



**UAlg** ESS

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Ciências Biomédicas Laboratoriais

# Métodos Cito-Histoquímicos

---

## Aula 6

2016/17

João Furtado

[jffurtado@ualg.pt](mailto:jffurtado@ualg.pt)

Gab. 2.06 na ESSUAlg

# Sumário

---

## Métodos de Evidenciar Lípidos

- Introdução

- Os Métodos

- Corantes Lipossolúveis

## Evidenciação dos Lípidos

- Oil Red O

- Sudan Black

- Azul do Nilo

- Mielina

- Luxol Fast Blue

- Tetróxido de Ósmio

# Métodos de Evidenciar Lípidos

---

Colorações histoquímicas (especiais)

- ❑ Lípidos (gorduras) são biomoléculas orgânicas (hidrogênio, oxigênio e carbono)
- ❑ Insolúveis na água
- ❑ Funções: Fonte de energia, isolante térmico, proteção mecânica e estrutural
- ❑ A grande maioria das células e tecidos possuem na sua constituição uma grande variedade de lípidos
- ❑ A evidenciação de lípidos em condições normais não tem muito interesse em anatomia patológica – mas sim quando existe acumulações anormais de lípidos
- ❑ A importância é realçada nos métodos que permitem identificar a totalidade dos vários tipos de lípidos, ou lípidos específicos de relevância diagnóstica
  - ❑ **Doenças metabólicas de acúmulo intracelular de diferentes tipos lípidos**

## Os Métodos

- ❑ Processamento de rotina em parafina e resinas resultam na extração de grande quantidade destes compostos
- ❑ São utilizados corantes lipossolúveis: Oil Red O e Sudan Black
- ❑ Estes demonstram acumulações anormais de gorduras e óleos (lípidos simples e neutros) nos tecidos
- ❑ A presença destes lípidos está normalmente associada ao embolismo gordo ou a alterações degenerativas em órgãos como fígado ou cérebro
- ❑ Estas doenças derivam de defeitos genéticos que dão origem a enzimas cuja ação incorreta leva ao depósito de lípidos específicos
- ❑ Exemplo: Esfingolipidoses – afetam o SNC nas quais vários tipos de esfingolípido se acumulam no cérebro e SNP

## Corantes Lipossolúveis

- ❑ Substância corante tem solubilidade preferencial para os lípidos a serem evidenciados
- ❑ As gotículas lipídicas presentes no tecido são lípidos simples e neutros
  - ❑ Os primeiros têm por função servir de reserva energética de ácidos gordos. Enquanto que os segundos têm por objetivo agir como reserva para o excesso de colesterol
- ❑ Nem todos os lípidos são marcados por estas técnicas: ácidos gordos livres e fosfoglicéridos

- ❑ A substância corante hidrofóbica é transportada numa solução saturada num solvente aquoso
- ❑ Durante a coloração, o corante fica em solução nos lípidos, em detrimento do solvente em que foi transportado
- ❑ A coloração positiva por estas técnicas é designada de Sudanofilia (Sudan)
- ❑ De entre os corantes disponíveis o mais utilizado é o Oil Red O

# Evidenciação dos Lípidos

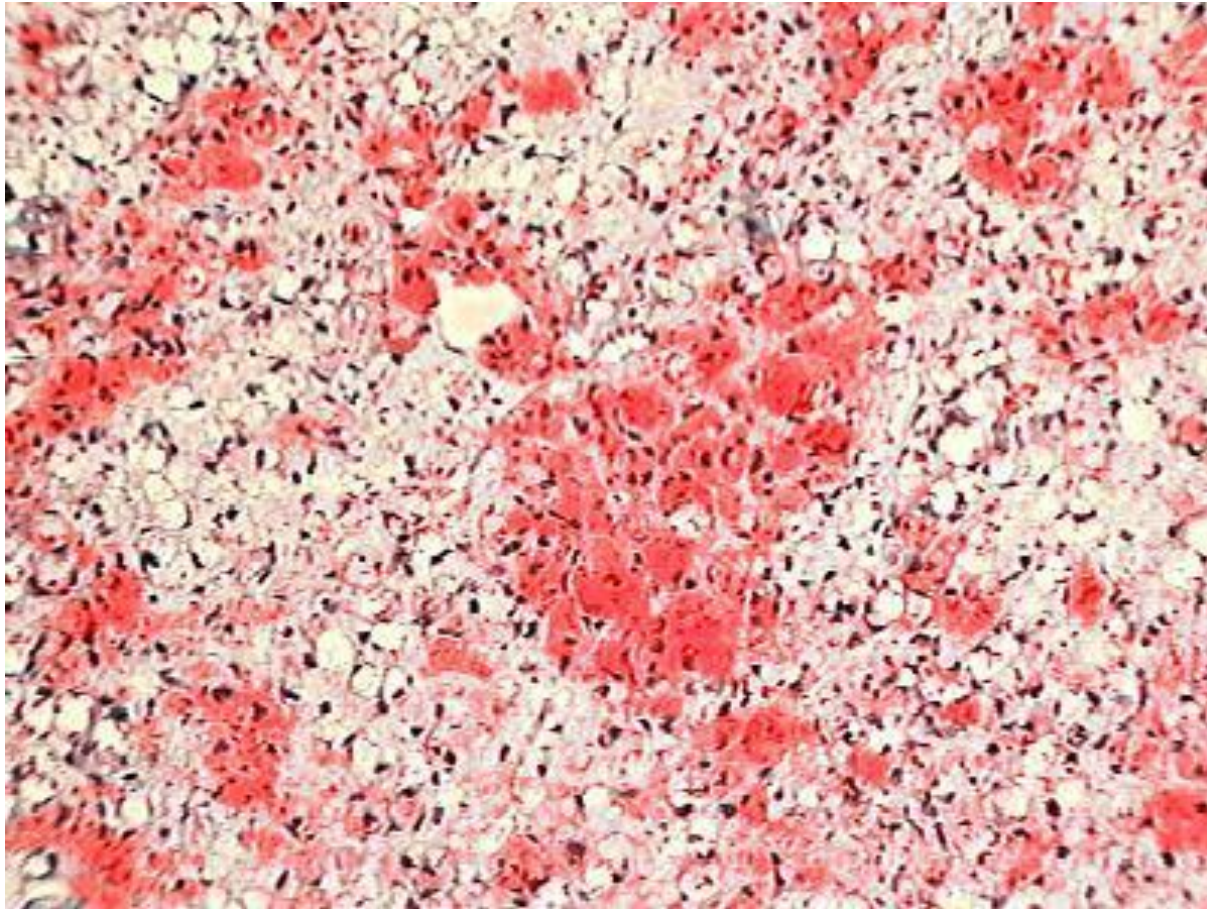
---

## Oil Red O

- ❑ Quimicamente relacionado com o Sudan, mas proporciona uma coloração mais intensa
- ❑ Fornecido normalmente com solução saturada em:
  - ❑ Isopropanol, etanol ou propileno glicol
- ❑ A coloração tem de ser em amostras frescas , pois a fixação remove a maioria dos lípidos – “**frozen sections**”
- ❑ Evidencia lípidos (vermelho intenso)

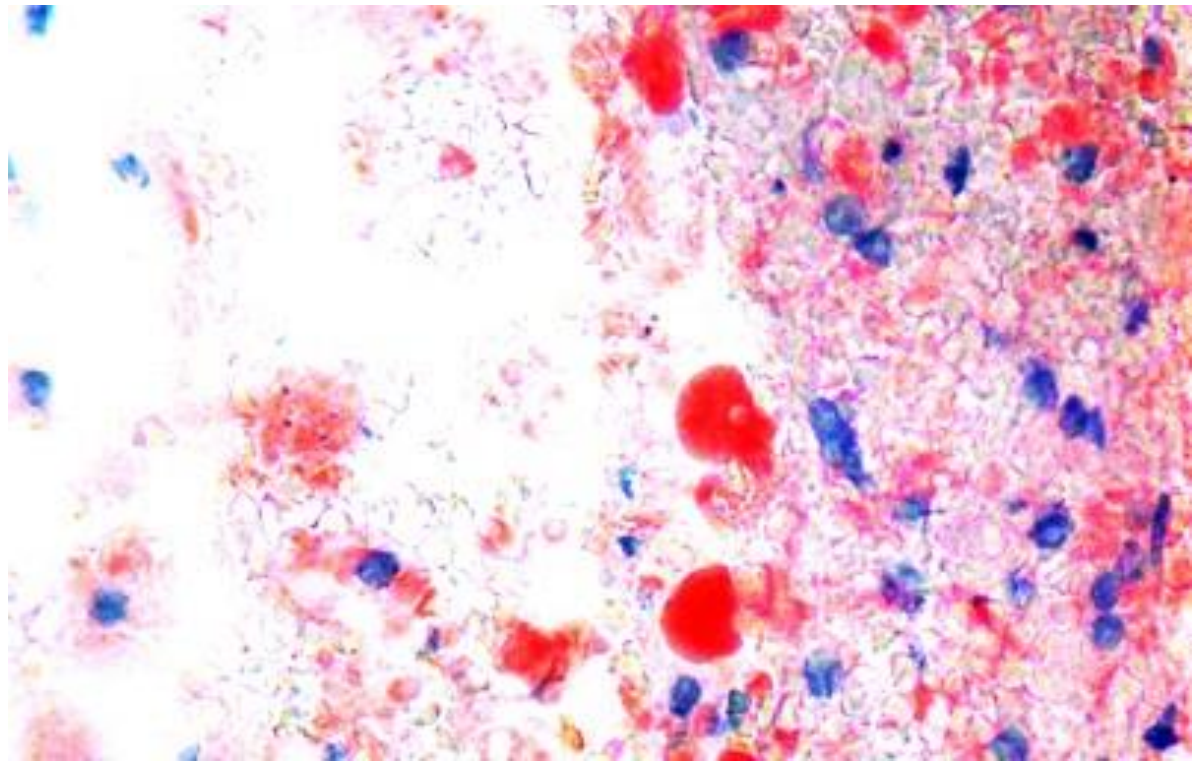
## Protocolo Oil Red O

- Cortes de congelação (8 a 10  $\mu\text{m}$ )
- Passagem por propileno glicol
- Cortes colocados em solução corante
- Diferenciar com uma mistura de propileno glicol (85%) + água destilada
- Lavagem em água destilada 2x
- Contrastar com hematoxilina
- Lavagem em água 2x
- Montar em meio aquoso



Lípidos - Vermelho

Núcleo – azul escuro/preto



## Sudan Black

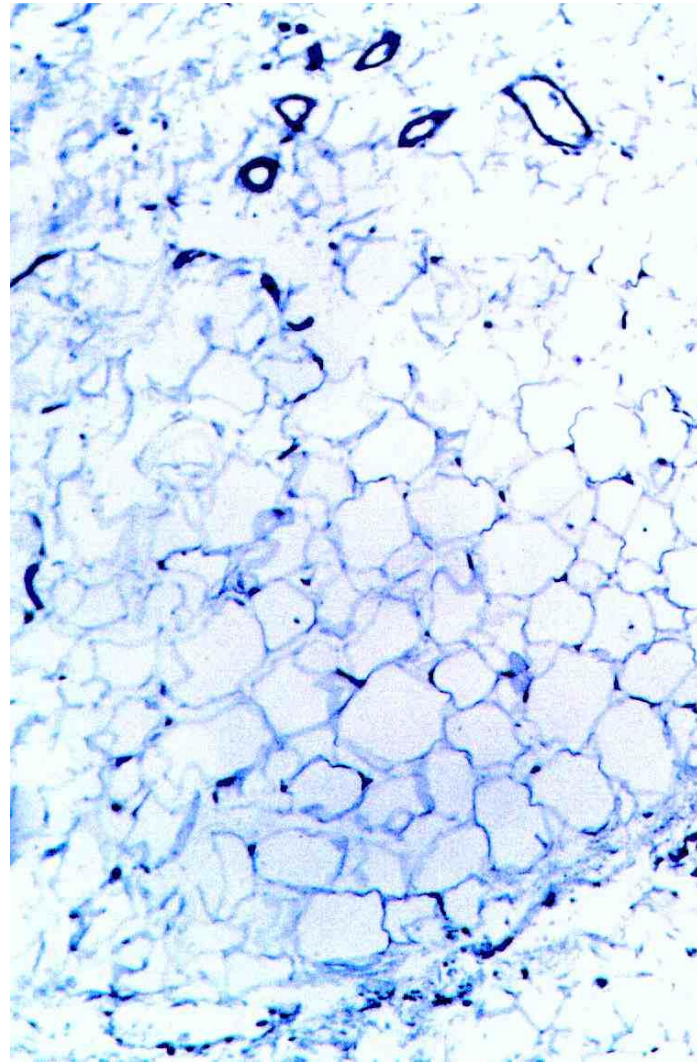
- ❑ Corante não iônico hidrofóbico
- ❑ Cora a maioria dos lípidos (preto), mas não cora colesterol
- ❑ Mecanismo de coloração é igual ao do Oil Red O
- ❑ A molécula corante possui dois grupos amino que lhe confere uma maior afinidade para fosfolípidos

## Protocolo Sudan Black

- Cortes de congelação
- Lavagem dos cortes em álcool a 70%
- Colocar em solução corante
- Lavar em água
- Contrastar com vermelho neutro
- Lavar em água
- Montar em meio aquoso

Lípidos – azul escuro

Núcleo – vermelho

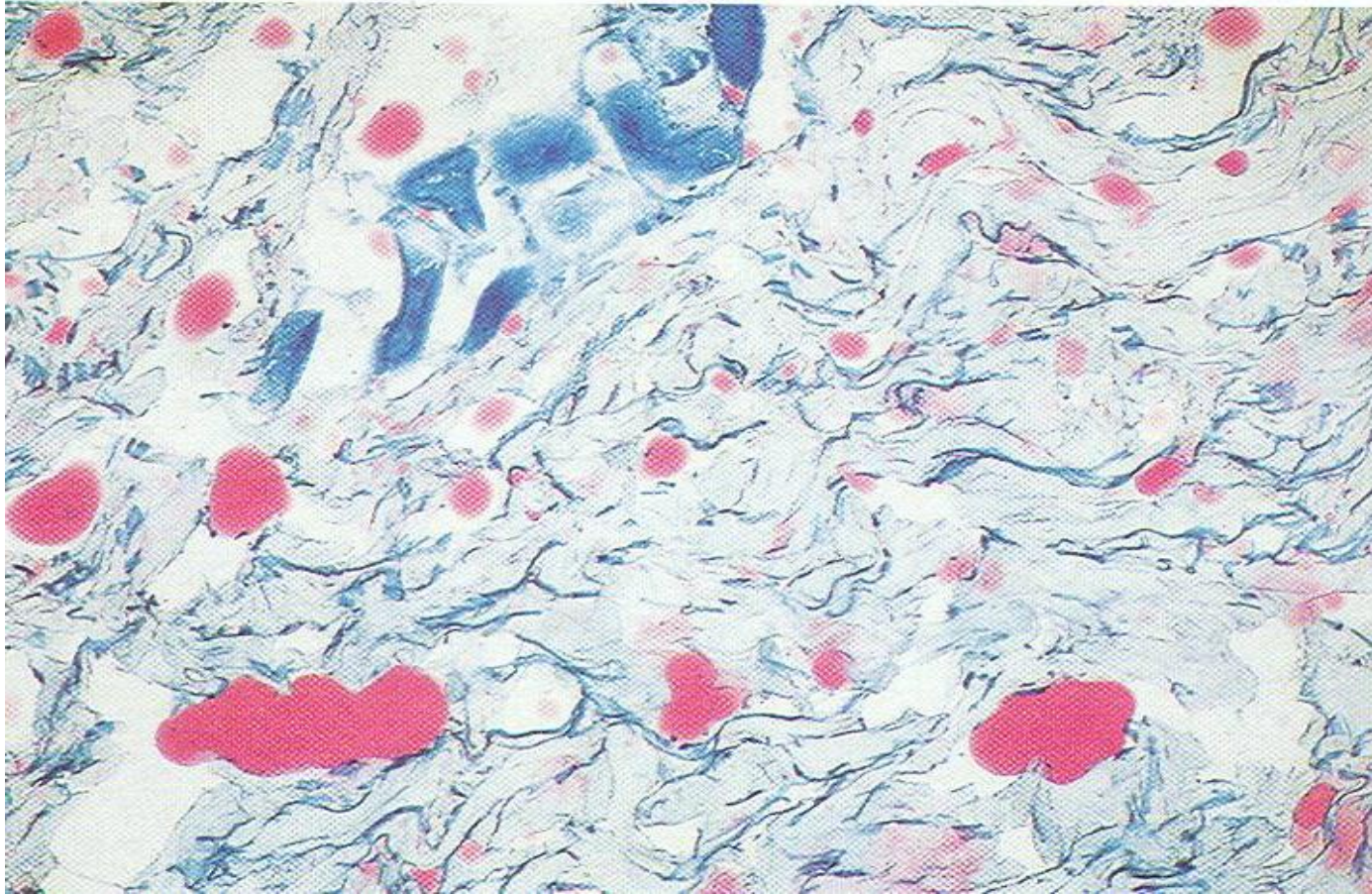


## Técnica do Azul do Nilo

- ❑ Corante básico (sal de sulfato)
- ❑ Composto de 3 substâncias corantes:
  - ❑ Corante sulfatado, hidrossolúvel (azul escuro)
  - ❑ A base do corante, insolúvel em água, lipossolúvel (vermelho)
  - ❑ Derivado hidrolisado e oxidado, lipossolúvel (vermelho)
- ❑ **Ao utilizar o corante hidrolisado** as gorduras neutras ficarão coradas de vermelho, enquanto que os lípidos ácidos, incluindo os ácidos gordos e os fosfolípidos ficarão corados de azul

## Protocolo Azul do Nilo

- Cortes de congelação
- Lavagem dos cortes em água
- Colocar em solução corante
- Lavar em água quente
- Diferenciar em solução ácida
- Lavar em água
- Montar em meio aquoso



Gorduras neutras - Vermelho

lípidos ácidos e fosfolípidos – azul

# Mielina

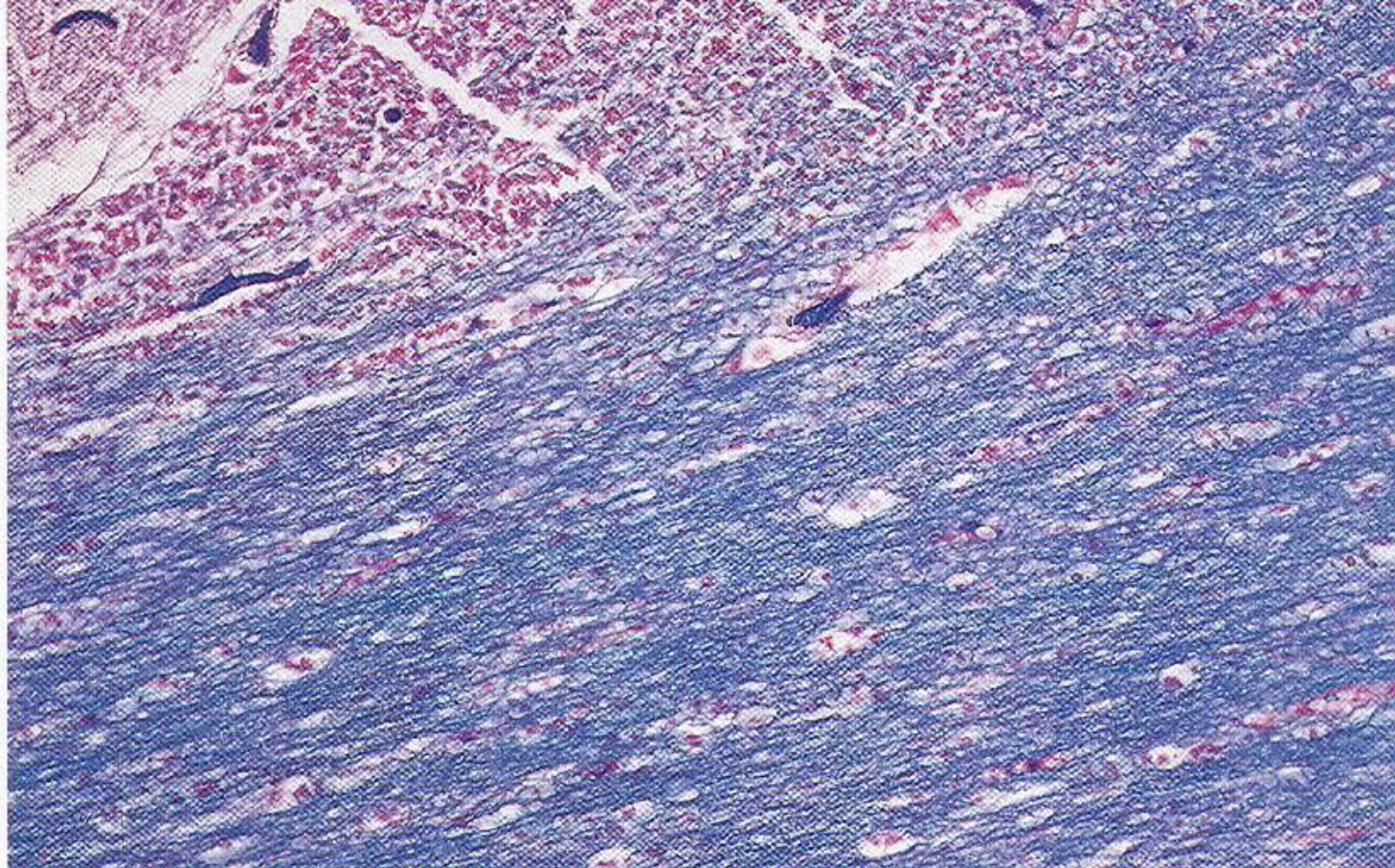
- ❑ Os lípidos que compõem a mielina são estáveis - confere resistência à extração por solventes, podendo ser demonstrados em cortes parafina
  - ❑ Lípidos presentes nas células nervosas
- ❑ As técnicas mais requeridas envolvem a marcação da mielina normal
  - ❑ Cérebro, medula espinal ou nervo periférico
- ❑ As técnicas de maior interesse científico são aquelas que permitem localizar a mielina degenerada (através da localização dos seus produtos de degradação) – adrenoleucodistrofia

## Luxol Fast Blue

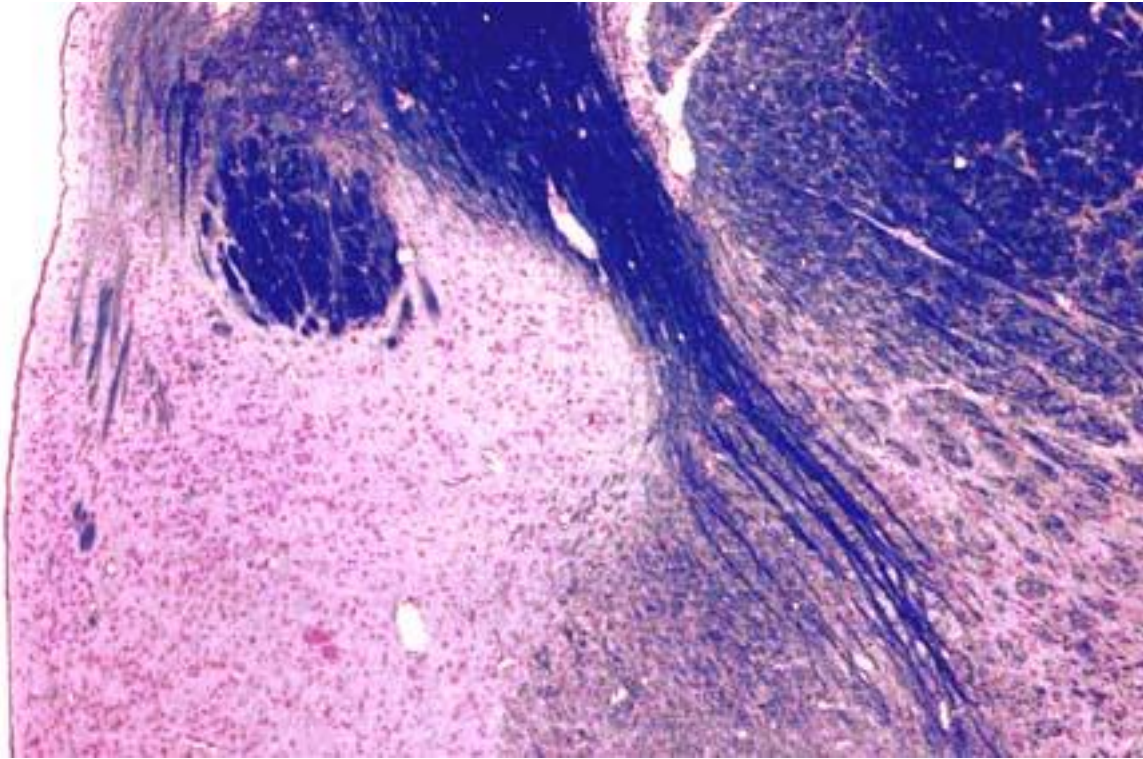
- ❑ Corante com forte afinidade para os fosfolípidos presentes na mielina
- ❑ Solubilidade em álcoois e lípidos
- ❑ O mecanismo de coloração baseia-se na solubilidade do corante nos lípidos havendo a substituição de uma base do corante por equivalente na molécula fosfolipídica
- ❑ Mielina corada de azul

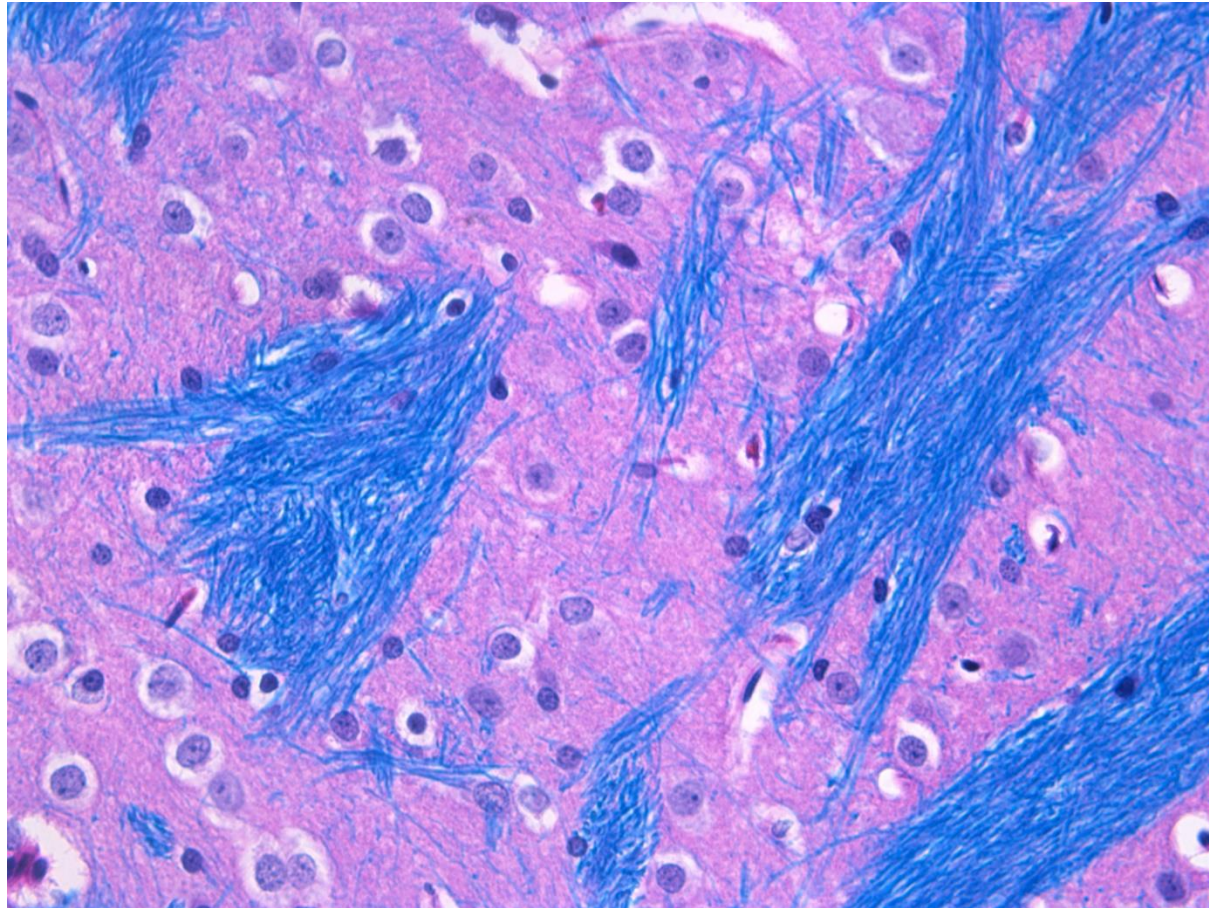
## Protocolo Luxol Fast Blue

- Cortes de congelação ou parafina
- Corar utilizando uma solução aquosa do corante
- Passagem por álcool a 70%
- Lavagem em água
- Diferenciar em carbonato de lítio
- Contraste com vermelho neutro
- Lavar e montar



Mielina - azul





## Tetróxido de Ósmio

- Oxidação dos lípidos da mielina
- Após a oxidação dos lípidos não saturados, a técnica envolve a ligação a estes do tetróxido de ósmio
- Mielina corada de negro

# Protocolo Tetróxido de Ósmio

- Cortes de congelação
- Pós fixação em solução de tetróxido de ósmio e cloreto potássio
- Lavagem em água destilada 3x
- Contrastar com hematoxilina
- Lavar em água
- Montar com meio aquoso

Mielina - preto

