

Análises histopatológicas: porque demoram os resultados

[Histopathological analysis: reasons for delayed results]

Anabela Alves

*Departamento de Patologia e Clínicas Veterinárias,
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real*

Summary

When the specimen received and the accompanying consultation request meet the laboratory's minimum standards, they may then enter the laboratory processing routine, initiating a complex series of events that culminates in the issuance of the final report.

The authors describe and highlight the main events of the routine work associated with veterinary pathology which includes gross and microscopic examination.

Introdução

Quando uma amostra ou espécime chega a um laboratório de anatomia patológica, acompanhada da requisição devidamente preenchida, inicia-se uma série complexa de acontecimentos que vão culminar na emissão de um relatório final, o relatório anatomopatológico.

O relatório de anatomia patológica é um documento médico importante que deve descrever totalmente, mas de forma clara e concisa, os aspectos macro e microscópicos mais relevantes de cada caso e também interpretar o seu significado para o clínico.

Este relatório é geralmente composto por cinco grandes campos. O primeiro designado por história pregressa que contém os dados clínicos essenciais (espécie, sexo, idade, raça, sintomas, achados cirúrgicos, etc.). O segundo, designado por exame macroscópico, contém a descrição do(s) espécime(s). Este é muito importante já que o espécime irá ser dissecado e seccionado, pelo que este será o último documento através do qual os aspectos macroscópicos poderão ser avaliados. O terceiro campo, exame microscópico, deve ser curto e objectivo. O quarto campo é talvez o mais importante e designa-se de diagnóstico. Finalmente o quinto campo é composto por notas ou comentários onde o anatomopatologista pode mencionar os diagnósticos diferenciais, fazer algumas considerações de prognóstico e ou de terapêutica.

Para um bom resultado histopatológico é indispensável uma boa qualidade histotecnológica. Qualquer espécime para microscopia que seja tecnicamente inferior, por exemplo mal manipulado durante a exérese, mal fixado, cortado ou corado, compromete seriamente a elaboração de um diagnóstico correcto. Este processo, que se inicia nas mãos do clínico ou cirurgião responsável pela colheita da amostra ou espécime e que termina na chegada às mãos do anatomopatologista de lâminas de histologia, deve todo ele ser orientado de forma a que em nenhum passo sejam descuradas as regras de qualidade aplicáveis, pois basta que num só passo do processo isto não seja cumprido para que todo o processo fique comprometido.

De seguida iremos descrever todos os passos que o espécime deve seguir até à obtenção de um diagnóstico.

Preparação de tecidos para observação em microscopia óptica

O estudo morfológico dos diversos tecidos e órgãos, foi inicialmente desenvolvido quer pela observação "in vivo" quer "in vitro" por diversos métodos histológicos.

Os estudos efectuados por observação "in vivo" estão relacionados normalmente com morfometria e estatística.

As técnicas histológicas utilizadas para a observação de tecidos e órgãos de animais fixados têm sido baseadas nos métodos de rotina de patologia humana.

Fixação

Uma boa preservação dos tecidos é fundamental para a observação em microscopia óptica. A fixação não só deve preservar os tecidos detendo a autólise e a proliferação bacteriana como também deve permitir que os tecidos permaneçam sem alterações quando são submetidos a subsequentes tratamentos. Os tecidos devem endurecer ligeiramente mas não se devem fragmentar, evitando se possível a perda de pequenas moléculas, para que as estruturas tissulares estejam muito próximas do estado vivo.

A fixação pode efectuar-se por imersão ou por perfusão, e deve ser o mais o mais breve possível após a separação dos componentes do organismo vivo ou da morte do indivíduo, já que qualquer atraso leva à desidratação dos tecidos e à aceleração da autólise.

Os fixadores são substâncias que mobilizam as moléculas constituintes das células, quer por coagulação quer por floculação. Não há fixadores perfeitos. Podem usar-se misturas para minimizar os defeitos de cada um. O fixador deve ser escolhido tendo em conta as características do tecido, os exames pretendidos e as colorações a aplicar.

A composição química do fixador deve permitir que os diferentes tecidos e órgãos mantenham o seu aspecto estrutural o mais próximo possível da realidade.

Em geral a concentração iónica do fixador deve ser equilibrada, portanto a neutralização do fixador é indispensável.

Na preparação dos fixadores consideram-se, entre outros factores, o pH da solução, a sua tonicidade e ainda a presença de iões bivalentes e açúcares.

O pH parece ser um dos elementos mais importantes a ter em conta pois os resultados obtidos com fixadores não tamponados são muito variáveis. Os tampões estabilizam as modificações de pH que acompanham a morte celular à medida que o fixador penetra nos tecidos. Geralmente a fixação faz-se a um pH fisiológico (7.2 - 7.5).

A formalina a 10% tamponada é ainda o melhor compromisso nas diversas circunstâncias. Não é caro, o tecido pode manter-se durante longos períodos sem se deteriorar e é compatível com a maioria das colorações especiais. A formalina pura é uma solução concentrada (40%) do gás formaldeído em água. Assim a solução de formalina a 10% representa a solução de um gás a 4%.

De entre os outros fixadores existentes destacamos apenas um o fixador de Bouin que é especialmente recomendado para biópsias testiculares.

O volume do fixador deve ser cerca de 10 vezes o volume do tecido.

A fixação pode efectuar-se à temperatura ambiente ou no caso de peças muito grandes a 4°C. O tecido nunca deve ser congelado já que pode haver risco de rotura celular, e de cristalização intra e extra-celular da qual resulta distorção dos tecidos.

A velocidade de penetração do fixador mais utilizado (formalina a 10%) é de cerca de 1mm/h, o que implica várias horas de espera para a maioria das amostras. O tempo pode ser encurtado se se utilizar um forno de microondas comercial, o que conduz a uma fixação quase instantânea devendo controlar-se a temperatura entre 63° e 65 °C, já que a ebulição da formalina conduz a artefactos indesejáveis.

Descrição macroscópica, dissecação e selecção das áreas para o exame histológico

As amostras depois de devidamente fixadas estão prontas para continuarem o processamento de rotina. As amostras devem ser descritas de uma forma sequencial lógica, com uma descrição clara das anomalias macroscópicas e a sua localização. O tamanho, a cor, o aspecto externo, o odor (se presente), a forma, a consistência, a presença de cavidades e fluidos, a arquitectura geral e a localização de todas as lesões devem ser registadas. Convém referir que é aconselhável registar as dimensões e as características específicas em vez da utilização de comparações com objectos comuns tais como frutos ou vegetais. Quando se trata de um órgão na sua totalidade deve ser registado também o seu peso.

As amostras são então dissecadas e seccionadas escolhendo-se as áreas mais representativas, para se obter, não só um diagnóstico correcto, mas também, principalmente no caso de neoplasias, se poder ter um prognóstico, o que se consegue observando as margens da lesão e assim se verificar se a exérese foi total ou incompleta.

Processamento de tecidos: desidratação, diafanização ou clareamento e infiltração

Os três passos de processamento de tecidos – desidratação, diafanização e infiltração, são os passos sequenciais designados para remover toda a água que se pode extrair dos tecidos e substituí-la com um meio que solidifique, para assim permitir o corte dos tecidos. No passo de desidratação utilizam-se preferencialmente alcoóis – isopropílico ou etílico. O álcool isopropílico é mais barato do que o etanol e não está na lista de substâncias controladas. A utilização de alcoóis de graduação crescente é a rotina normal. Os processadores automáticos de tecidos efectuem o processamento mediante o uso de calor, vácuo, pressão e agitação. Ao mesmo tempo permitem a execução destes três passos durante a noite sem a presença de pessoal.

O xilol, um dos principais agentes diafanizadores, é o que geralmente se utiliza na inclusão de rotina em parafina.

Infiltração

A infiltração ou inclusão é o processo de rodear um tecido com uma substância firme como por exemplo a cera para assim se poderem obter cortes bem finos. A parafina é o meio de inclusão mais popular e o mais frequentemente utilizado, no entanto há que ter em conta outros meios tais como a celoidina, a cera esterificada e os meios hidrosolúveis de inclusão.

Parafina

A parafina é uma mistura de hidrocarbonetos sólidos derivados do petróleo. A parafina é branca ou incolor, mais ou menos translúcida, inodora. Existem vários tipos cada um com um ponto de fusão diferente. As parafinas mais moles têm um ponto de fusão de cerca de 45°C e são melhores para tecidos moles como os tecidos conjuntivos dos fetos. As parafinas duras derretem-se a cerca de 60°C e são as mais indicadas para tecidos duros como por exemplo o tecido fibroso denso e o osso. Para utilização em laboratório aconselha-se uma parafina cujo ponto de fusão ronde os 56°C já que não é prático num laboratório de patologia de rotina incluir algumas amostras com parafinas moles e outras com parafinas duras. Na escolha da parafina deve-se ter em conta ainda o tipo de laboratório. Por exemplo não se devem usar parafinas moles em laboratórios em que a temperatura ambiente exceda os 40°C.

Esta operação é realizada a uma temperatura superior ao ponto de fusão da parafina escolhida (45 a 60°C, não devendo ultrapassar os 60°C para não haver alteração das proteínas).

A segunda fase da inclusão consiste na colocação da peça na posição desejada dentro de um molde cheio de parafina líquida, a qual deve arrefecer rapidamente retirando-se o tecido de dentro do molde. Se se pretendem incluir vários fragmentos de tecidos dentro do mesmo molde esta operação deve ser efectuada rapidamente para que quando a parafina solidificar os diversos

fragmentos fiquem ao mesmo nível, já que estes devem estar ao mesmo nível para serem cortados ao mesmo tempo.

Corte

O bloco de parafina solidificado contém a peça que é necessário orientar para proceder ao corte.

O bloco é fixado num suporte por meio de parafina fundida ou então o bloco é directamente colocado no micrótopo.

Os cortes para rotina são efectuados à espessura de 3 a 4 μm .

O micrótopo pode ser rotativo de tipo Minot ou de corredeira. No caso de se pretender fazer cortes seriados em ténia é indispensável o uso do micrótopo de Minot.

Os cortes obtidos devem ser primeiros estendidos em álcool a 30% e em seguidas passados para um banho-maria que deverá estar a uma temperatura de 40-42°C. Deverão aí permanecer até todas as rugas e pregas terem desaparecido, a seguir são colados numa lâmina e vão secar numa estufa a cerca de 42°-45°C.

As lâminas para os cortes de rotina (H-E) apenas necessitam de estar bem limpas, enquanto que para algumas técnicas especiais, nomeadamente para imunohistoquímica, elas deverão estar revestidas com alguma substância adesiva. Para imunohistoquímica as lâminas podem ser revestidas com poly-L-lisina ou com uma solução de gelatina e de $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.

Coloração

Os cortes de tecidos devem ser corados, para que assim se consigam distinguir mais facilmente as diferentes estruturas celulares que têm o mesmo grau de refringência e são portanto indiferenciáveis quando observadas ao microscópio óptico.

Os mecanismos de coloração variam segundo os casos, pode tratar-se de uma absorção, de uma dissolução do corante na substância a corar ou de uma combinação química entre ambos.

Os corantes dividem-se quanto à origem em naturais (de origem animal ou vegetal) e artificiais (compostos orgânicos da série aromática) obtidos por síntese à custa de corpos extraídos da hulha.

Quanto à natureza química os corantes classificam-se em ácidos, básicos e neutros. Os básicos são sais cujos radicais alcalinos são corados permanecendo incolores os radicais ácidos, é o caso dos derivados da anilina. Coram os tecidos de natureza ácida (ditos basófilos), como os ácidos nucleicos - DNA e RNA - polissacáridos sulfurosos, polissacáridos dos ácidos urónico e siálico, e proteínas que contêm mais radicais do grupo carboxílico do que do grupo amino.

Os corantes ácidos são sais em que o anião está corado (geralmente de um sulfonato ácido de Na e K ou um ácido carboxílico). Coram os tecidos de natureza alcalina que são constituídos na sua maior parte por proteínas que contêm um excesso de aminoácidos alcalinos,- arginina, lisina hidroxilisina e histidina.

Nos corantes neutros o anião e o catião encontram-se corados como por exemplo o picrato do azul de metileno, os eosinatos do azul de metileno, e o azul de metileno.

Há ainda os corantes ditos indiferentes que não são ácidos nem básicos nem possuem a capacidade de formar sais. São geralmente insolúveis na água mas solúveis no álcool, éter e óleos gordos, por exemplo os corantes das gorduras o Sudão III e os escarlates R.

Método geral de coloração

A maioria dos corantes utilizados encontram-se em solução aquosa ou em solução alcoólica logo há que retirar a parafina do corte. Isto consegue-se mergulhando a lâmina que contém o corte em xilol durante 1/2 hora à temperatura ambiente ou 10 minutos a 60°C.

Depois passa-se para o álcool a 90-95%, se o corante se encontrar em solução alcoólica pode-se fazer actuar logo o corante, se pelo contrário se encontra em solução aquosa há que hidratar o corte passando sucessivamente a lâmina por alcoóis de concentração decrescente (95°, 80°, 70°, 50°, etc). Geralmente utiliza-se apenas o álcool a 95°, a 70° e água destilada. Convém sempre passar por água destilada porque alguns corantes na presença de álcool precipitam.

Depois de hidratado faz-se actuar o corante aquoso. Aqui podem utilizar-se vários corantes com diferente apetência para os vários tecidos.

Após a coloração há que preservar este corte de modo a que nem as estruturas nem a coloração se alterem, para isso efectua-se a montagem que consiste em colocar os cortes num meio conservador. Antigamente usava-se o bálsamo do Canadá, só que esta substância demora muito a secar o que a tornava pouco prática além de que com o tempo reduzia-se a intensidade de coloração pela eosina e desaparecia muito depressa a reacção do Azul da Prússia. Por estas razões começaram a usar-se resinas sintéticas como meio de montagem nas preparações de rotina de Hematoxilina-eosina e para a maioria das colorações especiais.

Estas resinas não são solúveis na água mas sim no xilol, então há que desidratar a preparação passando por alcoóis de concentração progressivamente crescente até ao álcool absoluto e no fim passar para o xilol. Deve aí permanecer que fique transparente, retira-se então do xilol coloca-se uma gota de resina sobre a lâmina e sobre esta a lamela.

Quando o meio conservador utilizado é miscível com a água (glicerina, levulose, etc) os cortes corados passam para ele imediatamente depois da lavagem não sendo necessária a desidratação. Estes meios aquosos usam-se quando ou os corantes (ex. Cristal de Violeta) ou algumas estruturas dos tecidos (gorduras) não podem sofrer os passos da desidratação.

Colorações nucleares: hematoxilina

É uma substância cristalina, incolor ou ligeiramente amarelada extraída do pau de Campêche (*Haematoxylon campechianum*), leguminosa arborescente da América central. Esta substância por si só não tem qualquer poder de coloração, mas após oxidação transforma-se em hemateína.

A hemateína é a substância verdadeiramente activa nas soluções de hematoxilina necessitando de um mordente com o qual forma uma laca (sal) para que assim possa corar os tecidos.

A base utilizada que serve de mordente pode ser o alumínio ou então um sal de cobre, de ferro, de cromo, de tungsténio, de vanadium, etc, obtendo-se com todos eles uma excelente coloração nuclear.

A hematoxilina e a hemateína são solúveis no álcool e na glicerina. A hemateína é pouco solúvel na água ao contrário da hematoxilina.

Existem várias fórmulas de soluções de hematoxilina podendo utilizar-se um método regressivo (por ex. com a hematoxilina de Harris), ou um método progressivo (hematoxilina de Mayer). No método regressivo coram-se todas as estruturas tissulares (núcleos, citoplasma tecidos conjuntivos, etc.) efectuando-se depois uma descoloração controlada e azulamento até atingir uma coloração nuclear óptima. No método progressivo só se deixa corar o núcleo. A intensidade de azul obtem-se lavando as lâminas em água corrente.

Colorações citoplasmáticas: eosinas

Derivadas da bromofluoresceína, as eosinas são sais de sódio ou de potássio. A sua cor depende sobretudo do número de átomos de bromo fixados ao núcleo da fluoresceína.

As eosinas utilizadas em colorações são derivadas da tetrabromo-fluoresceína, apresentam fluorescência e tons amarelados ou azulados, são solúveis na água e no álcool.

As eosinas dão colorações difusas mas quando utilizadas com cuidado consegue-se obter uma gama de tons que varia do rosa muito claro até ao rosa vivo.

A eosina amarela em solução aquosa a 2% é a mais utilizada nas colorações em conjunto com a hematoxilina. O tempo de coloração varia segundo o tecido a corar e o grau de diferenciação que se pretende, pode variar entre 1 a 7 minutos.

Coloração do glicogénio e mucopolissacaridos - PAS (periodic acid-Schiff)

É uma técnica de coloração muito útil e esteticamente agradável, substituindo em alguns laboratórios a coloração de rotina (H-E).

Esta técnica dá uma reacção positiva com todos os polissacáridos complexos, o que inclui o glicogénio, ácido hialurónico, mucoproteínas, glicoproteínas, glicolípidos e fosfatídeos. Assim serve para demonstrar/detectar o glicogénio, mucinas neutras, membranas basais e evidenciar a maior parte de fungos e parasitas.

Resultados: núcleos azuis, substâncias PAS positivas de vermelho a rosa

Coloração das fibras do tecido conjuntivo

Existem algumas colorações para demonstração dos tecidos conjuntivos, a maioria cai na categoria das colorações tricromicas. O termo coloração tricrómica é o nome geral para técnicas que evidenciam o músculo, fibras de colagénio, fibrina e eritrócitos, como o nome indica são utilizados três (3) corantes um dos quais é usado como corante nuclear. Uma das colorações mais antigas é o método de van Gieson, com a qual os núcleos ficam de azuis escuros a pretos, cartilagem azulada, o colagénio vermelho (fibras de colagénio e membranas basais) e os outros tecidos amarelos (fibras elásticas, citoplasma das células epiteliais e musculares).

Uma outra coloração tricromica muito utilizada é a coloração de Masson, com esta técnica podemos observar os núcleos azuis escuros ou pretos, o músculo, os eritrócitos e o citoplasma das células vermelhos, o colagénio azul.

Colorações argentafins e argirofilicas

A reacção argentafim depende da presença no tecido de substâncias, frequentemente do grupo fenólico (tais como catecolaminas ou indolaminas), que reduzem os sais de prata (e outros metais) – Fontana-Masson. Nas reacções argirofilicas é adicionado um agente redutor externo tal como a hidroquinona ou a formalina – Grimelius. Nos dois tipos de colorações obtêm-se grânulos castanhos escuros ou negros os restantes tecidos a cor depende do corante de contraste utilizado. Estas colorações utilizam-se para detectar células neuroendócrinas e melanina.

Coloração da substância amiloide

A coloração com Vermelho do Congo seguida pela observação com luz standart ou polarizada é a técnica mais prática para detectar a substância amiloide. A coloração não tem nenhuma especificidade química, estando dependente da disposição das moléculas. Nesta técnica a substância amiloide, o tecido elástico e os grânulos eosinofilicos ficam vermelhos enquanto que os nucleos ficam azuis. Estas preparações quando posteriormente observadas com luz polarizada a substância amiloide apresenta birrefringência exibindo uma cor verde maçã.

Pigmentos e minerais

Nos tecidos podemos observar alguns pigmentos que devem ser caracterizados para assim se poder determinar a patologia em questão, de entre os vários pigmentos existentes e que têm importância na patologia animal destacamos a melanina, a hemossiderina, a lipofuscina e nos minerais o cálcio.

Na reacção de Perls para a hemossiderina, o ácido hidrocloreídrico separa a proteína do ferro permitindo que o ferrocianido de potássio se ligue ao ferro na forma férrica e que se forme o

ferrocianido férrico (azul da Prússia). Assim os tecidos com hemossiderina e alguns óxidos e sais de ferro ficam azuis.

No método de Fontana–Masson para a melanina é utilizada uma solução de prata amoniacal sem banho redutor. Apenas as substâncias capazes de reduzir directamente os sais de prata tais como a melanina são evidenciados. No final os grânulos argentafins e a melanina ficam de cor negra enquanto os núcleos e o citoplasma variam de rosa a vermelho.

As lipofuscinas são uma mistura heterogénea de pigmentos nos quais de incluem os ceroides. Existem algumas técnicas que nos permitem evidenciar de alguma forma estes pigmentos, destacamos o método de Sudam negro B que deixa o pigmento negro e o método de Zielh-Neelsen modificado ficando as lipofuscinas de cor magenta.

No método de von Kossa para o cálcio formam-se sais de prata que são depois reduzidos para prata metálica negra pelo uso de luz ou de um revelador fotográfico, obtendo-se no final os sais de cálcio de cor negra.

No entanto, não nos devemos esquecer que podem surgir pigmentos por artefacto e que devem ser distinguidos dos pigmentos acima referidos. O mais frequente é o pigmento de formol que surge sob a forma de um depósito castanho ou preto nos tecidos fixados em formalina cujo pH é inferior a 6.5. Quando a fixação é muito prolongada no tempo mesmo os tecidos fixados em formalina neutralizada acabam por exibir este pigmento. A forma de contornar este artefacto é extrair o pigmento da preparação antes de lhe ser aplicada a coloração escolhida.

Colorações para microorganismos

O isolamento de microorganismos possíveis causadores de doença nem sempre é possível concretizar, quer por demora entre a morte do animal e a colheita das amostras o que permite a contaminação de todos os tecidos por microorganismos provenientes do intestino, quer por terem sido administrados aos animais agentes farmacológicos que inibem posteriormente o crescimento “in vitro” dos possíveis agentes patogénicos. Por tudo isto foram desenvolvidas técnicas que quando aplicadas aos cortes histológicos permitem a identificação aproximada destes microorganismos.

Nestas técnicas incluem-se as técnicas para as bactérias gram-positivas e gram-negativas, micobactérias álcool ácido-resistentes, fungos e parasitas.

A coloração de Gram permite a separação das bactérias em gram-positivas, que retêm os complexos de cristal de violeta-iodina e em gram negativas, que são descoradas pelo álcool ou acetona e coradas pela safranina ou fucsina (corantes de contraste). No final obtemos as bactérias gram-positivas azuis escuras e as gram-negativas vermelhas.

O fundamento da técnica de coloração de Ziehl-Neelsen baseia-se na capacidade que alguns microorganismos possuem em reter os corantes complexos básicos (tais como carbolfucsina) após forte descoloração com ácido-álcool. A resistência aos ácidos depende do elevado conteúdo em lípidos (ácidos micólicos e ácidos gordos de cadeias longas) das paredes celulares das micobactérias.

A técnica de PAS, já referida é muito utilizada para evidenciar fungos, no entanto quando existem em pequena quantidade é preferível optar pelo método de Grocott.

O método de Grocott permite-nos evidenciar fungos e leveduras. O método baseia-se na redução da prata pelos grupos aldeídos resultantes da oxidação pelo ácido crómico. No final obtêm-se os fungos marcados de cor negra. É o método de eleição para detecção destes microorganismos principalmente quando o seu número é diminuto.

Na demonstração de protozoários a técnica mais popular é a coloração de Giemsa, com este método os protozoários e outros microorganismos ficam corados de azul escuro, enquanto que o fundo fica rosa ou azul claro, os núcleos ficam azuis. Esta técnica baseia-se na que se utiliza para os esfregaços hematológicos.

Cortes por congelação

Os cortes por congelação são utilizados para diagnósticos rápidos, no estudo de gorduras e substâncias lipídicas que se perderiam se se utilizassem os métodos de parafina ou de celulose (nitrocelulose), nos métodos de impregnações metálicas e em imunocitoquímica. As peças podem ser congeladas no próprio micrótomo (micrótomo de congelação) ou mergulhando-as em azoto líquido, ou isopentano arrefecido com azoto líquido, ou éter de petróleo contendo pedaços de dióxido de carbono sólido.

Após a congelação os blocos podem ser armazenadas até serem cortados no crióstato.

Após serem cortados os cortes devem ser imersos no fixador antes de descongelarem completamente, utilizando-se para isso formol, acetona ou outro qualquer fixador escolhido.

As peças podem ser fixadas antes de serem congeladas, o que convém fazer nos cortes ultrafinos.

Coloração de gorduras

As técnicas que permitem a detecção de gorduras estão muito limitadas visto não poderem ser aplicadas em material incluído em parafina, devido ao facto das gorduras se dissolverem no xilol ou nos outros materiais usados para esclarecimento. Fica portanto limitada a sua aplicação aos cortes de congelação.

A técnica de sudão negro B cora os ésters de colesterol e os triglicerídeos de azul muito escuro e alguns fosfolípidos de cinzento.

Imunohistoquímica

A imunohistoquímica é um método que utiliza anticorpos seleccionadas para identificar antígenos específicos. As provas são extremamente sensíveis e podem detectar quantidades muito pequenas de uma determinada substância. Há muitos métodos, reagentes e “Kitts” vamos-nos referir apenas aos mais utilizados: método da peroxidase-antiperoxidase e à técnica do complexo Avidina-Biotina.

As técnicas de imunohistoquímica assentam na reacção específica entre antígeno-anticorpo, permitindo-nos identificar os constituintes celulares ou tecidulares (antígenos) por meio da interacção/ligação com um anticorpo específico, quer por métodos directos ou indirectos.

Um antígeno é uma substância que ao ser introduzida no organismo estimula uma resposta imunológica (produção de anticorpos). Na imunohistoquímica o antígeno é a substância que queremos evidenciar/demonstrar.

Com esta metodologia utilizamos anticorpos mono e policlonais que não são mais do que imunoglobulinas (principalmente IgG) produzidas especificamente contra um determinado antígeno (moléculas proteicas, carboidratos ou lipídicas).

Os anticorpos policlonais são produzidos por animais imunizados com uma determinada molécula purificada (imunogénio), produzindo este animal numerosos clones de plasmócitos (policlonal), em que cada um destes clones produz um anticorpo específico para um dos muitos epítomos presentes no imunogénio.

Os anticorpos monoclonais são produzidos *in vitro* por células resultantes da fusão entre plasmócitos e células neoplásicas de mielomas, produzindo cada hibridoma apenas um anticorpo específico anti um determinado epítomo de um imunogénio.

No laboratório de histopatologia une-se o anticorpo com o antígeno em combinação com um marcador visual.

Método directo – imunofluorescência directa.

Neste técnica utilizam-se geralmente cortes de congelação sobre os quais se aplica um anticorpo primário que já está combinado com um cromogénio.

Método da Peroxidase-antiperoxidase – neste método utiliza-se um anticorpo primário, um anticorpo secundário e um anticorpo produzido em... contra... conjugado com a enzima peroxidase (complexo PAP). O anticorpo secundário é produzido numa espécie animal diferente da do anticorpo primário e do complexo peroxidase-antiperoxidase, e o anticorpo e o complexo peroxidase-antiperoxidase provêm da mesma espécie animal. Como consequência o anticorpo secundário actua como ponte.

Método do complexo Avidina-Biotina (ABC) – esta técnica também utiliza três reagentes: um anticorpo primário, um anticorpo secundário que está quimicamente ligado à vitamina biotina e um complexo da glicoproteína avidina que está ligado à biotina e peroxidase. A avidina tem a capacidade de se ligar a quatro moléculas de biotina, de forma não imunológica, esta forte afinidade dá ao método uma excelente sensibilidade.

Em patologia animal a imunohistoquímica é muito utilizada principalmente para detectar ou evidenciar alguns microorganismos (virus, bactérias), e auxiliar no diagnóstico oncológico.

Bibliografia

- Bancroft, J.D.; Stevens, A. (1990) *Theory and Practice of Histological Techniques*. Third edition, Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Celestino da Costa, A.; Chaves, P.R.; (1943) *Manual de Técnica Histológica, Guia de Trabalhos práticos*. 3ª Edição, Livraria Portugália, Lisboa.
- Drury, R.A.B.; Wallington, E.A. (1980). *Carleton's Histological Technique*. Fifth Edition. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto.
- Hruban, R.H.; Westra, W.H.; Phelps, T.H.; Isacson, C. (1996). *Surgical Pathological Dissection. An Illustrated Guide*. Springer-Verlag New York, Inc.
- Prophet, E.B.; Mills, B.; Arrington, J.B.; Sobin, L.H.(1995) *Métodos Histotecnológicos*. Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP): Registro de Patologia de los Estados Unidos de América (ARP), Washington, D.C.
- Rosai, J. (1996). *Ackerman's Surgical Pathology*. Eighth Edition, Mosby.
- Schmidt, W.A. (1983). *Principles and techniques of surgical pathology*. Addison-Wesley Publishing Company, Medical Division, Menlo Park, California.