1978.
- LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulfate Groups with Alcian Blue at Low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, n. 12, p. 309, 1964.
- LUNA, L. G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. Nova York: McGraw-Hill, 1968.
- LUQUE, E. H.; MONTES, G. S. Progesteron Promotes a Massive Infiltration of the Rat Uterine Cervix by Eosinophilic Polymorfonuclear Leukocytes. *Anatomical Records*, v. 223, n. 3, p. 257-265, 1989.
- MASSON, P. J. Trichrome Stainings and their Preliminary Techniques. *J. Tech. Met.*, v. 12, p. 75, 1929.
- MAYER, P. Notiz über Hämatein und Hämalan. *Z. Wiss. Mikrosk. Mikrosk. Tech.*, n. 20, p. 409, 1903.
- MCMANUS, J. F. A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. *Nature*, n. 158, p. 202, 1946.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 3. ed. São Paulo: Michelany, 1981.
- PROPHET, E. B. et al. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.
- SHEEHAN, D. C.; HRAPCHAK, B. B. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2. ed. St. Louis: C. V. Mosby, 1980.
- SOUTHGATE, H. W. Note on Preparing Mucicarmine. *J. Path. Bact.*, v. 30, p. 729, 1927.
- WOODS, A. E.; ELLIS, R. C. *Laboratory Histopathology: A Complete Reference*. Nova York: Churchill Livingstone, 1994. 2 v.

Capítulo 4

Técnicas citológicas

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Ester Maria Mota

Lycia de Brito Gitirana

A técnica citológica também faz parte da histotecnologia e possui grande importância no diagnóstico de algumas doenças que acometem os seres humanos e os animais. Essa é uma ferramenta fundamental no diagnóstico de tumores, função hormonal e infecções parasitárias. O exame colpocitológico, conhecido como Papanicolaou, é utilizado para detectar, nas mulheres, tumores de colo de útero. Seu idealizador, dr. George N. Papanicolaou, estabeleceu em 1942 os conceitos básicos de interpretação citológica e criou um método de coloração citológica que é utilizado, universalmente, até hoje.

A citopatologia analisa as células individualizadas, descamadas, expelidas ou retiradas da superfície de órgãos de diferentes partes do organismo. Como os materiais biológicos apresentam diferentes características, devido às distintas formas de organização e composição, a coleta do material destinado à análise citológica constitui uma etapa fundamental nesse processo. Há métodos específicos para coleta de materiais distintos. Além disso, nessa fase, são definidos os tipos de procedimentos mais adequados à análise dos preparados citológicos.

Algumas etapas da técnica citológica são semelhantes às da técnica histológica, mas com peculiaridades próprias, podendo também haver consideráveis interferências na qualidade final do diagnóstico, como coleta do material, fixação, processamento, coloração e leitura das lâminas citológicas.

1. Coleta de material

A origem das amostras dos preparados histológicos vem de fragmentos de tecidos oriundos de necrópsias e biópsias. Nos preparados citológicos, essa origem é um pouco mais diversificada, proveniente de líquidos orgânicos (urina, líquido, líquido ascítico, pericárdico, sinovial), punções aspirativas por agulha fina (pulmão, mama, tireoide, linfonodos, dentre outros), secreções (escarro, abscesso e fístula), lavados cavitários (brônquicos e broncoalveolares, vesiculares) e raspados (cervicovaginal, ocular).

Segundo suas características, as amostras são divididas em três grupos, e chegam ao laboratório para análise da seguinte forma:

Classificação da amostra	Método de coleta	Origem da amostra
Distensão celular (esfregaço)	Raspagem <i>swab</i> (Figura 11)	Colpocitologia
		Olhos
		Lavado brônquico
	<i>Imprint</i> ou decalque	Lesões cutâneas
		Biópsias
		Peças cirúrgicas
	Punção aspirativa	Sangue
		Lavado brônquico
		Líquor espinhal

Amostras pastosas	Expectoração	Escarro (Figura 6)
	Punção ou drenagem	Abscessos
		Massas necróticas
Amostras líquidas	Espontânea ou por cateter	Urina
	Escovação	Líquido sinovial
	Escovação ou lavado	Líquido peritoneal ou ascítico
	Punção	Líquido pleural
		Líquido peritoneal ou ascítico
		Líquido pericárdico
		Lavado brônquico alveolar
		Lavado vesical
		Líquido estomacal
		Lavado brônquico
Líquido sinovial		

A natureza da amostra (líquida, pastosa ou sólida) irá definir a forma de coleta e preparo do material segundo as etapas da técnica citológica escolhida.

Distensão celular (esfregaço), (Figuras 1, 3, 8, 9, 10 e 11): é feita ao se distender sobre uma lâmina de vidro uma leve camada de fluidos corpóreos para o exame ao microscópio.

Lavado: o material é colhido com o auxílio de um cateter de instilação para lavagem, contendo solução salina, de uma cavidade do organismo. Exemplos: lavado broncoalveolar (LBA), brônquico (LB), peritoneal, entre outros. Geralmente os lavados se apresentam pouco celulares.

Escovados (Figuras 1, 2, 3 e 4): o material é colhido por esfoliação da superfície de mucosas, utilizando-se uma escova. O material obtido pode ser distendido sobre a superfície de uma lâmina de vidro, ou cortando-se a cabeça da escova e imergindo-a em solução salina ou em líquido conservante apropriado, procedendo-se em seguida à citologia de líquidos.

Impressões teciduais (“*imprint*”) (Figura 5): denomina-se impressões teciduais o procedimento em que se coloca a área lesionada do tecido em contato com a superfície de uma lâmina de vidro lisa, de forma semelhante ao procedimento para se obter impressão digital. As células superficiais da lesão passam para a superfície da lâmina de vidro e podem ser observadas ao microscópio. Esse procedimento é também denominado citologia de decalque.

Figura 1. Coletores para citologia Figura 2. Escovado cervicovaginal. esfoliativa.

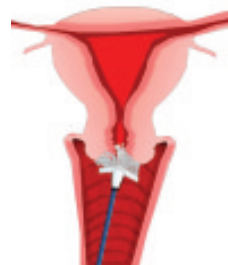


Figura 3. Distensão citológica pela espátula de Ayre.



Figura 4. Fixação de escovado citológico.



Figura 5. Impressão tecidual em lâminas (*imprint*).

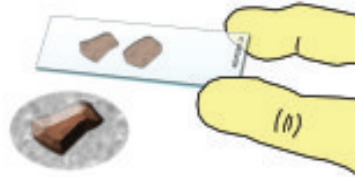


Figura 6. Escarro espontâneo ou induzido para coleta de material.



2. Fixação das amostras

O principal objetivo da fixação é preservar a morfologia celular e a composição química das células após a sua retirada do organismo.

Tipos de fixação

A. Fixação seca

Esse tipo de fixação é utilizado quando se realiza a coloração de May-Grünwald-Giemsa, pois o metanol presente na solução corante age como fixador. É o tipo de fixação utilizada para distensão de células sanguíneas, *imprint* de baço, gânglios linfáticos, entre outros.

B. Fixação por revestimento

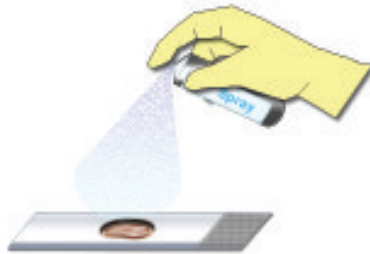
É usada na obtenção dos esfregaços citológicos. Os fixadores são constituídos de polietilenoglicol (Carbowax) e álcool, comercialmente vendidos na forma líquida ou em *spray*. As amostras são fixadas pelo gotejamento do fixador ou pela pulverização do aerossol das embalagens em *spray* (Figura 7), sendo secas à temperatura ambiente, pois o álcool fixa e evapora, enquanto o polietilenoglicol forma uma película que protege e preserva a amostra. Existem vários protocolos para este tipo de fixador; citaremos um dentre os vários que existem na literatura.

Carbowax em etanol 95%

Etanol 95%.....	95 mL
Polietilenoglicol 4000.....	5g

Lembrar: antes de corar as amostras fixadas em Carbowax, banhá-las em etanol 95% por 10 minutos para remover a película de polietilenoglicol.

Figura 7. Fixação por revestimento.



C. Fixação por líquidos fixadores

○ fixador citológico universal é o etanol 95%, um agente coagulante, que penetra na célula desidratando-a e intensificando a diferenciação nuclear e citoplasmática após a coloração.

Outros fixadores, como o Carnoy, metanol, álcool isopropílico 80%, etanol 50%, líquido de Bouin, dentre outros, também podem ser utilizados como fixadores celulares, variando a escolha e o tempo de fixação de acordo com natureza da amostra.

3. Processamento das amostras

○ acondicionamento do material é essencial para evitar a perda de conteúdo. A identificação da amostra e o preenchimento correto da ficha de solicitação médica (contendo o nome do paciente, idade, data da coleta, natureza da amostra e sua localização, tipo de exame requerido, dados clíni-

cos, nome do médico requisitante e telefone) são informações relevantes para evitar o extravio do material.

O processamento da amostra requer procedimentos específicos de acordo com a natureza do material a ser analisado. Descreveremos aqui alguns desses procedimentos.

A. Distensão celular (Figuras 1, 3, 8, 9, 10 e 11): geralmente, a distensão chega ao laboratório pronta, tendo sido manipulada pelo clínico ou cirurgião e fixada em etanol 95%. Na maioria das vezes, quando a distensão chega seca, o material é destinado à coloração pelo método de May-Grünwald-Giemsa e, dependendo da amostra, pode-se ou não fixar pelo metanol durante cinco minutos. Deve-se preparar esse tipo de amostra de modo a formar uma fina camada de células, permitindo assim melhor diferenciação celular. Distensões espessas produzem artefatos e hipercoram as células dificultando sua análise.

Figura 8. Distensão celular.

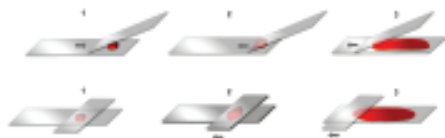


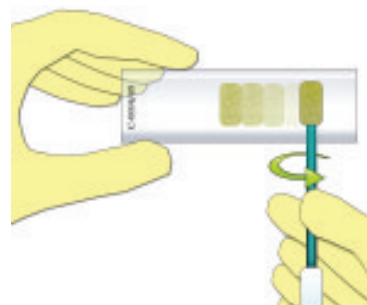
Figura 9. Distensão após biópsia por agulha.



Figura 10. Formas de distensão celular.



Figura 11. Distensão celular por swab.



B. Amostras pastosas: devem ser analisadas antes de processadas para a análise. Coloca-se o material em uma placa de Petri com fundo escuro e selecionam-se as regiões mais densas, escuras e/ou sanguinolentas. Essas áreas são colocadas sobre lâminas de vidro para distender, obtendo-se uma camada de células (distensão celular) e fixando o material imediatamente em etanol 95% (Figura 8).

C. Amostras líquidas: são as amostras que possuem maior diversidade de procedimentos, dependendo do tipo de amostra. Citaremos aqui os mais utilizados:

Líquidos, como urina, lavados, derrames de cavidades e líquido sinovial podem ser pré-fixados em etanol 50%, ou enviados imediatamente ao laboratório após a coleta, podendo ser também conservados a 4°C até o envio. O uso de anticoagulantes deve ser avaliado de acordo com o tipo de material coletado. As amostras líquidas subdividem-se em dois grupos:

- Transudatos: são pouco celulares e de cor clara.
- Exsudatos: são ricos celularmente, escuros, de natureza neoplásica ou inflamatória.

Estas amostras podem ser processadas de acordo com sua riqueza celular, por meio da centrifugação (Figura 12) ou citocentrifugação (Figuras 13 e 14).

Centrifugação

É preferida quando o material se apresenta hipercelular.

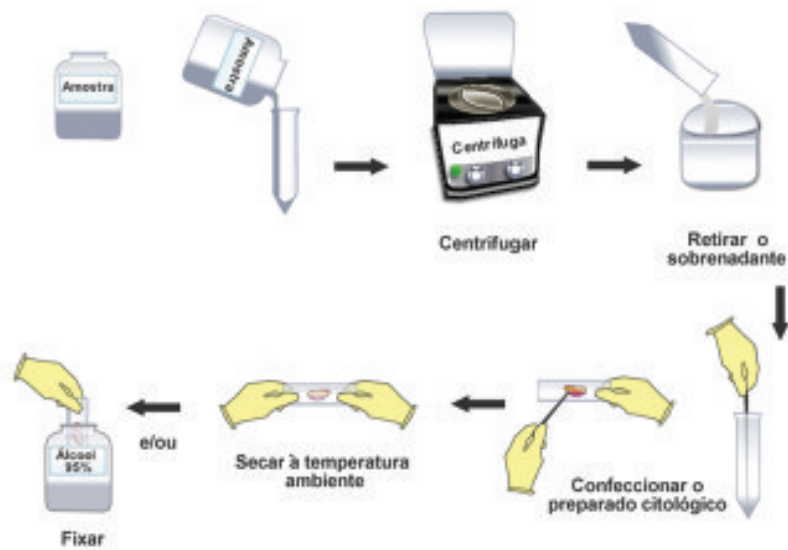
Procedimento:

- 1- Colocar o líquido em tubos “Falcon” com tampa.
- 2- Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos.
- 3- Descartar o sobrenadante.
- 4- Aspirar o sedimento com pipeta Pasteur.
- 5- Colocar o sedimento em lâminas limpas e desengorduradas e proceder à distensão celular.

6- Deixar secar ao ar e/ou fixar em álcool 95% imediatamente; a secagem ao ar é necessária se o método de coloração for o May-Grünwald-Giemsa.

Observação: As amostras poderão vir em tubos com anticoagulante ou não.

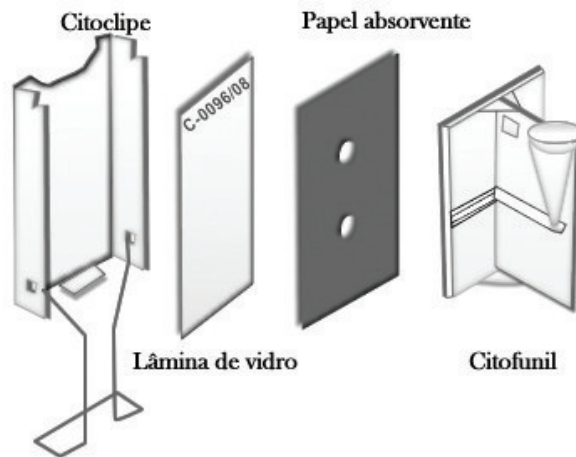
Figura 12. Procedimento para centrifugação



Citocentrifugação

Possibilita a análise citológica de líquidos com baixíssima densidade celular (hipocelulares). Esse método é necessário para concentrar as células em suspensão, que com a centrifugação se depositam diretamente sobre uma região das lâminas de vidro, perfazendo um diâmetro de 5 mm, enquanto o meio de suspensão é absorvido por papel absorvente próprio.

Figura 13. Utensílios para citocentrifugação.



Vantagens:

Requer pouco volume (0,1 a 0,5 mL por lâmina).

Alta confiabilidade do resultado: as células da amostra serão depositadas numa região pequena da lâmina medindo 5 mm de diâmetro.

Procedimento:

- 1- Pipetar 0,5 mL da amostra no citofunil, previamente acoplado ao citoclipe, à lâmina e ao papel absorvente.
- 2- Centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos.
- 3- Retirar o conjunto e desacoplar a lâmina.
- 4- Deixar secar ao ar e/ou fixar em álcool 95% imediatamente. Se o método de coloração for o May-Grünwald-Giemsa, deixar secar ao ar.

Figura 14. Procedimento para citocentrifugação.



D. Bloco celular ou cell block (Figura 14)

É um procedimento que reúne as técnicas citopatológicas e histopatológicas e é utilizado quando se deseja obter uma alta concentração celular, complementando o diagnóstico, com a vantagem de aproveitar todo o sedimento da amostra, além de permitir a armazenagem desse sedimento para futuras análises, se necessário. Essa técnica é empregada em citodiagnóstico de amostra líquida ou pastosa, quando há dificuldade para fechar diagnóstico de tumores pouco diferenciados.

Fixação – vários são os fixadores utilizados para o *cell-block*, alguns inclusive adicionam corantes para facilitar a visualização da amostra durante e após o processamento. Destacamos alguns fixadores a seguir:

• **Formalina 10%:**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada	900mL

• **Formol-Salina:**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Cloreto de sódio (NaCl).....	9 g

• **AFA ou FAA – álcool - formalina - ácido acético (muito utilizado para *cell-block*):**

Etanol (95 - 100%).....	85 mL
Formaldeído comercial	10 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

• **Carnoy:**

Álcool etílico absoluto.....	60 mL
Clorofórmio.....	30 mL
Ácido acético glacial.....	10 mL

• **Líquido de Bouin:**

Solução saturada de ácido pícrico (aquosa).....	75 mL
Formaldeído comercial.....	25 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

Tempo de fixação: 4-24 horas. (para linfoma deve-se deixar de 48-72 horas).

Tratamento prévio dos cortes para a remoção do ácido pícrico:

- 1- Desparafinizar e hidratar até o álcool 95%.
- 2- Colocar as lâminas em uma solução de álcool 70% saturado com carbonato de lítio durante 5 minutos.
- 3- Lavar em água corrente durante 3 minutos.
- 4- Lavar em água destilada durante 5 minutos.

E. B-5 ou formalina tamponada sublimada:

Muito utilizada para amostras contendo sangue.

Solução estoque:

Cloreto de mercúrio ($HgCl_2$).....	12 g
Acetato de sódio (CH_3COONa)	2,5 g
Água destilada.....	200 mL

Solução de uso (preparar somente antes do uso):

Solução estoque de B-5.....	20 mL
Formaldeído comercial.....	2 mL

Tratamento prévio dos cortes para remoção de pigmento de mercúrio:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes
- 2- Imergir durante 5 minutos na solução de lugol sob agitação.
- 3- Lavar em água.
- 4- Colocar as lâminas em tiosulfato de sódio 5% por 1 minuto ou até a completa remoção da cor amarela do lodo.
- 5- Lavar em água corrente durante 5 minutos.

Solução de lugol:

Iodo (I ₂).....	2,5 g
Álcool 70%.....	500 mL

Procedimento para *cell-block*:

- 1- Centrifugar as amostras por 10 minutos a 1.000 rpm.
- 2- Desprezar o sobrenadante, retirar o sedimento e fixar as amostras de 5 minutos a 1 hora – o tempo de fixação pode variar de acordo com o fixador e a quantidade da amostra. Proceder à fixação colocando o sedimento no líquido fixador que se encontra em frasco apropriado para sedimentação.
- 3- Centrifugar novamente por 2 minutos na mesma rotação, retirar o fixador e manter o sedimento formando um *pellet*.
- 4- Iniciar a desidratação com etanol 80% e seguir com um banho de etanol 95% e dois banhos de etanol 100%. O tempo de desidratação também varia de acordo com a quantidade da amostra, podendo variar de 5 minutos até 1 hora em cada banho. Centrifugar durante poucos minutos em cada banho.
Obs. Esta etapa e as seguintes podem ser realizadas no processador automático de tecidos, desde que o *pellet* da amostra se encontre envolto em papel de filtro, evitando a perda do material durante o processamento.
- 5- Clarificar em dois banhos de xilol, variando de 5 a 15 minutos. Centrifugar ao final por poucos minutos para formar o *pellet*.
Obs. Para retirar o xilol, deve-se descartar o sobrenadante e secar o *pellet* com papel absorvente.
- 6- Fazer dois banhos, de 15 minutos a 1 hora, em parafina

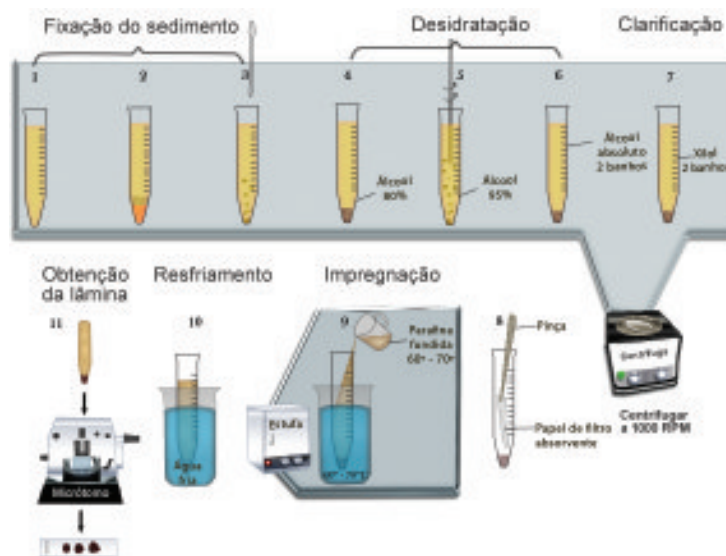
fundida na estufa; o tempo varia de acordo com o tamanho do *pellet* formado.

7- Esfriar e retirar o *pellet* impregnado pela parafina.

8- Montar um bloco de parafina.

9- Seccionar o bloco em micrótomo e corar pelo método desejado.

Figura 15. Processamento manual para *cell-block* (esquema adaptado do original do Dr. N. Fukushima, Doai Memorial Hospital, Tóquio).



4. Colorações citológicas

A qualidade da coloração citológica está diretamente relacionada às características tintoriais dos corantes, ao processamento da amostra (espessura dos esfregaços) e à fixação. Esses cuidados devem ser observados para se evitar artefatos e dificuldade de análise do material.

Muitas colorações histológicas podem ser empregadas na citologia, algumas das quais com pequenas modificações. Os métodos mais empregados

são o mucicarmin de Mayer, May-Gruenwald-Giemsa, hematoxilina e eosina, ácido periódico Schiff (PAS), Grocott, Shorr, entre outros. Porém, o método de Papanicolaou (Pap) é o mais difundido e empregado, pela grande demanda diagnóstica, e por ser a coloração comumente aplicada às amostras colpocitológicas para diagnóstico de câncer ginecológico.

O método de Papanicolaou utiliza um conjunto de corantes e tem como objetivo a evidenciação das variações na morfologia e dos graus de maturidade e de atividade metabólica celular. Esse método se baseia nas ações de um corante básico (com afinidade pelo núcleo das células: a hematoxilina), um corante ácido (que se combina com o citoplasma das células queratinizadas: orange G) e um corante policromático (que oferece tonalidades de cores diferentes no citoplasma das células: EA-65).

Este método abrange cinco etapas:

- Hidratação: esta etapa requer a reposição gradual da água das células por meio de banhos alcoólicos de concentrações decrescentes até a água destilada.
- Coloração nuclear: as células hidratadas podem agora receber um corante aquoso para corar os núcleos (hematoxilina de Harris).
- Desidratação: para receber corantes alcoólicos citoplasmáticos, devemos agora retirar a água das células com banhos alcoólicos de concentrações crescentes.
- Coloração citoplasmática: nesta etapa, o citoplasma das células é corado pelos corantes orange G e EA-65, de modo a diferenciar com diversas tonalidades o citoplasma das células de acordo com a sua maturidade e metabolismo.
- Desidratação, clarificação e selagem: a água agora deve ser retirada com concentrações alcoólicas crescentes, clarificadas e seladas com meios permanentes hidrofóbicos.

Descreveremos a seguir os métodos mais empregados. Outros métodos estão descritos na literatura recomendada.

A. Método de Papanicolaou (Papanicolaou, 1942)

Soluções:

- Hematoxilina de Harris (Harris, 1900)

Hematoxilina.....	5,0 g
Etanol 100%.....	50,0 mL
Alúmen de potássio [KAl(SO ₄) ₂].....	100 g
Água destilada.....	1.000 mL
Óxido de mercúrio (HgO – pó vermelho).....	2,5 g

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente com capacidade para 2.000 mL, para evitar que derrame quando a solução entrar em ebulição. Misture a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente em outro recipiente separado. Lentamente, combine as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e acrescente lentamente o óxido mercúrio, com cuidado, pois o óxido reage com a solução fazendo-a entrar rapidamente em ebulição, podendo sair, inclusive, do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que tome a tonalidade púrpuro-escura. Esfrie, e a solução estará pronta.

Para uso:

Acrescente 20 mL de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos.

Filtre sempre antes de cada uso.

- Ácido-álcool a 1%:

Ácido clorídrico (HCl).....1 mL
Etanol 70%..... 99 mL

- Água amoniacal:

Hidróxido de amônio (NH OH).....2 a 4 mL
Água destilada.....800 a 1.000 mL

- Corante orange G:

Solução estoque de orange G 10%:

Orange G.....10 g
Água destilada.....100 mL

Solução de uso do orange G :

Solução estoque.....20 mL
Ácido fosfotúngstico [$H_3P(W_3O_{10})_4$].....0,15 g
Etanol 95%.....980 mL

- Corante EA-65:

Soluções estoque eosina Y a 20%:

Eosina Y.....20 g
Água destilada.....100 mL

Solução estoque *light-green* SF a 3%:

Light-green SF.....3 g
Água destilada.....100 mL

Solução de uso do EA-65:

Solução estoque de eosina Y.....	20 mL
Solução estoque de <i>light-green</i> SF.....	10 mL
Ácido fosfotúngstico [$H_3P(W_3O_{10})_4$].....	2 g
Etanol 95%.....	700 mL
Metanol absoluto.....	250 mL
Ácido acético glacial.....	20 mL

Método

1- Etanol 80%.....	5-10 mergulhos
2- Etanol 70%.....	5-10 mergulhos
3- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
4- Água destilada I.....	5-10 mergulhos
5- Água destilada II.....	5-10 mergulhos
6- Hematoxilina de Harris	1-5 minutos
7- Água destilada.....	5-10 mergulhos
8- Diferenciar em álcool-ácido.....	3 mergulhos
9- Água destilada.....	5-10 mergulhos
10- Banho de água amoniacal.....	5 mergulhos
11- Água destilada.....	5-10 mergulhos
12- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
13- Etanol 70%	5-10 mergulhos
14- Etanol 95%.....	5 a 10 mergulhos
15- <i>Orange G</i> , solução de trabalho.....	1 minuto
16- Etanol 95%.....	5-10 mergulhos

- 17- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 18- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 19- Eosina-EA65, solução de trabalho.....5 minutos
- 20- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 21- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 22- Etanol 95%.....5-10 mergulhos
- 23- Etanol 100% I5-10 mergulhos
- 24- Etanol 100% II5-10 mergulhos
- 25- Etanol 100% III5-10 mergulhos
- 26- Xilol I.....5-10 mergulhos
- 27- Xilol II.....5-10 mergulhos
- 28- Xilol III.....5-10 mergulhos
- 29- Selar em meio hidrófobo.

Resultado:

- Células escamosas maduras.....róseo-avermelhada
- Núcleo.....vermelho-arroxeadado
- Células metabolicamente ativas..... verde-azulado
- Citoplasma queratinizado..... laranja ou amarelo

B. Método de May-Grünwald-Giemsa

Esse método de coloração é aplicado em distensões para a análise de elementos figurados do sangue periférico, medula óssea, ou elementos celulares colhidos por punção, esfoliação, *imprint* de tecidos ou concentrado de líquidos celulares, por meio de dois corantes.

Soluções:

- Solução estoque de May-Grünwald (vendida comercialmente – artigo Merck 1524).

- Solução estoque de Giemsa (vendida comercialmente – artigo Merck 9204).

- Tampão Sorensen pH 6,8.

- Solução A - fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 0,2 M:

NaH_2PO_427,8 g

Água destilada.....1.000 mL

- Solução B - fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0,2 M:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$28,39 g

Água destilada1.000 mL

- Solução de uso:

Solução A	Solução B	pH final 6,8
51 mL	49 mL	100 mL

- Solução de uso de May-Grünwald:

Solução estoque de May-Grünwald.....25 mL

Tampão Sorensen pH 6,8.....190 mL

• Solução de uso de Giemsa:

Solução estoque de Giemsa.....25 mL

Tampão Sorensen pH 6,8.....190 mL

Nota: As concentrações finais das soluções de uso de May-Grünwald e Giemsa podem ser ajustadas se necessário. Elas sempre devem ser preparadas antes de usar e desprezadas após o uso.

Método:

- 1- Fixar em metanol por 15 minutos.
- 2- Corar pela solução de uso de May-Grünwald por 5 minutos.
- 3- Escorrer o corante da lâmina.
- 4- Corar pela solução de trabalho de Giemsa por 10 minutos.
- 5- Lavar em tampão Sorensen pH 6,8.
- 6- Deixar secar à temperatura ambiente.
- 7- Clarificar com xilol.
- 8- Selar com meio hidrofóbico.

Resultados:

Núcleos dos leucócitos.....azul-pálido
Citoplasma.....azul muito claro ou incolor
Granulações neutrófilas.....vermelho-claro
Granulações basófilas.....azul-escuro
Eosinófilos e eritrócitos.....vermelho-alaranjado.

Método de Shorr

Este método de coloração possui resultados semelhantes ao método de Papanicolaou, sendo aplicado como seu substituto em vários laboratórios de citopatologia.

Soluções:

- Solução corante de Shorr

Biebrich <i>Scarlet</i>	5,0 g
Orange G ou II.....	2,5 g
<i>Fast Green</i>	1,0 g
Ácido fosfomolibdico $H_3P(Mo_3O_{10})_4$	5,0 g
Ácido fosfotúngstico $[H_3P(W_3O_{10})_4]$	5,0 g
Ácido Acético Glacial.....	10 mL
Etanol 50 %.....	1.000 mL

Método:

1- Etanol 80%.....	5-10 mergulhos
2- Etanol 70%.....	5-10 mergulhos
3- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
4- Água destilada.....	5-10 mergulhos
5- Água destilada.....	5-10 mergulhos
6- Hematoxilina de Harris.....	1-5 minutos
7- Água destilada.....	5-10 mergulhos
8- Diferenciar em álcool-ácido.....	3 mergulhos.
9- Água destilada.....	5-10 mergulhos
10- Banho de água amoniacal.....	5 mergulhos

11- Água destilada.....	5-10 mergulhos
12- Etanol 50%.....	5-10 mergulhos
13- Etanol 60%.....	5-10 mergulhos
14- Corante de Shorr.....	6 minutos
15- Etanol 95% I.....	5-10 mergulhos
16- Etanol 95% II.....	5-10 mergulhos
17- Etanol 95% III.....	5-10 mergulhos
18- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
19- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
20- Etanol 100%.....	5-10 mergulhos
21- Xilol I.....	5-10 mergulhos
22- Xilol II.....	5-10 mergulhos
23- Xilol III.....	5-10 mergulhos

Resultados

Células eosinofílicas.....	citoplasma vermelho / laranja
Células basofílicas.....	citoplasma azul / esverdeado
Núcleos.....	azul / violeta escuro / marrom

Referências Bibliográficas

- CAPUTO, L. F. G. *Manual da disciplina de histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. 112 p.
- COPETTI, N. *Manual de técnicas citológicas da Faculdade de Medicina da UFRGS*. Porto Alegre: UFRGS, 2004. 31 p.
- HARRIS, H. F. On the Rapid Conversion of Haematoxylin into Haematein in Staining Reactions. *J. Appl. Microsc.*, v. 3, p. 777-780, 1900.
- PAPANICOLAOU, G. N. A New Procedure for Staining Vaginal Smear. *Science*, n. 95, p. 438-439, 1942.

Para saber mais:

JUNQUEIRA, C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983. 123 p.

LOWE, J. *Histotechnology Technical Methods: Stain for Air Dried Cytology Preparations*. Disponível em : <http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/mgg.html>. Acesso em: 20 jul. 2009.

MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 3. ed. São Paulo: EPU, 1981. 295 p.

OLIVEIRA, M. L. C. S.; MOTA, A. R. C.; VIERO, R. M. *Citotecnologia – manual de normas técnicas*. São Paulo: Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp), Laboratório de Citologia, Departamento de Patologia, 2000. 24 p.

PROPHET, E. B. et al. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992 . 279 p.

WOODS, A. E.; ELLIS, R. C. *Laboratory Histopathology – A Complete Reference*. Nova York: Churchill Livingstone, 1994. v. 2.

Capítulo 5

Cultivo celular

Emanuele Amorim Alves
Anna Christina Rosa Guimarães

1. Histórico de desenvolvimento da tecnologia de cultura de tecidos

1.1. Histórico da cultura de células

O cultivo de células se iniciou no princípio do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em um meio ambiente controlado. Essa técnica ainda é uma importante ferramenta de pesquisa nos laboratórios do mundo inteiro.

Os primeiros experimentos consistiam em cultivo de tecidos fragmentados mecanicamente em frascos contendo fluidos dos animais de onde provinham os tecidos. Devido a essa forma de cultivo, durante mais de 50 anos essa técnica foi chamada cultivo de tecidos – do inglês *tissue culture* –, sendo esse termo atualmente usado genericamente para denominar tanto o cultivo de células quanto o de tecidos e de órgãos.

Harrison foi um pioneiro no uso de cultura de células. Na época, ainda havia dúvidas da dinâmica do desenvolvimento do tecido nervoso, pois somente observações microscópicas não forneciam informações sobre esse processo. Harrison queria provar que as fibras nervosas eram formadas a partir de células nervosas. Para isso ele necessitou observar essas células fora do organismo para comprovar sua teoria. Mas como seria possível um tecido viver fora do organismo original? Harrison levou em consideração as necessidades básicas de uma célula e desenvolveu um experimento no qual ele mimetizou tais condições. Assim, ele dissecou o tubo medular de um embrião de sapo e o mergulhou em sua linfa fresca. Esta linfa em instantes se coagulou e, logo em seguida, Harrison selou o frasco com parafina, observando a sua preparação ao microscópio todos os dias. Uma das vantagens desse experimento era a falta de necessidade de controle de temperatura, já que os anfíbios são animais cuja temperatura varia com a temperatura ambiente. Harrison teve o cuidado de manter as condições assépticas, e suas considerações sobre a possibilidade de se manter *in vitro* células vivas por mais de uma semana foram um marco para a cultura de células.

Com esse experimento, Harrison confirmou a sua hipótese, provando que as fibras nervosas são formadas a partir das células nervosas. Com isso, muitos outros cientistas passaram a se interessar por esse modelo de experimento, introduzindo o uso de cultura de células em suas pesquisas.

Em 1912, Alexis Carrel, utilizando informações obtidas nas observações de Harrison, desenvolveu um modelo a partir de células cardíacas de embrião de galinha para o cultivo. Seus experimentos foram muito importantes, pois com Carrel descobriu-se a necessidade da troca de fonte de nutrientes contidos nos frascos. Essa renovação constante de nutrientes em cultivo permitiu que as células pudessem ser cultivadas por períodos ainda maiores do que os utilizados por Harrison.

Em 1951, George Gey cultivou células de tecido tumoral humano estabelecendo a linhagem HeLa, utilizada até hoje em todo o mundo. O fato

de que tumores humanos poderiam dar origem a células contínuas em linhagem aumentou o interesse pelo cultivo de tecidos.

O avanço na cultura de células ocorreu, em grande parte, por intermédio dos experimentos de Hayflick e Moorhead, em 1961, considerados clássicos, nos quais eles utilizaram células de vida finita.

Em 1962, Nakamura e colaboradores, no Japão, estabeleceram a linhagem VERO, oriunda de rim de macaco-verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Essa célula é uma das poucas, na atualidade, aprovadas para uso em produção de vacinas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), o que a torna um excelente modelo de pesquisas para o desenvolvimento de novas vacinas.

Muitas outras linhagens foram estabelecidas pelos pesquisadores. Atualmente, a cultura de células não se limita ao estudo do comportamento de determinado tecido ou célula *in vitro*. Seu uso se estende à medicina, pois células em cultivo têm importante papel no tratamento de doenças degenerativas. Para a terapia celular, as pesquisas com células-tronco são um marco nessa área que, de ferramenta para outros estudos, tornou-se a protagonista do desenvolvimento tecnológico mundial.

1.2. Tipos de culturas

Células em cultivo são um modelo de função fisiológica muito contraditório, devido à perda de características que ocorre durante o seu desenvolvimento em cultura. A proliferação *in vitro* difere daquela *in vivo*. Assim, por mais próximo que esse modelo esteja da realidade, o processo *in vitro* ainda causa problemas para o desenvolvimento celular. Sua adesão célula – célula e célula – matriz é reduzida, não possui as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado.

Células que, num momento anterior, cresciam tridimensionalmente agora se encontram em um meio que favorece o espalhamento, a migração e a proliferação de células não especializadas que expressem diferentes funções. A

escolha do meio ideal é um caminho a se seguir para a obtenção de uma cultura que expresse uma função específica.

Apesar disso, ainda existem muitas vantagens no uso de cultura de células como modelo experimental. O controle do ambiente, a homogeneidade da amostra, quando comparada ao uso de animais em experimentos, e a economia são as principais vantagens dessa técnica. Atualmente, com a implementação das Comissões de Ética de Uso de Animais em Pesquisa (CEUA), a cultura de células é o principal modelo alternativo para a substituição dos animais em experimentos de pesquisa.

1.2.1. Células primárias, células estabelecidas e células transformadas

Uma cultura primária é estabelecida a partir do crescimento de células oriundas de um fragmento de tecido obtido por desagregação mecânica ou enzimática. As células que conseguem sobreviver ao processo de desagregação e aderirem à garrafa formarão a primeira monocamada de células daquele tecido. Essas células possuem as características do tecido de origem, podem crescer em cultura por um determinado período de tempo e são denominadas **células primárias**. Essa forma de cultivo é a mais utilizada para estudar o comportamento de determinada célula *in vitro* devido à presença de suas características genótípicas e fenotípicas.

As células primárias que conseguem manter suas características originais possuem um tempo de vida curto. No organismo, a morte celular é um mecanismo para renovação tecidual. Essa morte é programada e não causa danos. Esse processo é denominado **apoptose**. Na apoptose, a célula não é rompida, ela simplesmente se “autodigere”, formando botões apoptóticos que são degradados.

À medida que a cultura é repicada, as células com uma maior capacidade de proliferação irão predominar na garrafa de cultivo em detrimento das células que não se adaptaram bem ao cultivo ou que, devido a traumas do processo de desagregação, não possuem uma taxa normal de proliferação.

Essas células ainda não perderam as características do tecido de origem, mas possuem alta proliferação. Esse tipo de célula é chamado **linhagem celular contínua**, e é muito utilizado em pesquisa, pois pode ser mantido em cultura por um grande período de tempo (quando comparado às células primárias) e ainda guarda grande parte das características do tecido original. Muitas linhagens celulares contínuas podem ser propagadas sem perder suas características por até oitenta passagens, além de serem euploides, ou seja, possuem um número de cromossomos múltiplo do número original da espécie. Essas células são muito utilizadas em pesquisa e na produção de vacinas, como é o caso da linhagem MRC-5, oriunda de tecido de pulmão de feto humano e utilizada na produção da vacina de rubéola.

No momento em que as características genéticas das células são modificadas, elas deixam de ser semelhantes morfológica e geneticamente ao tecido original e são então chamadas **células transformadas**. Tais células podem ser transformadas em cultura utilizando-se substâncias químicas, vírus ou agentes físicos como a luz ultravioleta.

A transformação celular é uma alteração genética que permite mutações em genes responsáveis pelo controle do ciclo celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor). A mutação pode resultar de uma superexpressão de proto-oncogenes ou da inativação de genes supressores de tumor. O principal reflexo dessa mutação é a presença da telomerase ativa. Durante a divisão, a célula perde um pedaço da porção final de seus cromossomos – o telômero. Esse processo é um tipo de controle para que a célula, ao “checar” se há possibilidade de divisão (*check point*), realize apoptose ao perceber que seu DNA está danificado a ponto de alterar alguma transcrição. A telomerase repõe o telômero perdido permitindo que a célula se divida indefinidamente sem que perca um pedaço de seu DNA codante. A proliferação exacerbada está diretamente ligada ao processo de transformação.

As células transformadas também podem ser obtidas diretamente de tecidos já mutados, como é o caso de tecidos tumorais. O exemplo mais famoso desse tipo de célula são as células HeLa oriundas de um tumor de cérvix uterina humana. As células HeLa são células genética e morfologicamente diferentes do tecido original, e não possuem dependência de ancoragem nem inibição por contato, além de serem capazes de proliferar infinitamente quando em cultura.

Essas células são muito utilizadas em estudos de citotoxicidade, controle de qualidade, entre outros. As células transformadas não são ainda amplamente utilizadas na produção de vacinas, em face do risco de o DNA alterado dessa célula alterar o DNA do indivíduo que fez uso dessa vacina. A única célula transformada usada na fabricação de vacinas é a célula VERO. Porém, existem controles rígidos quanto à quantidade de DNA celular residual presente em cada vial¹ da vacina. A OMS estabelece um limite de 10 ng de DNA por vial.

1.2.2. Células aderentes e células não aderentes

As células em cultura possuem, inicialmente, características semelhantes aos seus tecidos de origem. Assim, células provenientes de tecidos epiteliais terão uma maior dependência de interação célula – célula, enquanto células hematopoiéticas não necessitam de nenhuma interação.

As células cultivadas podem apresentar dois aspectos distintos, isto é, podem ser aderentes ou não aderentes, o que significa dizer que algumas células poderão se ligar ao fundo da garrafa de cultura enquanto outras ficarão em suspensão no meio. As **células aderentes** são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem, ou seja, necessitam de adesão a uma superfície de contato para que possam iniciar a sua proliferação. Para as células aderentes, as garrafas de cultura devem possuir uma carga negativa. Essa

¹ Frasco de vidro com volume variado utilizado no armazenamento de produtos biológicos.

carga medeia a produção de proteínas de adesão e proteoglicanos que irão iniciar o processo de adesão da célula à superfície da garrafa. É a matriz extracelular que interage com a carga negativa da garrafa e, então, as células se ligam à matriz por receptores específicos. Nas células epiteliais ainda há a interação célula – célula mediada por moléculas de adesão célula – célula (CAMs) e pelas caderinas (dependentes de Ca^{+2}).

Quando em cultura, as células aderentes se espalham por todo o fundo da garrafa formando o que é chamado monocamada celular.

As células **não aderentes** podem ser cultivadas em suspensão no meio e são derivadas de tecidos que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver. Essa capacidade está restrita às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral.

Figura 1. Linhagem MA 104 (rim de macaco-verde africano). Linhagem aderente.

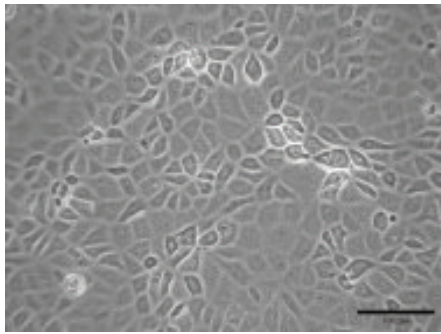
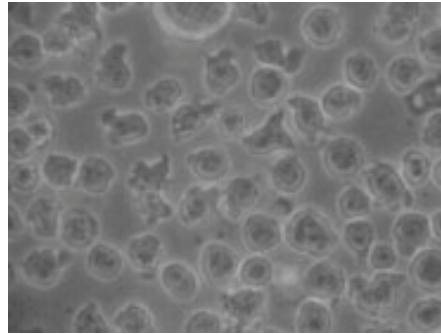


Figura 2. Linhagem MM6 (monocítica leucêmica humana). Linhagem não aderente.



Fonte: Fotos cedidas pelo Setor de Cultura de Células do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fiocruz.

2. Biossegurança aplicada a laboratórios de cultivo celular

Como em qualquer atividade laboratorial, antes do início do cultivo celular, deve-se planejar o trabalho a ser realizado de modo a executá-lo com segurança.

Deve ser preparado um procedimento com as especificações das atividades realizadas e todo pessoal deve ser orientado sobre os possíveis riscos e para a necessidade de seguir as especificações de cada rotina de trabalho, os procedimentos de biossegurança e práticas de segurança.

Há, pelo menos, 24 casos documentados de infecção em funcionários de laboratório que manipulam culturas de células primárias (por exemplo, células de macaco *Rhesus*) nos últimos 30 anos.

Embora um número limitado de infecções adquiridas em laboratórios tenha sido relatado como resultado da manipulação de células humanas e de outros primatas, há um risco significativamente maior em adquirir uma infecção pelo HIV ou pelo HBV por meio da exposição ao sangue humano e a outros líquidos corporais.

Os riscos potenciais associados às células e tecidos humanos incluem os patógenos do sangue HBV e HIV, bem como agentes presentes nos tecidos humanos, como *Mycobacterium tuberculosis*, que pode estar presente nos tecidos pulmonares.

Outros riscos potenciais aos trabalhadores são representados pelo uso de células transformadas por agentes virais, como o SV-40, assim como as células que carregam material genético viral. As células humanas tumorigênicas também podem oferecer riscos potenciais como resultado de uma autoinoculação.

Além do risco biológico, um laboratório de cultivo celular possui os riscos:

- químicos – líquidos combustíveis, corantes tóxicos (azul de Tripan, MTT, bis-benzimida), gases tóxicos;
- físicos – calor, radiação, vibração e frio.

2.1. Barreiras de contenção no trabalho em cultura de células

Antes de iniciar os procedimentos de manipulação, o pesquisador, ou técnico, deve usar guarda-pó limpo ou descartável, gorro, máscara cirúrgica e sapatilha, como contenção primária. Lavar as mãos e a parte anterior do antebraço com água e sabão, preferencialmente antisséptico, realizar antissepsia das mãos com álcool 70% (v/v) e calçar luvas cirúrgicas. Tais procedimentos são muito importantes para a manipulação de células. O profissional não deve usar anéis, pulseiras, relógios ou outros ornamentos durante as manipulações.

Células animais devem ser manipuladas usando-se as práticas e a contenção do nível de biossegurança 2. O trabalho deve ser realizado em cabine de segurança biológica, e todo o material deverá ser descontaminado antes do descarte. A contenção secundária é obtida mediante a combinação de elementos relacionados à infraestrutura laboratorial.

2.2. Infraestrutura laboratorial

A organização de um laboratório voltado à pesquisa com células depende da sua finalidade e do número de pessoas que nele vão trabalhar. De maneira geral, o laboratório necessita dos seguintes espaços:

- área para lavagem e esterilização;
- área para preparo de meios;
- área para incubação e observação das culturas;
- área para manipulação asséptica das culturas.

As diversas áreas devem estar funcionalmente distribuídas, facilitando o deslocamento de pessoal e o fluxo de materiais, com a menor circulação possível nas áreas de manipulação asséptica das culturas.

A área destinada a manipulações, onde se localizam as cabines de fluxo, deve ser preferencialmente fechada e muito limpa. Deve-se trabalhar com avental limpo, exclusivo para uso nessa sala.

A superfície das bancadas deve ser impermeável à água e resistente a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado. As instalações devem ser desenhadas de modo a permitir espaços entre as bancadas, equipamentos e cabines, que devem permitir fácil limpeza.

Os equipamentos necessários também dependem das finalidades do laboratório. Em geral, o laboratório necessita de:

- estufa incubadora com atmosfera de CO_2 ;
- autoclave;
- deionizador de água;
- estufa para secagem de material;
- cabine de segurança biológica (câmara de fluxo de ar laminar estéril);
- medidor de pH;
- balança analítica;
- geladeira;
- freezer;
- microscópio invertido;
- agitador magnético;
- centrífuga refrigerada;
- banho-maria;
- bomba de vácuo.

Para trabalhos com culturas de células, inúmeros instrumentos são necessários, tais como: câmara para contagem, pipetador automático, micropipetas, estante para tubos, além de uma variedade de vidrarias e reagentes necessários para preparo de meios de cultura e soluções.

As salas devem ser sinalizadas com símbolo universal de risco biológico, com acesso restrito à equipe técnica de apoio.

2.3. Limpeza, desinfecção e esterilização

A superfície da área de trabalho deve sempre ser limpa, utilizando-se álcool a 70% (v/v), uma vez por dia ou após cada atividade. O álcool etílico a 70% (v/v) é um excelente desinfetante por sua ação de limpeza ou detergente, sendo eficaz também na redução da flora bacteriana da pele. Suas propriedades desidratante e desnaturante de proteínas podem ser responsáveis por sua ação antimicrobiana.

A água sanitária comercial (2% a 5% de cloro) é, também, um bom desinfetante quando diluída de 5 a 10 vezes, por ser um agente oxidante e agir sobre os constituintes da membrana, levando os microrganismos à morte.

Todo material aquecido no banho-maria, como meios de cultura e soluções, deve ter processo prévio de assepsia antes de sua introdução na cabine de segurança biológica. Deve-se, ao retirar o material do banho-maria, remover o excesso de umidade com auxílio de uma gaze e posterior limpeza com álcool 70% (v/v).

Antes de se iniciarem os procedimentos, a câmara interna do fluxo deve ser limpa com gaze embebida em álcool etílico 70% (v/v). O fluxo de ar, assim como a lâmpada de ultravioleta devem ser ligados trinta minutos antes do uso. Todo material deve ser limpo com álcool etílico a 70% (v/v) antes de ser introduzido na câmara. Após o término dos procedimentos, deve-se realizar a limpeza da câmara interna, removendo possíveis sujidades. Manter o intervalo

de pelo menos vinte minutos, com o fluxo de ar e a lâmpada de ultravioleta ligados, antes de iniciar outro procedimento ou encerrar as atividades. Realizar avaliação e monitoramento ambiental da cabine pelo método de exposição de placas, tal como descrito no item “controle microbiológico de ambientes e processos”.

2.4. Controle microbiológico de ambientes e processos

○ trabalho com cultivos celulares exige uma série de cuidados para se reduzirem os riscos de contaminação. As técnicas assépticas reduzem a probabilidade de infecção, sendo importante que sejam mantidas a todo momento: antes, durante e ao término do experimento. A necessidade de manutenção da assepsia inclui uma série de procedimentos que vão desde a esterilização dos meios de cultura e instrumentos, até a adoção de quarentena para os cultivos novos. Isso porque as células são cultivadas em meios ricos em nutrientes e a possibilidade de ocorrer propagação de microrganismos contaminantes é alta.

As culturas, assim como todos os resíduos da manipulação, devem ser descontaminadas, antes do descarte, em autoclave durante uma hora a 121°C. Culturas contaminadas não devem ser abertas para lavagem antes da descontaminação. Esse material deve ser retirado do laboratório imediatamente em recipientes rígidos e à prova de vazamentos.

Deve-se controlar a temperatura e a umidade para evitar o crescimento de microrganismos no ambiente. A climatização de uma sala de 15m² (45m³) pode ser feita por um aparelho de ar condicionado de 15.000 BTUs, levando-se em conta que existe o aquecimento produzido pelos equipamentos.

○ monitoramento microbiológico da sala, bem como das cabines de segurança biológica para o cultivo de células, pode ser realizado pela pesquisa de microrganismos, como fungos e bactérias. Um procedimento rotineiro indicado para controle ambiental é o método de exposição de placas com meios

nutritivos ágar caseína de soja (*trypticase soy agar-TSA*) e ágar sabouraud 4% de glicose (Sab4).

O laboratório deve possuir um programa rotineiro adequado de controle de insetos e roedores. Todas as áreas que permitam ventilação deverão conter barreiras físicas para impedir a passagem de insetos ou outros animais.

3. Técnicas/conceitos para cultivo celular

3.1. Lavagem e preparo do material para cultura de células

A vidraria utilizada para cultura de células deve ser exclusiva e processada separadamente das demais.

A vidraria deve ser lavada imergindo-a em água com detergente neutro a 5%, durante 12 horas, e enxaguando-a 3 a 4 vezes em água comum, e 2 a 3 vezes em água destilada. O material limpo deve apresentar uma película uniforme de líquido nas paredes após o último enxágue. Caso não haja a formação desta película, o material deverá ser submetido a novo processo de lavagem, pois significa que há traços de gordura ou qualquer sujidade no material.

Frascos muito sujos, com resíduos aderidos, devem ser lavados com solução sulfocrômica (solução de bicromato de potássio a 3% em ácido sulfúrico concentrado 1:9), que requer muito cuidado no uso devido à presença do cromo IV (Cr^{+4}). Muitos materiais necessitam de uma lavagem prévia, sob agitação durante 5 a 10 minutos, em solução detergente.

A secagem do material deve ocorrer em estufa de secagem a 120°C, por aproximadamente 6 horas. O material limpo e seco não deve conter qualquer tipo de resíduo, mancha, coloração e/ou opacidade; caso contrário, o material deve ser submetido a um novo processo de lavagem.

A montagem e embalo podem ser realizados com envelopes e/ou bolsas próprios para esterilização, ou ainda material do tipo “não tecido”. Deve ser evitado o uso de papel Kraft por gerar aerossóis.

A esterilização da vidraria em geral é realizada por autoclavação sob pressão a 121°C por 20 minutos. Outros materiais podem ser esterilizados por mais tempo se necessário. Toda vidraria estéril também deve ser mantida livre de poeira em armários bem fechados. Pipetas graduadas e tubos de centrífuga são preferencialmente descartáveis.

3.2. Manutenção das culturas: propagação e criopreservação

3.2.1. Propagação celular

Para manter as células em cultura é necessário utilizar técnicas básicas que evitem a morte celular dentro da garrafa de cultivo. As células normalmente possuem inibição por contato e, quando em uma garrafa de cultivo, se a quantidade de células exceder um número tal que impossibilite o crescimento normal da monocamada, as células se inibirão e haverá morte. Assim, é extremamente importante que se retire quantidades de células periodicamente da garrafa de modo a manter a população sempre com um número ideal.

O processo de renovação de células de uma garrafa para outra é chamado **passagem**. O número de passagens se refere ao número de vezes que essa cultura foi subcultivada. Muitas linhagens contínuas são capazes de manter as características iniciais do tecido original com algumas passagens, enquanto as células transformadas não mantêm as características originais e são capazes de permanecer em cultura por um grande número passagens (chegando até virtualmente ao infinito número de passagens).

Para as células não aderentes, o procedimento de passagem se assemelha a uma diluição e basta retirar células da garrafa de cultivo, adicionando novo meio ao seu lugar. Isso ocorre porque estas células se encontram em suspensão no meio, sendo possível retirá-las sem que seja necessário um procedimento específico.

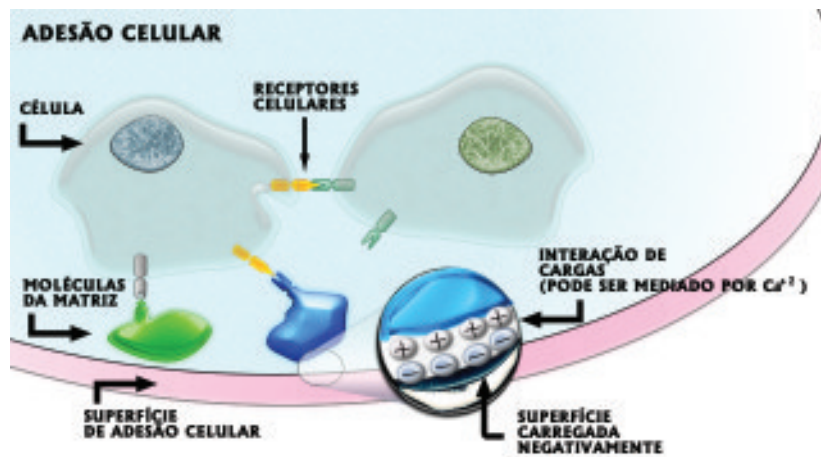
As células aderentes possuem um método específico para efetuar a sua passagem, por se encontrarem aderidas ao fundo da garrafa de cultivo. Para que as células aderentes possam se ligar ao fundo da garrafa é necessário que o fundo tenha uma carga negativa. Superfícies como vidro e metal, que possuem uma carga líquida negativa, são excelentes superfícies para a adesão celular.

Plásticos são muito utilizados em cultivo celular, mas para que o plástico desenvolva carga negativa é necessário um tratamento prévio com agentes químicos, como agentes oxidantes, ou físicos, como a luz ultravioleta e a radiação. A carga negativa é necessária, pois a adesão celular ocorre por meio de forças eletrostáticas e da interação dessas cargas com glicoproteínas de adesão e com cátions divalentes, como Ca^{+2} e Mg^{+2} . Esta interação, então, desencadeia uma sinalização intracitoplasmática que acarretará na produção e liberação de proteínas da matriz extracelular pela própria célula, onde a célula irá aderir, “espraiair” e iniciar sua proliferação.

A matriz extracelular de um tecido é uma mistura complexa de proteínas, glicoproteínas, lipídeos, glicolipídeos e mucopolissacarídeos. As macromoléculas que constituem a matriz são secretadas por células locais, especialmente fibroblastos. Essa matriz contém três importantes proteínas fibrosas – colágeno, elastina e fibronectina – contidas em um gel hidratado formado por uma rede de cadeias de glicosaminoglicanos. Todas essas macromoléculas são secretadas localmente por células em contato com a matriz.

Linhagens macrofágicas são uma exceção, pois sua adesão é mediada por proteoglicanos, um processo diferente do descrito.

Figura 3. Adesão celular medida por proteínas de adesão.



Os métodos de dissociação celular são classificados em mecânicos ou enzimáticos. No mecânico ocorre a desagregação da monocamada fisicamente com a ajuda do *rubber policeman*, um dispositivo semelhante a um rodo estéril que retira as células do fundo da garrafa de cultivo. Na desagregação enzimática ocorre a digestão das proteínas de adesão por proteases específicas ou não.

A dissociação de tecidos envolve a dissociação da matriz e a quebra dos contatos célula – célula, sem comprometer a membrana ou danificar a superfície celular.

A dissociação mecânica é utilizada principalmente para células macrófágicas devido à sua adesão diferenciada. Esse método consiste na retirada das células por meio de agentes físicos, o que é muito danoso para as culturas.

A dissociação enzimática é uma das principais aplicações das enzimas na cultura de células. Proteases são necessárias para romper a matriz extracelular e, assim, obter células individualizadas com a finalidade de transferir as culturas para um novo substrato. A enzima proteolítica inespecífica mais utilizada é a tripsina, que hidrolisa cadeias polipeptídicas nos radicais lisil-arginil formando

terminações de clivagem, éster e amida. Essa reação desestrutura a matriz, impossibilitando a ligação dos receptores da superfície celular, ligados ao citoesqueleto e à matriz, obrigando as células a rearrajarem seu citoesqueleto. Devido à inespecificidade da enzima, não se deve deixar a célula muito tempo em sua presença, para não haver lise celular.

3.2.2. Congelamento

Na natureza é muito comum que os indivíduos se adaptem cada vez mais ao meio ambiente por meio de mutações genéticas. Esse procedimento evolutivo descrito por Darwin ocorre em todos os seres vivos e não seria diferente pensar que também ocorreria em células cultivadas.

A partir do momento em que uma célula se encontra em uma cultura primária ocorrem adaptações para o seu estabelecimento como uma linhagem.

Células em cultura por longos períodos acabam perdendo suas características fenotípicas, pois após várias divisões, há grande probabilidade de ocorrerem alterações demasiadas em seu DNA.

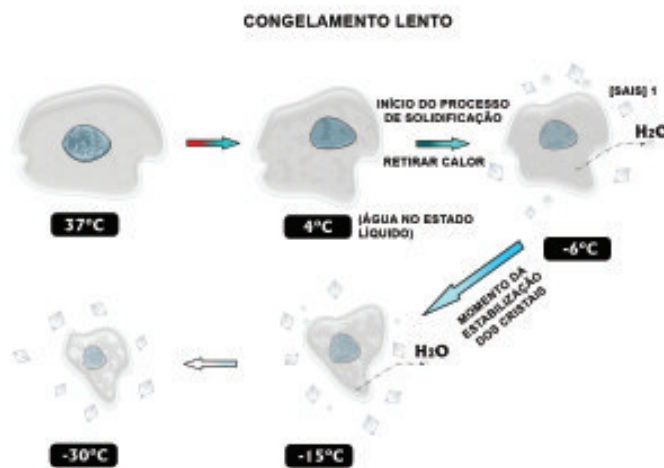
Manter células congeladas significa atrasar, em anos, quaisquer alterações que poderiam ocorrer quando em cultura. Tais alterações são dispensáveis para os laboratórios de cultura de células e os grandes bancos mundiais fornecedores de linhagens.

As células em cultura geralmente são congeladas em nitrogênio líquido em uma temperatura de -196°C . Nessa temperatura, todas as reações bioquímicas nas células ficam paralisadas impedindo qualquer alteração na cultura criopreservada.

O procedimento mais utilizado no congelamento celular é o lento. Nesse processo há diminuição da temperatura, vagarosamente acarretando a solidificação da água que se encontra no meio de cultura. Isso aumenta a concentração de soluto fora da célula e faz com que a água saia através do processo de osmose. A saída da água da célula faz com que ela murche.

Assim, à medida que a água sai, ela se congela no exterior, deixando a célula desidratada. Nesse processo, a água do meio externo é congelada formando cristais que podem se reorganizar no exterior da célula. A formação de cristais e reorganização dentro da célula leva ao rompimento da membrana celular, matando as células. Isso é impedido com o processo lento de congelamento.

Figura 4. Esquema do congelamento lento.



Quando o congelamento é lento, a viabilidade das células descongeladas é maior do que a das congeladas pelo método rápido, ou seja, quando imersas diretamente no nitrogênio líquido.

Mesmo controlando-se a velocidade de congelamento em 1 a 2°C por minuto e tendo o cuidado com a formação dos cristais, a célula sofrerá muitos danos nesse processo. Assim, para aumentar a viabilidade celular, utilizam-se crioprotetores.

Crioprotetores são substâncias que, sob diferentes mecanismos moleculares, tornam a membrana das células protegidas dos cristais. Os crioprotetores mais utilizados são o glicerol e o dimetilsulfóxido (DMSO).

O efeito protetor do glicerol se relaciona com a sua capacidade de ligação com a água e à sua baixa dissociação com sais, diminuindo a osmolaridade

do meio de congelamento. Além disso, suas hidroxilas são capazes de se ligar aos oxigênios do grupo fosfato dos fosfolipídeos de membrana, estabilizando-a no momento do congelamento.

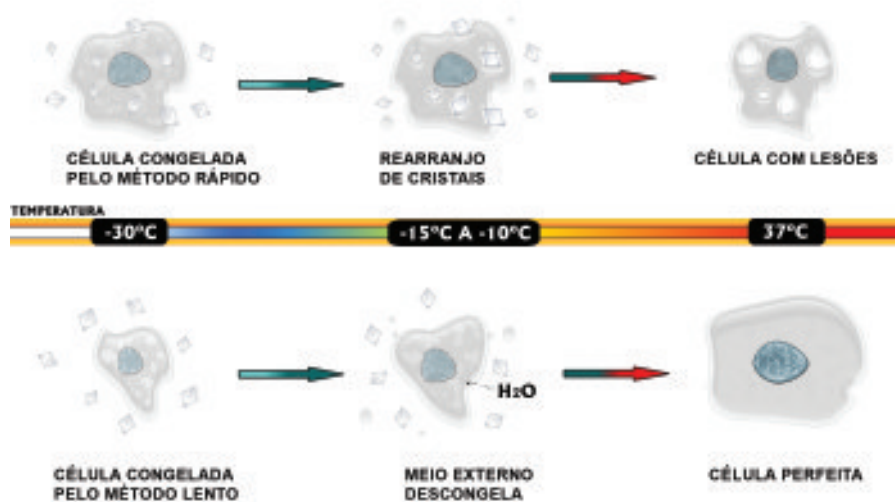
O DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar. Sua ação está relacionada à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, durante um congelamento, a molécula impede fases de transmissão dos lipídeos de membrana que chegam a promover a fusão de várias membranas.

Tanto o DMSO quanto o glicerol são tóxicos para as células e devem ser utilizados somente no momento do congelamento, sendo indispensável a sua retirada do meio após o descongelamento da cultura.

3.2.3. Descongelamento celular

O descongelamento geralmente ocorre de forma rápida. Simplesmente retira-se a ampola do tanque de nitrogênio líquido e coloca-se ela em água a 37 °C imediatamente.

Figura 5. Esquema de descongelamento lento.



Apesar de todo o cuidado durante o congelamento, o processo de criopreservação é danoso para as células e, portanto, após o seu congelamento as células devem ser colocadas em meio de cultivo com uma concentração de 20% de soro fetal bovino. As células aderentes devem ser lavadas após 24 horas de adesão para a retirada de células mortas.

Os procedimentos de congelamento e descongelamento são os mesmos para as células aderentes e para as não aderentes.

3.3. Quantificação celular

Quando se trabalha com experimentos que necessitam do uso de células em cultura é necessária a avaliação constante das células. Uma das formas de se avaliar o crescimento celular é utilizando-se métodos de quantificação celular. Quantificar uma cultura significa dizer quantas células se encontram em determinada garrafa de cultivo.

A quantificação é utilizada para definir a viabilidade celular, as condições de crescimento e o início de experimentos nos quais o número de células utilizado deve ser preciso.

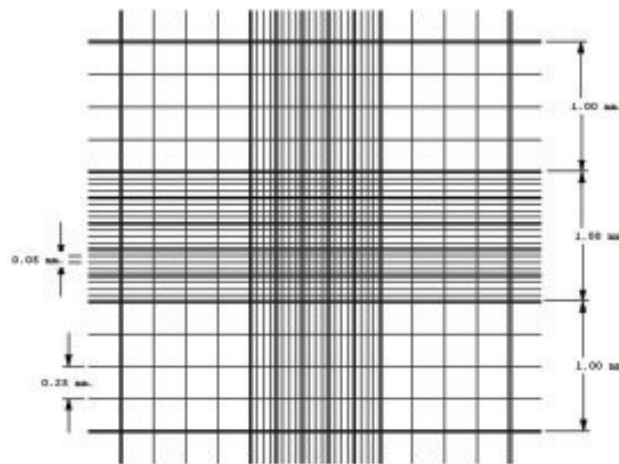
Existem duas maneiras de se quantificar células em cultura. Na forma direta, conta-se diretamente o número de células presente na garrafa de cultivo; a forma indireta é feita por meio da quantificação de determinadas estruturas celulares, como proteínas, ou pela medição do metabolismo celular.

Como forma de quantificação direta, o método mais utilizado é a contagem em câmara de Neubauer. No método indireto existem muitas técnicas baseadas no metabolismo celular ou até mesmo na dosagem de macromoléculas presentes na célula, como as proteínas ou o DNA.

Para a contagem em câmara de Neubauer, as células devem estar totalmente individualizadas. Para células aderentes, é necessário fazer uma tripsinização prévia, o que não é feito no caso de células não aderentes.

A câmara de Neubauer é uma lâmina de vidro com divisões que auxiliam na contagem, possuindo 9 quadrados que medem 1 mm^2 de área. O esquema de uma câmara ao microscópio ótico se encontra na Figura 6. Somente os quatro quadrados externos são utilizados na contagem de células animais. Cada quadrado externo é formado por mais 16 quadrados menores que auxiliam a contagem.

Figura 6. Esquema da câmara de Neubauer.



Para a contagem, é necessário colocar uma lamínula de vidro sobre a câmara, que servirá para conter a suspensão celular. O espaço formado entre a lamínula e a câmara é de 0,1 mm. Dessa forma, o volume determinado por cada quadrado é equivalente a $0,1 \text{ mm}^3$. As células contadas em um quadrado contidas em 1 mL equivalem ao valor de células contado multiplicado por 10^4 (fator de correção da câmara).

O número de células por mL de uma suspensão quando contado em câmara de Neubauer é obtido pela equação:

$$\frac{Q_1 + Q_2 + Q_3 + Q_4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = n^\circ \text{ de células / mL}$$

Para não ocorrer a contagem de uma célula mais de uma vez, deve-se fazer uma marcação em forma de “L” nos quadrados, para que, ao aparecerem células em cima das linhas, se contem somente as que estiverem sobre a marcação.

Para a análise de viabilidade celular utiliza-se o corante azul de Trypan, que não atravessa membranas íntegras. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração. Como as células mortas têm suas membranas danificadas, ocorre o fluxo de corante para o interior da célula fornecendo uma coloração azul.

Entre os métodos de contagem indireta mais utilizados estão o teste de brometo 3 - [4,5-dimetil-tiazol - 2-il] - 2,5 - difenil-tetrazólio (MTT) e o ensaio de coloração por Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBBR – 250).

A coloração por CBBR-250 se baseia na capacidade do corante de corar proteínas celulares. Assim, faz-se uma curva padrão com concentrações celulares conhecidas e também as leituras das amostras de cultura. Para isso, deve-se corar a cultura e depois eluir a solução corante, sendo lida em espectrofotômetro.

O ensaio do MTT se baseia na redução do MTT, um sal tetrazólico, pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de Formazan. O ensaio mede a respiração celular, que é proporcional à quantidade de Formazan produzida, e ao número de células viáveis em cultura. A vantagem desse método é a contagem somente do número das células viáveis, o que não ocorre com o método de CBBR – 250.

3.4. Conceitos básicos e controle da qualidade de cultivos celulares

Para a caracterização de células em cultivo é necessária a observação de vários aspectos, como a descrição do histórico da célula, incluindo sua origem (órgão, tecido, idade, sexo e espécie do doador), e a metodologia utilizada para obtê-la, histórico de passagens, meios de cultura usados e passagem em animais.

Testes como cariotipagem, análise de isoenzimas e *DNA fingerprinting* (impressão digital genética) servem como identificadores da espécie da linhagem celular, além de indicarem se há contaminação daquela cultura por outra célula humana ou animal.

É importante enfatizar que a autenticação celular é uma parte essencial no controle de qualidade de um cultivo, tanto para fins de pesquisa quanto para fins comerciais, devendo ser uma preocupação contínua e importante para qualquer laboratório de cultura de células.

Além de identificá-la, é importante avaliar se a célula está contaminada por fungos, bactérias, micoplasmas ou vírus.

3.4.1. Cariotipagem

A análise cromossômica de uma célula é um dos principais critérios utilizados na identificação de uma linhagem, pois relaciona a linhagem em cultivo a uma determinada espécie e sexo.

O método de cariotipagem é um exame citogenético que verifica o estado do cariótipo das células. Sua análise é feita por meio de várias colorações que evidenciam partes dos cromossomos. Por meio de análises visuais destes cromossomos e com auxílio de atlas de cariótipos é possível associar determinado mapa cromossomial de uma linhagem a uma espécie e ao sexo do indivíduo.

Para a cariotipagem, é necessária a interrupção da proliferação celular das células em cultivo no momento da metáfase utilizando-se a colchicina. A colchicina é uma substância que inibe a polimerização das proteínas do fuso mitótico, parando a divisão celular em metáfase, fase em que os cromossomos se encontram mais condensados, facilitando a sua observação ao microscópio e a análise do cariótipo.

A cariotipagem ainda permite verificar se a célula é normal ou transformada, já que o perfil genético de uma célula transformada é muito alterado quando comparado ao perfil genético do indivíduo de origem.

3.4.2. Análise de isoenzimas

O termo isoenzima define um grupo de várias formas moleculares da mesma enzima originário de uma espécie, resultante da presença de mais de um gene codificando cada uma das enzimas.

Assim, para utilizar isoenzimas como forma de identificação celular, deve-se obter um perfil enzimático chamado zimograma, no qual as enzimas correm em um gel de eletroforese e seu perfil de corrida é avaliado por técnicas histoquímicas.

Diferenças na mobilidade de isoenzimas em um campo elétrico resultam de diferenças em nível de sequências de DNA, que codificam tais enzimas, e de sua estrutura molecular. Assim, se os padrões de bandas de dois indivíduos diferem, assume-se que estas diferenças tenham base genética e sejam herdáveis.

A análise de isoenzimas em culturas de células de tecido humano pode ser utilizada para a identificação entre dois indivíduos, devido ao polimorfismo do genoma humano, pois cada indivíduo terá o seu próprio perfil isoenzimático.

As principais enzimas utilizadas na caracterização de células humanas em cultura são a purina nucleosídeo fosforilase (NP), a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e a lactato desidrogenase (LDH).

3.4.3. DNA fingerprinting

O DNA contém regiões que não são aparentemente transcritas. A função dessas regiões ainda não está descrita, mas acredita-se que existam regiões que possam ser utilizadas pelo DNA, caso houvesse algum tipo de evolução do indivíduo.

Essas regiões não são conservadas e possuem uma alta variabilidade entre os indivíduos, podendo ser utilizadas como marcadores de identificação individual, pois são específicas de um determinado indivíduo e diferem entre si na mesma espécie.

Enzimas de restrições são utilizadas para cortar segmentos que podem ser hibridizados com sondas e analisados por eletroforese. O perfil obtido é específico de um indivíduo, assim como sua impressão digital. Devido à especificidade dessa técnica, idealizada por Jeffreys e colaboradores em 1985. Ela foi denominada *DNA fingerprinting* e atualmente é a principal ferramenta utilizada para a identificação exata e precisa de determinada linhagem celular. É uma técnica muito utilizada para detectar a contaminação cruzada entre duas células em cultura.

3.5. Ciclo celular e fases de crescimento celular

3.5.1. Ciclo celular

A análise do ciclo celular é o primeiro passo para a compreensão das vias de ativação e proliferação das células, sendo necessário o conhecimento das fases do ciclo celular. A sequência ordenada de eventos, durante a qual o DNA é replicado e proteínas são sintetizadas e depois dividem a célula em duas, constitui um ciclo conhecido como ciclo celular.

O ciclo celular eucariótico é tradicionalmente compreendido em dois períodos principais: a **interfase** e a **mitose** (M). Um ciclo de 16 horas em células de mamífero em cultura é dividido nos períodos (G_1 , S, G_2 – interfase):

G_1 (duração de 5 horas): crescimento e preparação para a replicação dos cromossomos;

S (duração de 7 horas): síntese de DNA (replicação);

G_2 (duração de 3 horas): preparação para a divisão mitótica;

M (duração de uma hora): separação das cromátides e constituição de dois núcleos idênticos.

Após a mitose as células filhas podem:

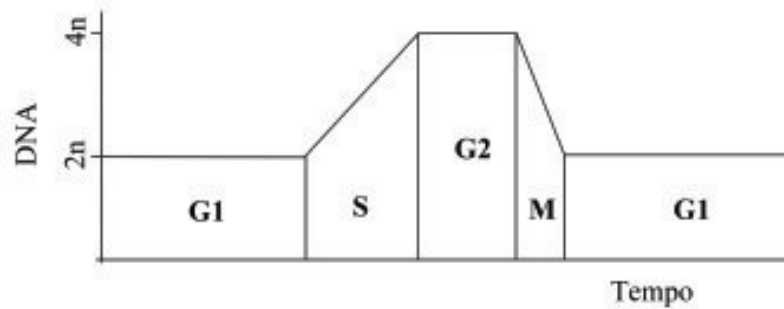
- iniciar nova fase de síntese após uma fase pós-mitótica de duração normal; ou
- entrar numa fase pós-mitótica prolongada permanecendo num estado de quiescência e, se devidamente estimuladas, podem mais tarde ingressar em ciclo no fim de G1.

A regulação adequada do ciclo celular, com o controle correto da síntese de substâncias reguladoras (*ciclina dependentes de quixases - CDK*) e inibidoras (inibidores de CDK), é fundamental para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. Uma falha nesse controle pode acarretar uma superprodução desnecessária de células, frequentemente com resultados maléficis, como a formação de tumores (câncer).

A dinâmica do processo de divisão celular é muito complexa. Ela ocorre por meio de uma série de eventos e processos nucleares e citoplasmáticos de forma coordenada e possui mecanismos de controle rigoroso envolvendo genes e proteínas regulatórias que atuam em diferentes etapas do ciclo celular.

Em cultura, as células de uma população normalmente apresentam-se em diferentes fases de ciclo celular. Se todas as células de determinada população estivessem na mesma etapa do ciclo celular, essa população estaria em sincronismo celular. Uma variedade de técnicas e substâncias pode sincronizar células em fases específicas do ciclo celular. Por exemplo, o arraste reversível de células em G1 pode ser obtido com a dedução de soro ou aminoácido isoleucina; e o inibidor de microtúbulos, o nocodazol, é empregado para sincronizar células na mitose.

Figura 7. Gráfico da quantidade de DNA variando ao longo do ciclo celular.

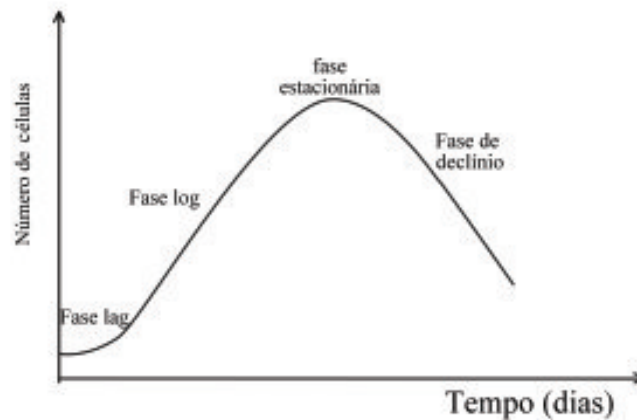


3.5.2. Fases do crescimento celular

Células normais em cultura possuem um padrão de crescimento representado por uma curva sigmoideal (Figura 8) denominada curva de crescimento. Essa curva reflete as fases de adaptação das células às condições ambientais, à disponibilidade de nutrientes e ao suporte de ancoragem necessários para promover a produção de novas células.

A determinação da curva de crescimento é importante para a caracterização de uma cultura de células. A biologia celular modifica-se em cada fase da curva, sendo importante o controle do estágio em que as células serão coletadas, quando será realizado o repique da cultura, ou quando novos nutrientes serão adicionados.

Figura 8. Curva de crescimento celular padrão de células normais



A curva de crescimento de células em cultura é dividida nas seguintes fases de crescimento:

- **Fase lag** – período de adaptação no qual não ocorre proliferação após adição das células ao meio de cultivo. A duração da **fase lag** depende da densidade celular e do estágio de crescimento da cultura, podendo se estender de horas a alguns dias. Nesse período há produção de proteínas estruturais e enzimas, com aumento na síntese de DNA. Nesse período ocorre intensa atividade metabólica.

- **Fase log** – fase logarítmica ou exponencial, período no qual a multiplicação celular é máxima e constante. É a fase de maior viabilidade e atividade metabólica das células e, por isso, é o melhor período para estudo e experimentação. Nesta fase é determinado o tempo de duplicação, sendo a velocidade de proliferação característica para cada linhagem.

- **Fase estacionária ou plateau** – a velocidade de crescimento diminui, o número de morte celular tende a ser equivalente ao número de células novas, e a atividade metabólica decresce. Para algumas linhagens, a fase estacionária pode ser estendida se o meio for renovado.

- **Fase de declínio ou morte celular** – há redução drástica do número de células e o número de células mortas excede o de células novas.

A construção da curva de crescimento é importante para a manutenção da rotina e para saber o número de células depois de determinado o intervalo de tempo. Permite a caracterização de certos parâmetros próprios de uma população sob determinadas condições de cultivo.

Linhagens primárias e permanentes possuem curvas de crescimento diferentes; as linhagens permanentes podem ser mantidas indefinidamente, enquanto as linhagens primárias morrem após algumas gerações.

3.6. Principais agentes contaminantes em cultura de células

Manter a assepsia em cultura é algo muito difícil. O material esterilizado erroneamente, a manipulação sem cuidado e, principalmente, a falta de higiene e de vestimenta correta dos manipuladores podem causar contaminação de uma cultura.

Bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas são os principais contaminantes das culturas celulares.

Em casos de contaminação, é importante avaliar onde a célula foi cultivada, quais os meios e soluções utilizados e qual técnico fez a manipulação. Isso impede que, em caso de contaminação pontual, esta se espalhe para outras culturas do laboratório, além permitir a investigação dos principais motivos da contaminação, a fim de eliminá-la.

3.6.1. Contaminação bacteriana

As bactérias são organismos procariontes com capacidade de proliferação muito rápida e que, na maioria das vezes, conseguem crescer em qualquer condição. Elas estão presentes no ar, nas superfícies, no trato digestivo humano etc.

Uma contaminação bacteriana na cultura inviabiliza a sua utilização, visto que elas competem pelos nutrientes do meio fazendo com que as células morram pela falta de alimento. Além disso, metabolizam o meio de forma a torná-lo excessivamente ácido para determinadas linhagens.

As bactérias, por crescerem muito mais rápido que as células animais em cultura, especialmente em meios muito ricos, como os de cultivo de células animais, têm sua visualização ao microscópio ótico facilitada, e a contaminação é facilmente detectada. Para isso, é necessário que o cultivo ocorra em meio livre de antibióticos, para não haver mascaramento do crescimento da contaminação em cultura. A esterilidade deve ser garantida pela qualidade das soluções e do material utilizado e pelo bom treinamento dos técnicos.

3.6.2. Contaminação por micoplasma

Micoplasmas são contaminantes comuns de culturas de células, microorganismos procariotos desprovidos de parede celular que possuem uma membrana lipídica em bicamadas, imperceptíveis na visualização por microscópio ótico invertido.

De difícil localização por se aderir à membrana da célula, o micoplasma é prejudicial, pois retira do meio os nutrientes necessários, em particular a arginina. O metabolismo dos micoplasmas é, em parte, dependente do metabolismo celular.

Para detectar micoplasmas, pode-se utilizar o teste de coloração fluorescente Hoescht 33258, que cora DNA. Assim, ao observarmos uma cultura contaminada em microscopia de fluorescência é possível visualizar o núcleo da célula e o seu contorno, que é formado pelo material genético dos micoplasmas aderidos à membrana.

Contaminar uma cultura com micoplasmas é muito fácil, pois eles se encontram na via respiratória humana; porém, a descontaminação envolve a

utilização de antibióticos, como ciprofloxacina e kanamicina associada à tetraciclina, extremamente prejudiciais à célula, e, havendo posterior “febre”, com o aumento da temperatura de 37 °C para 41 °C. Isso diminui o número de células viáveis, e o processo nem sempre é um sucesso.

3.6.3. Contaminação por leveduras

Leveduras são fungos unicelulares muito comuns em cultura. Caracterizam-se por serem menores do que as células animais. Multiplicam-se principalmente por brotamento, formando na cultura estruturas características na forma de esferas menores anexadas a esferas maiores.

4. Meios de cultura e soluções utilizadas em cultivos celulares

Os meios nutritivos (meios de cultura ou de cultivo) utilizados para a cultura de células, tecidos e órgãos fornecem as substâncias essenciais para o crescimento e controlam o crescimento *in vitro*.

As mesmas vias metabólicas e bioquímicas básicas no organismo são consideradas nas células cultivadas. Complementando as substâncias biossintetizadas pelas células, vários compostos orgânicos são adicionados ao meio para suprir as necessidades metabólicas, energéticas e estruturais específicas das células. Sendo assim, os meios de cultura devem apresentar em sua formulação sais minerais, hidratos de carbono, aminoácidos, vitaminas, proteínas, peptídeos, lipídeos e ácidos graxos (ver Tabela 1). Costuma-se adicionar também soros, tampões, antibióticos e indicadores de pH.

Os meios de cultivo foram estabelecidos a partir de 1950, com várias formulações de meios que proporcionassem o crescimento celular *in vitro*. Os meios de cultura, tais como o meio 199 de Morgan e colaboradores de 1950, o meio CMRL, de Parker e colaboradores de 1957, e os meios basais de Eagle de 1955 e 1959, são utilizados hoje.

Foram elaborados, também a partir de 1950, alguns meios de cultura mais complexos, com o intuito de eliminar a utilização de fluidos animais, como o meio NCTC 109, desenvolvido por Evans e colaboradores a partir 1956. Esses meios livres de soro devem fornecer todos os fatores que as células em cultura necessitam, tais como: metais traço, vários suplementos e fatores de crescimento, insulina, transferrina, hormônios, dentre outros. A exigência desses fatores e a complexidade do meio variam de acordo com o tipo celular a que se destina e, por ser altamente específico, em muitos casos precisa ser adaptado para cada tipo celular. Devido à sua complexidade, esses meios são muito dispendiosos, e utilizados apenas para fins específicos.

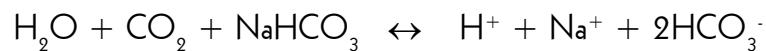
Tabela 1. Tabela de componentes básicos de um meio típico.

aminoácidos	vitaminas	sais	outros	proteínas (necessárias em meios sem soro quimicamente definidos)
<ul style="list-style-type: none"> • Arginina • Cistina • Glutamina • Histidina • Isoleucina • Leucina • Lisina • Metionina • Fenilalanina • Treonina • Triptofano • Tirosina • Valina 	<ul style="list-style-type: none"> • Biotina • Colina • Folato • Nicotinamida • Pantotenato • Piridoxal • Tiamina • Riboflavina 	<ul style="list-style-type: none"> • NaCl • KCl • NaH₂PO₄ • NaHCO₃ • CaCl₂ • MgCl₂ 	<ul style="list-style-type: none"> • Glicose • Penicilina • Estreptomina • Vermelho de fenol • Soro 	<ul style="list-style-type: none"> • Insulina • Transferrina • Fatores específicos de crescimento

Para escolher o meio de cultivo adequado ao de uma determinada linhagem, consulta-se primeiro a literatura e as referências de bancos oficiais.

No sistema de cultivo de células, é importante o controle do pH ótimo (7,0-7,6), utilizando para isso tampão e o suplemento do meio de cultivo que resiste às variações do pH, principalmente na **fase lag** do crescimento celular. Na fase **lag** do crescimento celular, ou em baixa densidade celular, a tensão de CO₂ deve ser mantida para controle do pH e, por isso, as culturas são mantidas em atmosfera de 5-10% de CO₂.

Para compensar a diminuição do pH gerado pelos metabólitos do consumo da glicose, há a suplementação do meio com bicarbonato de sódio e manutenção do nível de CO₂. O CO₂ dissolvido em equilíbrio com íons bicarbonato gera um sistema de tamponamento no meio, como mostra a equação abaixo:



O composto HEPES (N-(2-hidroxiethyl) piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) e outros tampões orgânicos podem ser utilizados em culturas em que o tampão bicarbonato não é adequado. A sensibilidade da cultura pelo tampão varia, podendo até ser tóxica para as células. Portanto, deve-se ser criterioso na escolha do melhor tampão e da sua concentração.

Antibióticos e fungicidas são utilizados nos meios nutritivos para controle da contaminação microbiológica. Com essa finalidade, os compostos mais utilizados são a gentamicina, a estreptomina, a penicilina e a anfotericina.

É importante rotular, imediatamente, qualquer reagente ou solução preparada com etiquetas com as seguintes informações: nome da solução preparada, lote, data do preparo, prazo de validade, nome dos técnicos responsáveis e temperatura de estocagem. A temperatura adequada para os meios de cultura é de +4-8 °C.

4.1. Controle da qualidade da água e reagentes

A água é o componente predominante na preparação dos meios e soluções, mas é uma fonte potencial de impurezas que podem afetar o crescimento de culturas *in vitro*. Para evitar contaminação por compostos orgânicos voláteis, que permanecem após a destilação e que inibem o crescimento das culturas, deve-se utilizar água classificada como ultrapura, que consiste num sistema de purificação por filtração com carvão ativo, colunas de troca iônica e filtros de acetato de celulose. Embora de custo elevado, a água é produzida com alto grau de pureza. No entanto, a água deionizada pode ser aplicada para o preparo da maioria das soluções.

Devem-se utilizar substâncias testadas para culturas de células e com alto grau de pureza. No rótulo, sempre que possível, deve constar o número do lote, o prazo de validade e as condições de estocagem. Deve-se utilizar tripsina na diluição 1:250, obtida de pâncreas suíno e testada em cultura de células. A L-glutamina é um aminoácido essencial e suplemento fundamental dos meios de cultura. Como a L-glutamina é degradada a 36,5 °C, ela deve ser adicionada a meios de cultura suplementados a mais de 15 dias.

4.2. Soro fetal

Apesar da sua constituição química, os meios de cultivo são usualmente suplementados com 5% a 20% de soro, pois as células em cultura também necessitam de fatores de crescimento, hormônios, proteínas e peptídeos, nucleosídeos, lipídeos e inibidores que podem ser supridos por esse fluido animal.

Deve-se utilizar um soro fetal certificado, estéril, inativado a 56 °C por 30 minutos, livre de micoplasmas e sem endotoxinas. Atualmente, os soros estão disponíveis comercialmente e os mais utilizados em cultivos celulares são os soros de origem bovina, de cavalo e humano. O soro é obtido do plasma,

sob condições assépticas e estéreis, por punção cardíaca ou venosa. A coleta, a manipulação, o processamento e a estocagem são realizados visando-se manter as propriedades e qualidades do soro. A escolha do soro depende de requisitos de cada tipo celular, e um dos mais utilizados é o soro fetal bovino. No caso do soro fetal bovino, cada procedimento corresponde a uma partida, ou lote diferente.

As variações qualitativas e quantitativas dos componentes do soro podem interferir no crescimento das células em cultura. Dessa forma, a capacidade de possibilitar o crescimento celular deve ser avaliada para cada lote de soro adquirido. Cada lote deve ter um certificado com todos os dados dos testes bioquímicos e microbiológicos realizados, devendo ser testados para detecção de bactérias, fungos, *Mycoplasma* e agentes virais.

4.3. Sistema de filtração

Para substâncias orgânicas que não resistem ao processo de esterilização por autoclave, convém dispor-se de dispositivo para filtração por membranas. Algumas substâncias orgânicas são degradadas pelo calor, sendo lábeis à autoclavação, precisando ser esterilizadas com um filtro especial de acetato de celulose com porosidade inferior a $0,22 \mu\text{m}$. Uma reação que pode ocorrer durante a autoclavação é a caramelização (reação entre açúcares e aminoácidos) e a hidrólise da sacarose. Essas reações se intensificam com o aumento do tempo da autoclavação.

Assim, utiliza-se o processo de filtração, que consiste na passagem de líquido por membrana filtrante com pequenos poros que impedem a passagem de microrganismos. Filtros reutilizáveis podem ser esterilizados por autoclavação, sendo os descartáveis também muito utilizados e, apesar de mais caros, o processo é mais rápido e mais seguro.

A maioria das soluções estéreis de uso em cultura de células é preparada por filtração em membrana esterilizante de $0,22 \mu\text{m}$. Contudo, algumas soluções podem ser esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Utilizam-se também membranas de $0,45 \mu\text{m}$, como pré-filtro para clarificar soluções menos lípidas.

Em câmara de fluxo laminar, a filtração é realizada com um sistema para filtração sob pressão com filtro de $0,22 \mu\text{m}$ em volumes maiores que 10 L; para volumes entre 0,1 e 10 L esterilizam-se em sistema de filtração a vácuo com filtro de $0,22 \mu\text{m}$ e, para até 100 mL, sistema de filtração por seringa com filtro de $0,20 \mu\text{m}$.

Após a realização da filtração, é fundamental testar o material filtrado para verificar a eficiência do procedimento, por meio da realização de teste de esterilidade por inoculação direta do filtrado em meio de cultivo.

5. Aplicações dos cultivos celulares

5.1. Produção de imunológicos

Existem muitas aplicações para a cultura de células. As primeiras aplicações se relacionam com a produção de anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais têm sua maior aplicação nos imunoenaios, como o ELISA. Além disso, esses anticorpos também são muito utilizados associados a marcadores radioativos em imunocintilografia.

Os anticorpos monoclonais são produzidos em células denominadas hibridomas, que resultam da fusão de células de mieloma murino com linfócitos B produtores de um determinado anticorpo. As células do hibridoma são imortais e produzem anticorpos, assim como a sua precursora.

Várias proteínas diferentes de anticorpos comercializadas são produzidas a partir de cultura de células. Eritropoietina humana, fator VIII para hemofilia, dentre outras, são produzidas em células cultivadas, pois necessi-

tam de maquinário complexo para a sua produção que não é encontrado em células procariontes.

Uma aplicação importante da cultura de células em imunobiológicos se relaciona com a produção de vacinas. Para crescimento viral, é necessário o seu cultivo em células, pois os vírus se replicam em hospedeiros. A vacina de sarampo é produzida em culturas primárias de fibroblastos de embrião de galinha, enquanto a vacina de poliomelite, fabricada na França, em células de rim de macaco-verde africano (*cercopithecus aethiops*). Um dos grandes desafios da atualidade é a produção de vacinas em células de linhagens transformadas sem afetar o indivíduo que irá utilizá-las. Essas pesquisas estão em desenvolvimento e, em muitos casos, já estão sendo aplicadas. No Brasil, ainda não existem vacinas fabricadas em células transformadas, mas a célula Vero é alvo de pesquisas de muitas instituições.

5.2. Virologia

Na virologia, a cultura de células é muito utilizada para a obtenção viral. Como os vírus necessitam de hospedeiros, é na cultura de células que é possível cultivá-los.

A cultura de células permite o isolamento do vírus para avaliar o seu efeito em determinados tipos celulares, além de verificar quais células são suscetíveis a determinados vírus.

5.3. Terapia celular

O termo terapia celular identifica uma técnica com o objetivo de restabelecer a função ou a estrutura de um tecido por meio da utilização de células, e vem sendo utilizada no caso de traumas, doenças degenerativas ou agressões aos tecidos do corpo.

Para a terapia celular, é necessário ressaltar a importância do conhecimento da célula em seu ambiente original, pois informações sobre a estrutura do

microambiente celular são necessárias para a reprodução desses elementos em cultura.

Na bioengenharia, a estrutura tecidual é reproduzida o mais fiel possível àquela do tecido original, tanto em conteúdo de material presente quanto ao comportamento das células presentes. Dessa forma, seria possível a substituição dos tecidos danificados por novos tecidos formados em cultura, substituindo-se aquele que sofreu algum dano em determinado momento da vida do indivíduo. Uma aplicabilidade da bioengenharia é obtenção de células do próprio paciente para o cultivo e formação de tecido. Esse tecido é cultivado em laboratório, acrescido de fatores e do microambiente necessário à diferenciação e à formação tridimensional da célula, mimetizando o tecido original que, após um determinado período, é reimplantado no paciente, substituindo o tecido lesado.

Outro avanço na terapia celular é o uso de células-tronco no tratamento de doenças degenerativas. Células-tronco possuem alta capacidade de diferenciação e de proliferação sendo possível formar a partir delas células diferenciadas que exerçam funções específicas.

As células-tronco podem ser de origem embrionária (células-tronco embrionárias) ou de tecidos adultos (células-tronco adultas). As células-tronco embrionárias têm alta capacidade de replicação e de diferenciação; no embrião todo o organismo complexo será formado a partir destas células. As células-tronco adultas são células de proliferação modulada, quiescentes, que se mobilizam para estabelecer a reposição de células que morreram ou que se ativam e proliferam intensamente no momento necessário à regeneração de um tecido danificado.

Para saber mais:

MORAES, A. M.; AUGUSTO, E. F. P.; CASTILHO, L. R. *Tecnologia do cultivo de células animais: de biofármacos à terapia gênica*. São Paulo: Rocca, 2007. 503 p.

MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Manual da qualidade*. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

PERES, C. M.; CURI, R. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 283 p.

FRESHNEY, R. I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 4. ed. Nova York: Wiley-Liss, 1994. 397 p.

VREMEULEN, K. The Cell Cycle: A Review of Regulation, Deregulation and Therapeutic Targents in Cancer. *Cell Proliferation*, n. 36, p. 131-149, 2003.

