



**UAlg** ESS

UNIVERSIDADE DO ALGARVE  
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Ciências Biomédicas Laboratoriais

# Métodos Cito-Histoquímicos

---

## Aula 10

2016/17

João Furtado

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

Gab. 2.06 na ESSUAlg

# Sumário

---

## Microorganismos

### Fungos

#### Evidenciação

### Protozoários

#### Evidenciação

### Helmintos

### Vírus

# Microorganismos

---

Colorações histoquímicas (especiais)

# Fungos

- ❑ Fungos são relativamente grandes com membrana celular rica em polissacáridos
- ❑ As infecções que originam são denominadas de micoses
- ❑ Fungos estão associados a infecções oportunistas em imunodeficientes
- ❑ Podem ser inofensivas, como “Pé de atleta”, até grave infecções sistêmicas que podem levar à morte (sistema imunitário comprometido)
- ❑ Visualizados o suficiente com H&E, mas bem demonstrados com a coloração Grocott e PAS

# Classificação histológica

## **Filamentosos:**

- Crescem como filamentos que se ramificam e formam uma rede entrecruzada, micélio.
- Produzem esporos que se alojam localmente nos tecidos

## **Esporulares:**

- São unicelulares de forma esférica

## **Idênticos a esporos:**

- Existem parcialmente na forma de esporos, mas formam igualmente longas estruturas filamentosas, pseudo-micélio

## **Dimórficos:**

- in vivo subsistem sob a forma de esporos
- In vitro sob a forma filamentosa

## Fungos - Dermatofíticos

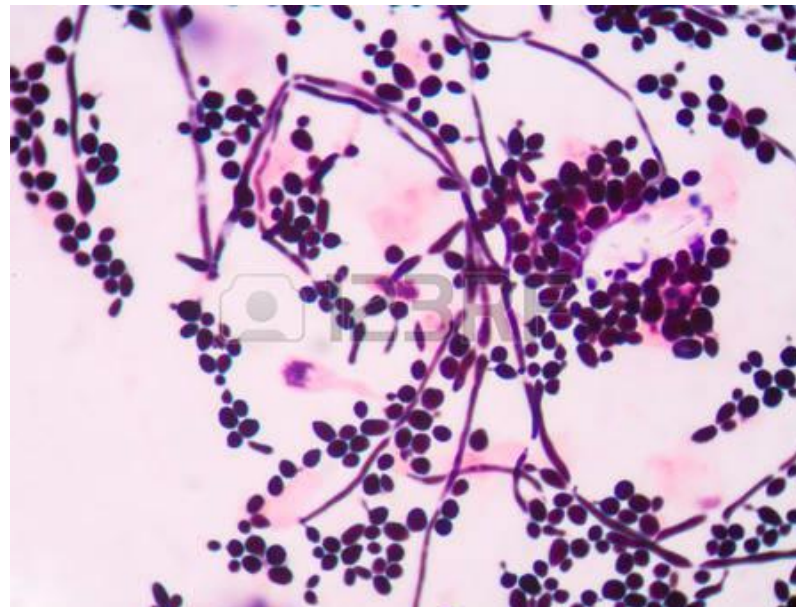
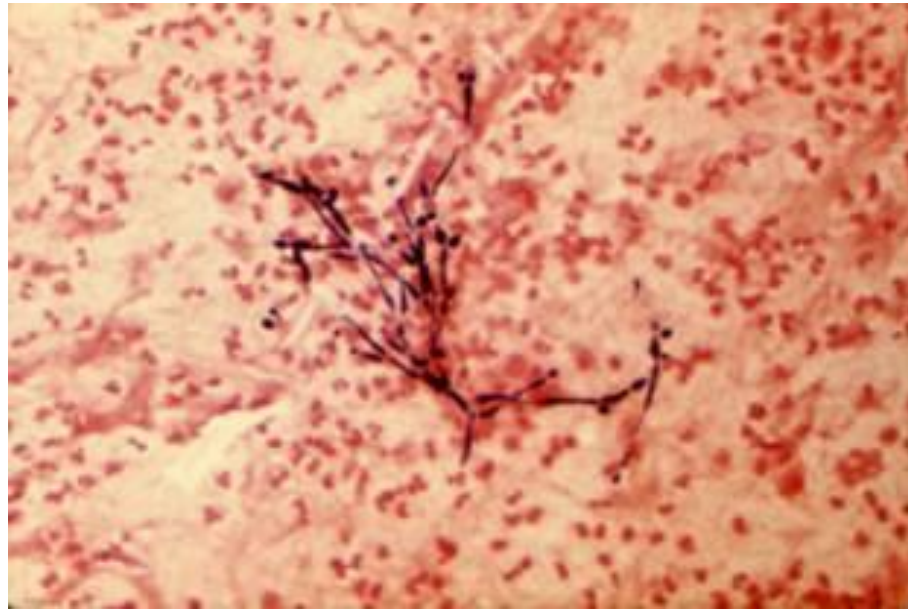
- ❑ São os principais causadores de micoses cutâneas superficiais
  - ❑ Microsporum
  - ❑ Trychophiton
  - ❑ Epidermophiton
  
- ❑ Capacidade de digerir queratina e parasitar estruturas queratinosas
  
- ❑ Normalmente identificados através da coloração H&E
  
- ❑ Maioria PAS+
  
- ❑ Podem ser identificados recorrendo a colorações argênticas

## **Fungos – Micoses profundas**

- ❑ Afetam a pele e o aparelho respiratório, podendo tornar-se disseminadas
- ❑ Infecções oportunistas em imunodeficientes e toxicodependentes ou como complicação de uma infecção já existente
- ❑ Maior risco: trabalhadores rurais

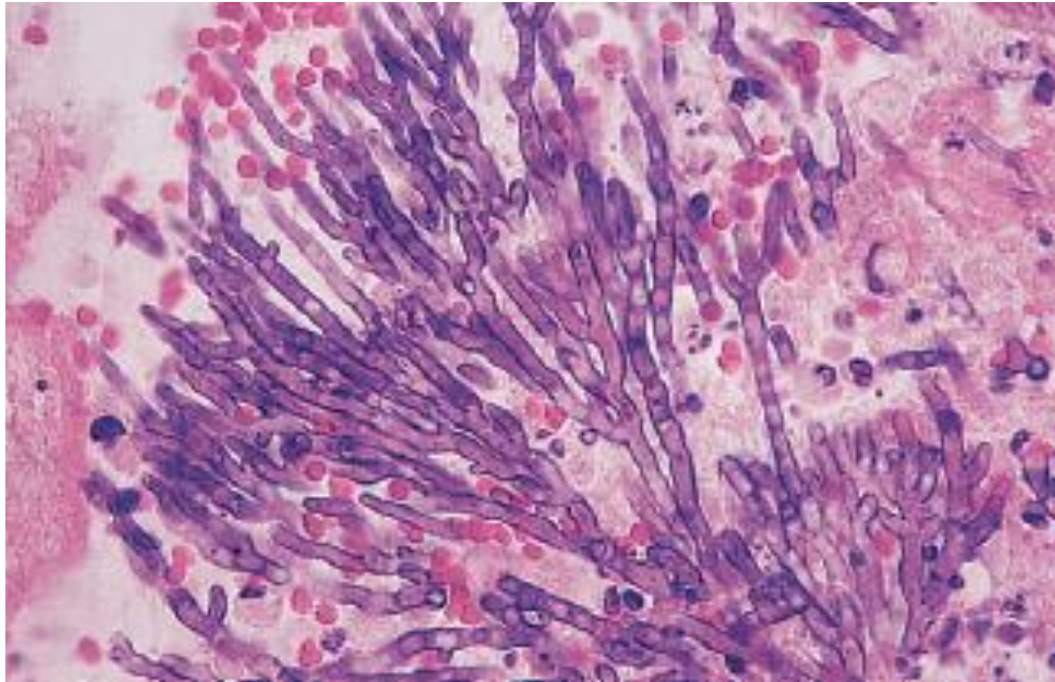
## Fungos – Candida albicans

- ❑ Organismo comensal, que se torna patogénico de forma oportunista
- ❑ Lesões:
  - ❑ Podem ser simples lesões cutâneas da mucosa oral ou vaginal
  - ❑ Infeções sistémicas (em imunodeficientes) que envolvem o aparelho respiratório (podem causar meningite ou endocardite)
- ❑ Formas arredondadas: podem-se observar divisões ou formações com filamentos não ramificados
- ❑ Esporos: Gram+
- ❑ Ambas as formas podem ser evidenciadas com PAS



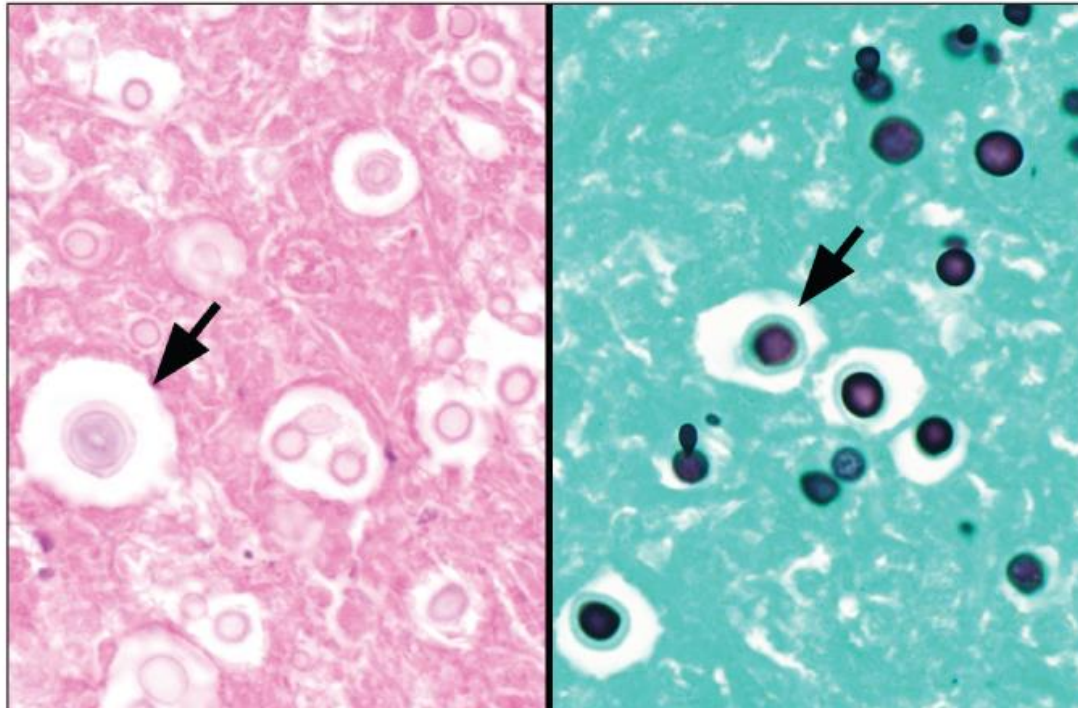
## Fungos – Aspergillus

- ❑ Organismo comensal, que se torna patogénico de forma oportunista
- ❑ Filamentoso cujas hifas são septadas e se ramificam de forma dicotómica
- ❑ Podem ser normalmente observadas estruturas produtoras de esporos na porção mais ramificada das hifas
- ❑ As hifas são:
  - ❑ Basófilas na coloração H&E
  - ❑ Boa identificação com PAS ou Grocott



## Fungos – Cryptococcus neoformans

- ❑ Apresentam-se unicamente na forma de esporos
- ❑ Causador de infecções oportunistas do aparelho respiratório, podendo no entanto dar origem a meningite e a lesões cutâneas
- ❑ Gram+
- ❑ Cora também com PAS e Azul de Alcian
- ❑ É passível de ser evidenciado por técnicas que utilizam prata, no entanto a cápsula não fica impregnada

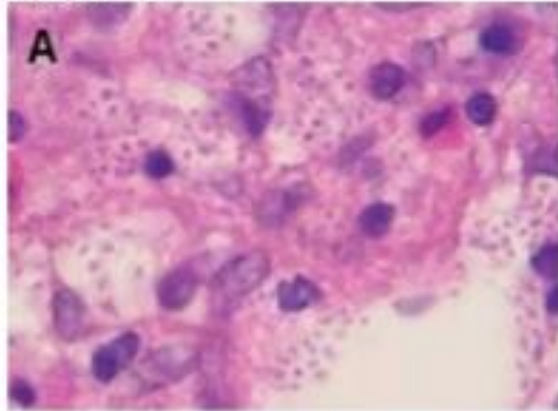


Demonstra um vazio branco devido à presença  
de uma cápsula extracelular polissacárido

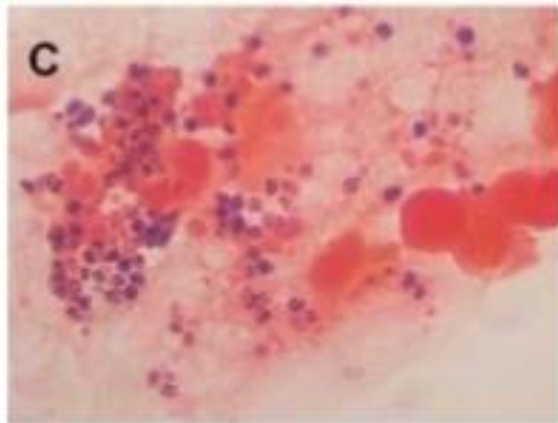
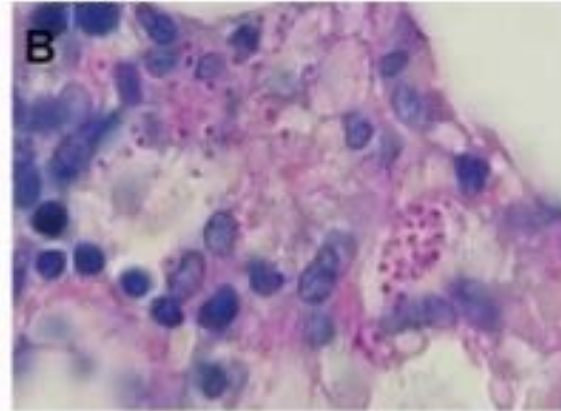
## Fungos – Histoplasma capsulatum

- ❑ Causador da histoplasmose
- ❑ Fungo esporular, oval e parasita intracelular em macrófagos
- ❑ Causa reações granulomatosas com células do tipo epitelióide, que podem induzir em erro de se tratar de uma tuberculose não caseosa
- ❑ H&E não é específico
- ❑ Coloração com prata determina a natureza fúngica deste microorganismo

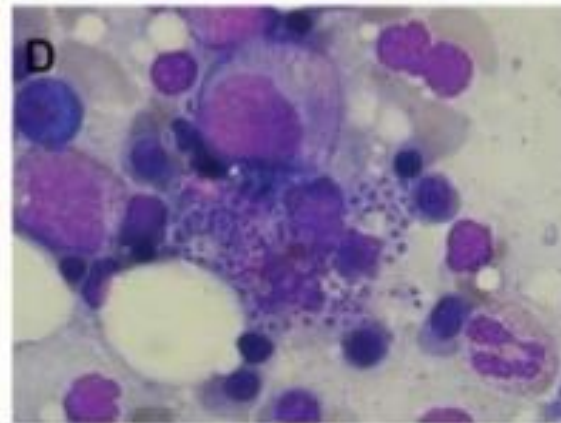
**H & E**



**PAS**

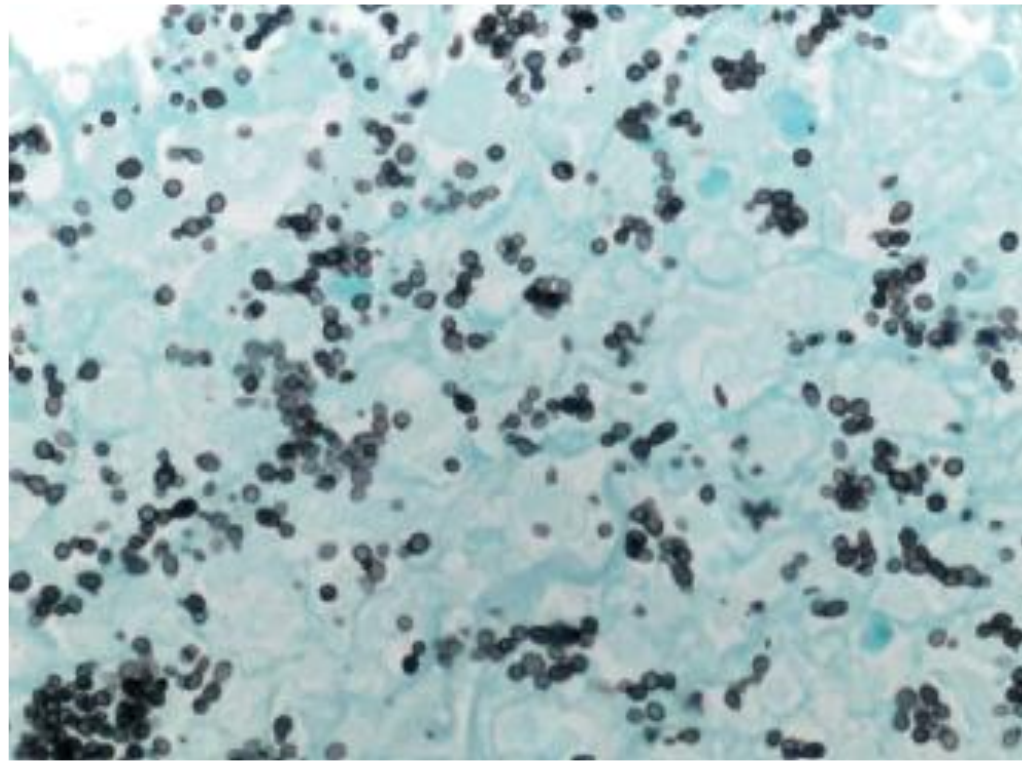


**Gram**



**Wright's**

## Grocott

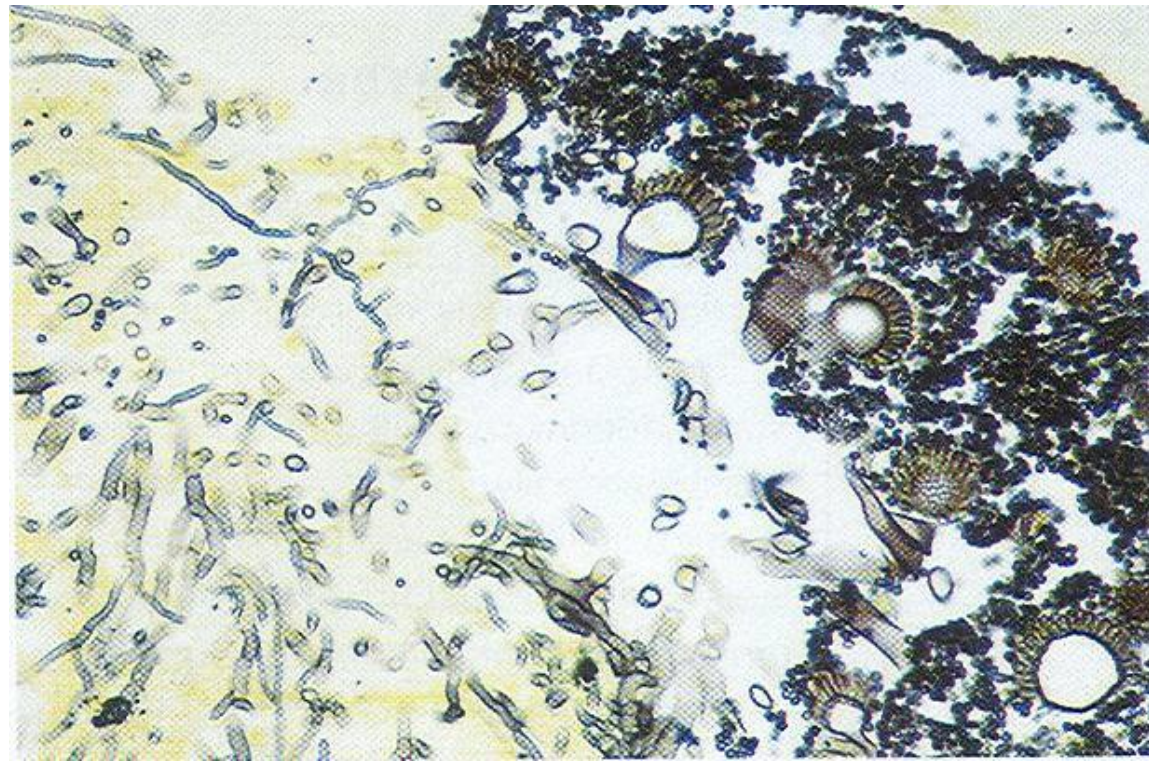


## Técnica – Grocott

- ❑ Baseia-se na impregnação pela prata e redução da mesma, pelos grupos aldeído que surgem após a oxidação de componentes da parede celular do fungo pelo ácido crómico
- ❑ Melhor método para a deteção de fungos em cortes histológicos
- ❑ Os fungos adquirem uma coloração negra forte, que se torna contrastante com o fundo verde pálido

## Protocolo – Grocott

- Desparafinar e hidratar
- Oxidar os cortes em ácido crômico
- Lavar em água corrente, depois passar por água destilada
- Lavar o corte com bissulfito de sódio
- Lavar em água corrente, depois lavagens em água destilada
- Submergir as lâminas numa solução de prata e incubar a 60°
- Várias lavagens em água destilada
- Tratar com cloreto de ouro
- Várias lavagens em água destilada
- Fixar em tiosulfato de sódio
- Lavar em água corrente
- Contrastar com verde luz
- Desidratar, diafanizar e montar

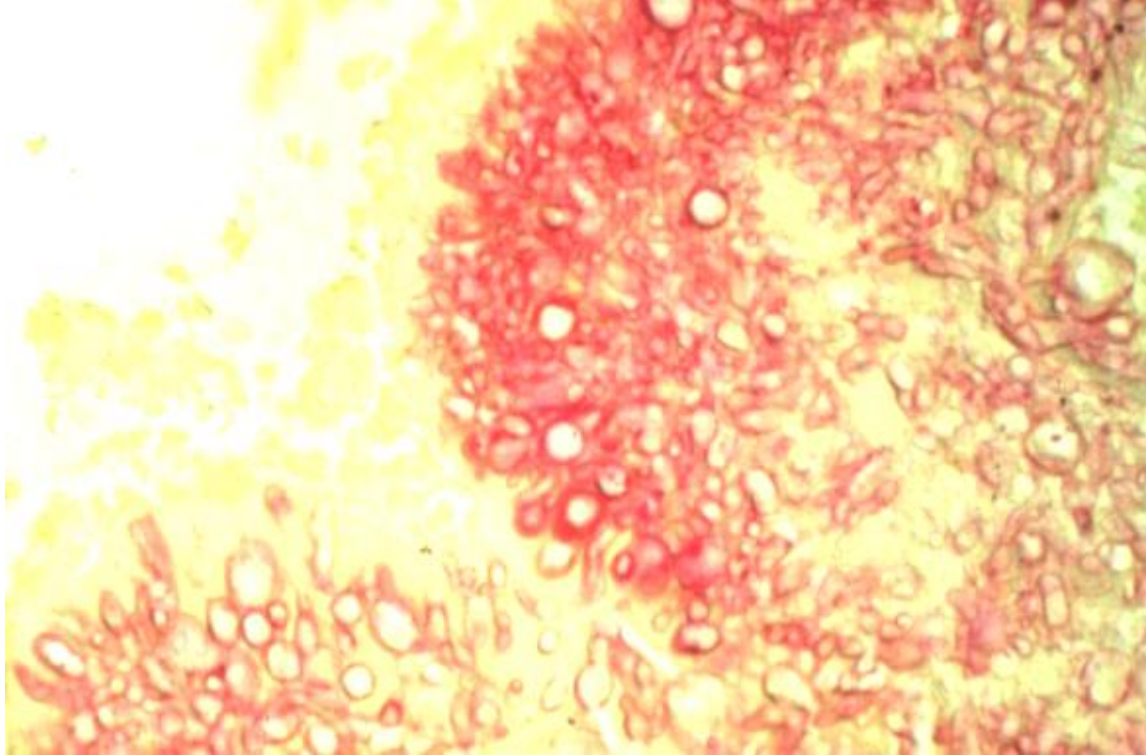


## Técnica – Gridley

- ❑ Permite uma visualização mais detalhada da estrutura interna do fungo quando comparada com a de Grocott
- ❑ A técnica é falível quando se pretende identificar fungos que estão em pequena quantidade no tecido
- ❑ A técnica é uma modificação do PAS, sendo o seu protocolo similar
- ❑ Observa-se as hifas e esporos a vermelho, as fibras elásticas a azul e o fundo amarelo

## Protocolo – Gridley

- Desparafinar e hidratar
- Oxidar os cortes em ácido crômico
- Lavar em água corrente
- Reagente Schiff
- Lavar em solução ácida
- Corar com fucsina aldeídica
- Lavagem alcoólica, seguida de lavagem em água corrente
- Contrastar em amarelo de metanilo
- Desidratar, diafanizar e montar

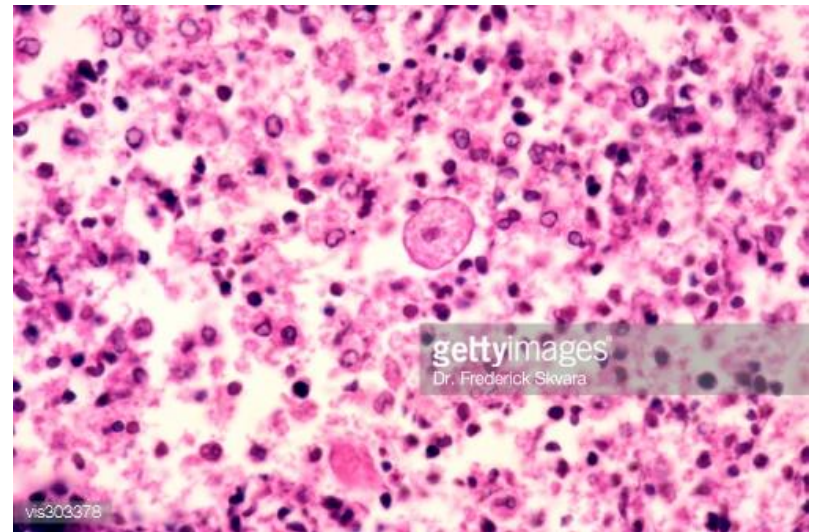
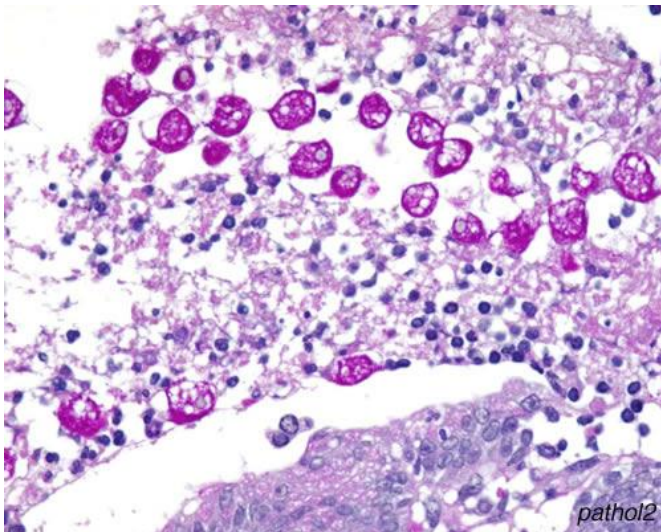


## Protozoários

- ❑ Microorganismos unicelulares que agem em estruturas complexas
- ❑ O meio de locomoção destes ajuda a sua classificação
  - ❑ Ex: Amibas movem-se utilizando extensões de citoplasma (pseudópodes)
  - ❑ Outros movem-se recorrendo à movimentação de cílios ou flagelos
- ❑ Facilmente observados e caracterizados pela coloração H&E
  - ❑ Colorações como Giemsa, PAS ou Grocott ajudam a detetar certo tipo de protozoários

# Protozoários – Entamoeba histolytica

- ❑ Causadora de disenteria, causando necrose, ulceração e por vezes perfuração do intestino grosso
- ❑ Contem pequeno núcleo e citoplasma espumoso e parasita intracelular em macrófagos
- ❑ Facilmente observada com H&E, os quistos são melhor evidenciados com PAS pois possuem uma parede rica em glicogénio



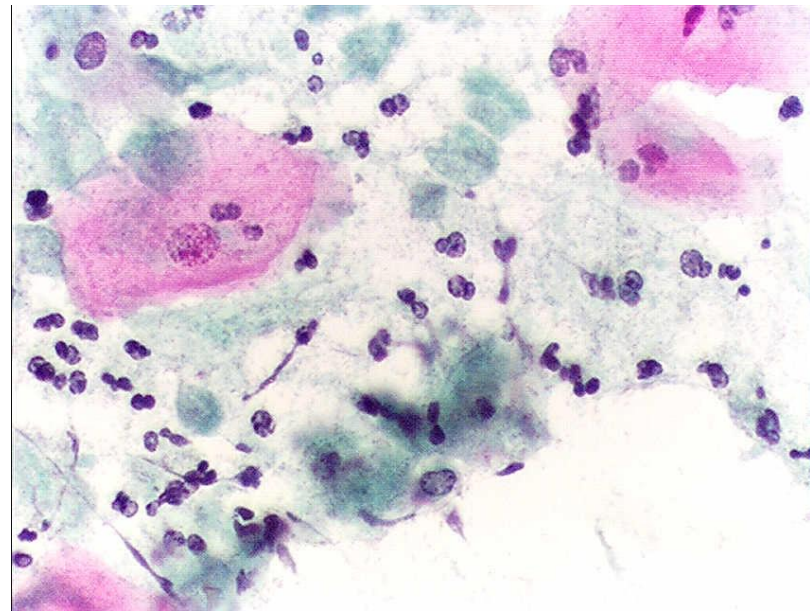
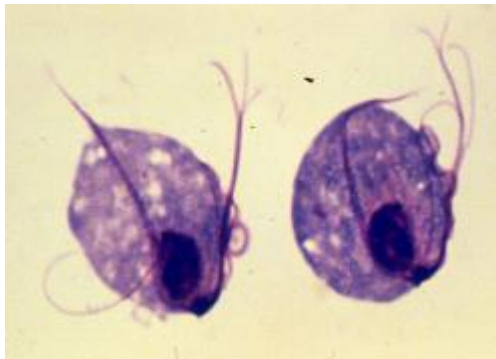
## Protozoários – Giardia lamblia

- ❑ Flagelado associado a distúrbios gastrointestinais
- ❑ Adquirem formas triangulares, quadrangulares ou foice
- ❑ Coloração azulada (H&E), podendo ser melhor evidenciados depois de corados com Giemsa



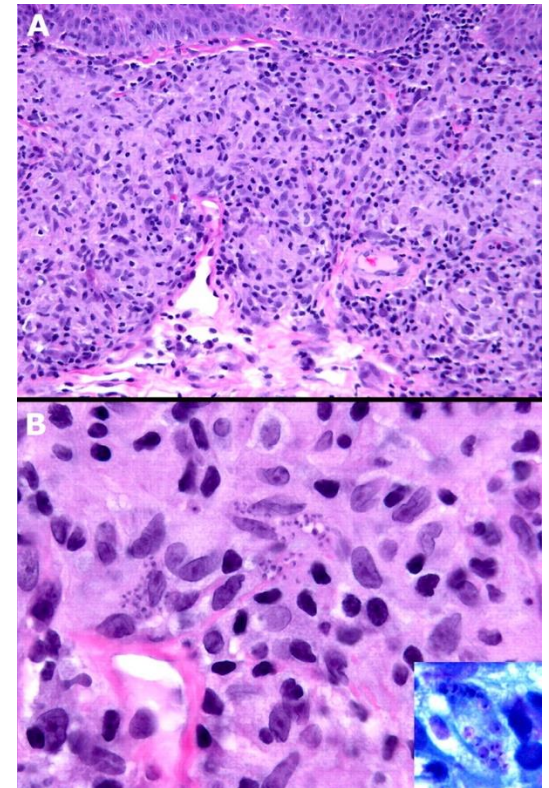
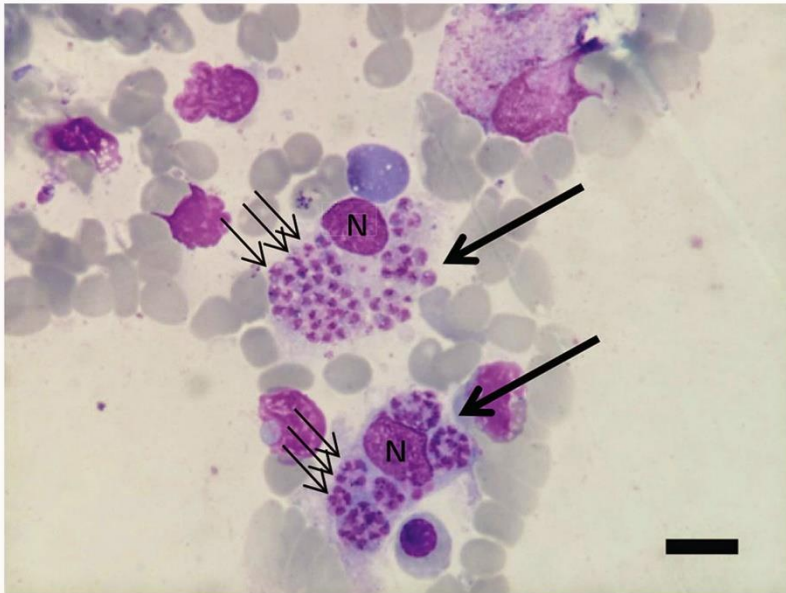
## Protozoários – Trichomonas hominis

- ❑ Flagelado que habita nos intestinos associado a disenteria e diarreia
- ❑ *T. Vaginalis* (sub-espécie): causa inflamação da vagina e uretrite nos homens



# Protozoários – Leishmania

- ❑ Desde simples lesões cutâneas a doenças viscerais graves
- ❑ Observados com H&E e evidenciadas facilmente com Giemsa
- ❑ Encontrados em grandes números dentro do citoplasma de múltiplos histiócitos inchados que vão a lesões na derme

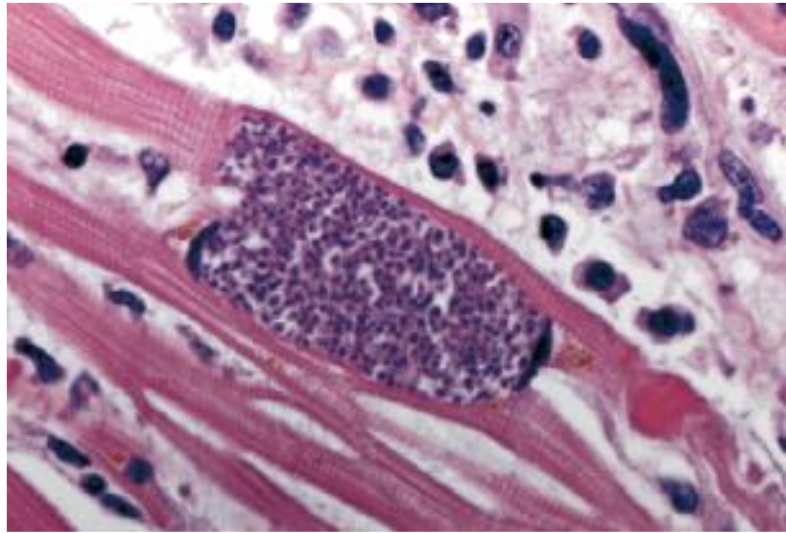


## Protozoários – Plasmódio da Malária

- ❑ Várias espécies com diferentes patogenias
- ❑ Produzem um pigmento malárico que por vezes pode obscurecer os parasitas
- ❑ Observado com H&E, sendo mais evidente quando utilizado o Giemsa

## Protozoários – Toxoplasmose

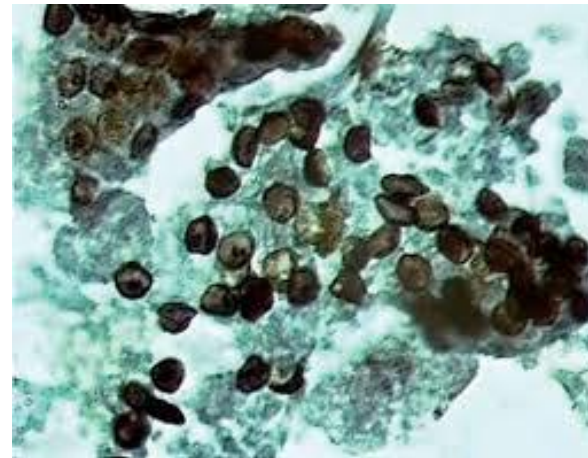
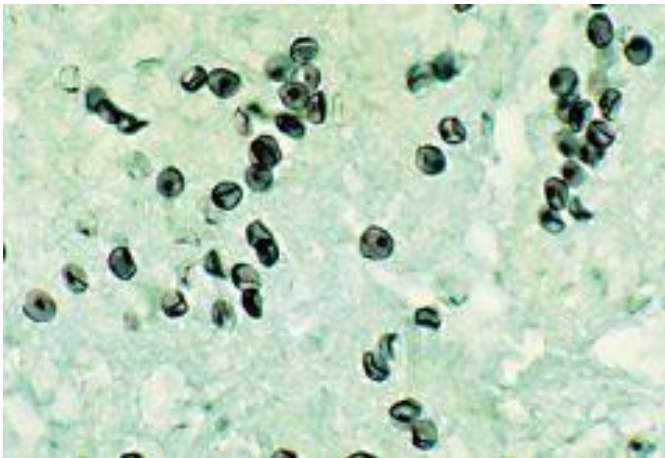
- ❑ Doença infecciosa provocada pelo toxoplasma gondii
  - ❑ Durante a gravidez pode levar à morte do feto ou malformações
- ❑ Forma arredondada ou crescente, observado como inclusão citoplasmática
- ❑ Observado com H&E (ex: tecido cardíaco - quistos); e facilmente observado com Giemsa



H&E – toxoplasma gondii no tecido cardíaco

# Protozoários – Pneumocystis carinii

- ❑ Extracelular, principal causador de pneumonia no doente imunodeficiente
- ❑ Em forma de parasitas livres ou enquistados:
  - ❑ Parasita livre dificilmente observado pela H&E: usa-se Giemsa
  - ❑ A parede dos quistos que é bastante espessa tem uma marcação positiva para colorações que utilizam prata como o Grocott



## Helmintos

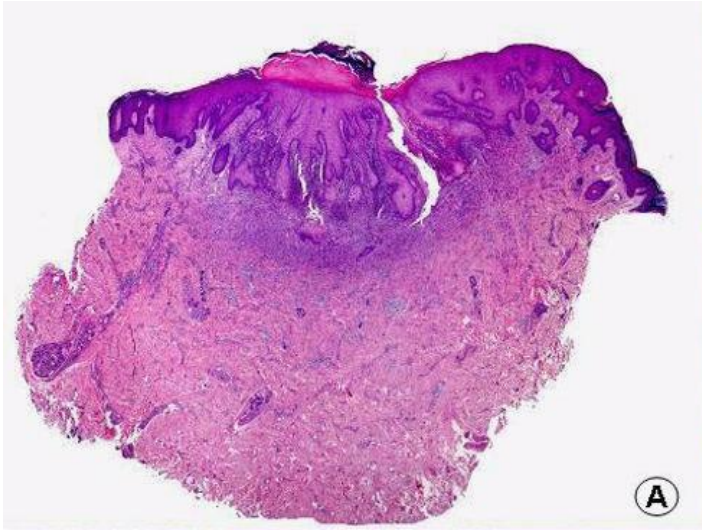
- ❑ Parasitas dos intestinos (podendo ser observados macroscopicamente)
  - ❑ Identificados os ovos através da H&E
- ❑ Os membros mais importantes são os **Nematodes** (*Ascaris lumbricoides*); **Sestodes** (*Taenia saginata*); **Trematodes** (*Schistosoma*)

# Vírus

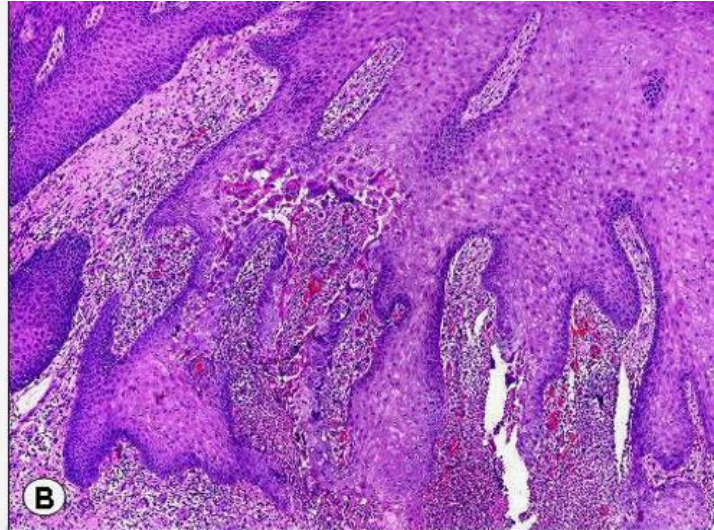
- ❑ Organismos acelulares, com uma cápsula proteica envolvendo material genético
- ❑ As partículas virais em si não podem ser observadas a microscópio ótico
- ❑ Durante a fase de replicação no interior das células formam estruturas que podem ser observadas – **inclusões virais**
  - ❑ Podem ocorrer no citoplasma, no núcleo ou em ambos – H&E
  - ❑ Estruturas acidófilas – coradas pela eosina
  - ❑ Por possuírem ADN podem igualmente ser evidenciados por técnicas que coram este tipo de estruturas

## Vírus - Herpes

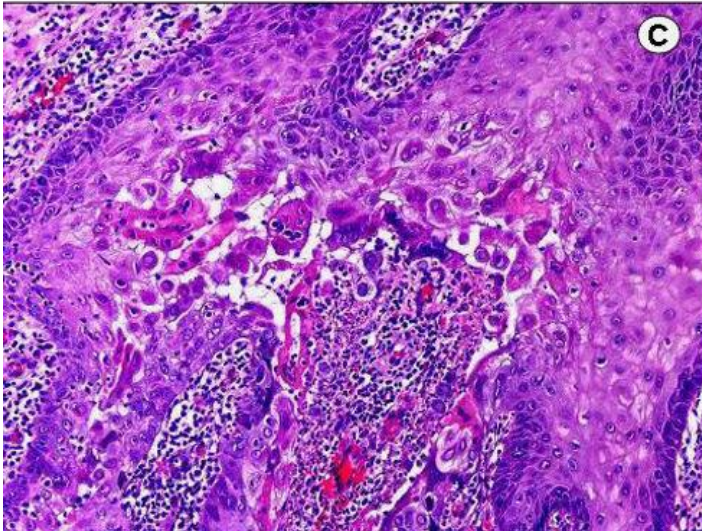
- ❑ Formam inclusões intranucleares nas células que rodeiam a lesão principal
- ❑ Na coloração H&E as inclusões adquirem uma cor vermelha no núcleo
- ❑ As infeções a este vírus podem originar células multinucleadas com inclusões intranucleares
- ❑ Microscopicamente as inclusões adquirem a semelhança de vidro de fundo garrafa



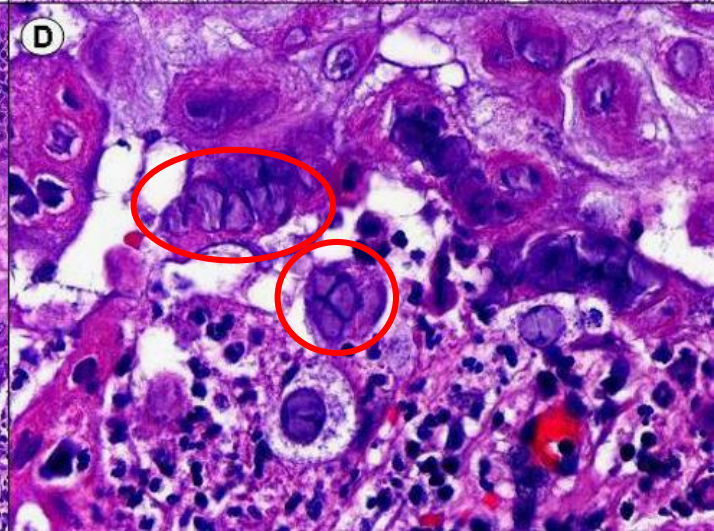
A



B



C



D

# Vírus - Citomegalovírus

- ❑ Infecção pulmonar oportunista:
  - ❑ Inflamação, necrose e consolidação focal ou completa do pulmão afetado
- ❑ Inclusão intranuclear (eosinofílica) com o aspeto característico de olho de mocho
- ❑ As células infetadas podem apresentar pequenos corpos intracitoplasmáticos basofílicos

