

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA HISTOQUÍMICA

Dr. Francisco de Castilhos Marques Pereira

Docente Livre de Histologia e
Embriologia Geral

Considerações gerais

Tratando-se de assunto novo e de pouca divulgação em nosso meio, lembrei-me de trazer alguns comentários com objetivo de coopear em tão empolgante departamento da Histologia.

Veu a Histoquímica ampliar os horizontes da técnica histológica e contribuir com subsídio incalculável para o desvendamento da histologia moderna tão bem conduzida pelo Prof. Antonio Policard, da Faculdade de Lyon.

Antes, porém, de abordarmos o tema a que nos propomos, necessário é tecermos alguns comentários em torno da análise cromática da microquímica e da microanálise que são elementos básicos e fundamentais para o estudo da Histoquímica.

Assim, resolvemos apresentar alguns dados que julgamos úteis para melhor clareza, do que realmente são estes métodos que tão grande contribuição têm fornecido ao desenvolvimento da moderna técnica da Histoquímica.

Consiste a análise cromática na evidencição dos elementos citológicos ou teciduais por meio do emprêgo de reativos corantes, cuja ação específica sobre os mesmos já é previamente conhecida.

A Microquímica baseia-se nas mesmas leis que regem a Macroquímica. Ela é vasta e variada, abrangendo todos os capítulos da química e encontrando aplicações em todos os domínios das ciências experimentais.

A Microquímica pode ser analítica ou sintética, qualitativa ou quantitativa, orgânica, mineral ou biológica.

Fundada no início do nosso século por F. Emich e seus colaboradores, seus horizontes são vastos e vastos também os domínios onde se tornou indispensável. São devidos à Microquímica quasi todos os atuais conhecimentos sobre os hormônios e vitaminas, cujas delicadas técnicas permitiram penetrar na constituição de quantidade muito reduzida de matéria. Um dos mais importantes capítulos da Microquímica é, sem dúvida, a microanálise que permite não só identificar, como ainda dosar os princípios imediatos e os elementos constituintes das substâncias submetidas ao estudo.

Passemos agora ao conceito de Histoquímica, que para nós constitui uma especialização da Microquímica. Dizemos especialização porque a Histoquímica consiste não só em caracterizar com exatidão os elementos, mas determinando, também, o lugar em que existem na célula e nos tecidos. Podemos, então, dizer que a Histoquímica é a Microquímica topográfica da célula. Após os rápidos dados que acabamos de apresentar, necessário é que se esclareça o que para nós repre-

sentam estes processos de manipulações laboratoriais. Encarando sob o ponto de vista da Histoquímica, os processos de análise cromática e de Microquímica nada mais são do que os tempos indispensáveis à realização da Histoquímica.

Assim, quando fazemos, por exemplo, a coloração das substâncias graxas com o ácido ósmico, Sudan III, escarlate R, azul de Nilo, etc. praticamos uma coloração específica, isto é, antecipadamente sabemos que estes reativos corantes as tingem de uma maneira especial, cujos matizes já nos são igualmente conhecidos.

Ainda, quando praticamos colorações eletivas com a eosina e hematoxilina, sabemos de antemão que estas matérias corantes vão se instalar no citoplasma e núcleo celular, respetivamente.

Perguntamos si nestes processos de coloração específica e eletiva, não se realizam reações de natureza química?

A resposta naturalmente é a resultante do que se observa; ora, si os tecidos se evidenciam mediante transformações da cor que possuem em face de determinados reativos, claro é que, estas colorações se efetuam graças a uma operação de ordem química.

Chegamos, assim, à conclusão de que em técnica histológica não podemos isolar a Microquímica da análise cromática.

Encarando a questão sob as mais variadas técnicas da Microquímica, isto é, a investigação dos elementos celulares e teciduais, empregando para esse fim um sem número de reativos químicos, verificamos que a presença de determinadas substâncias se apresenta aos olhos do observador sob aspecto perfeitamente nítido em relação às cores e que essas se formam naturalmente a custa de reações químicas, de transformações realizadas entre os reativos e as substâncias em apreço, demonstrando assim que de fato a análise cromática é a resultante da Microquímica.

Para nós, o que se passa na intimidade dos tecidos, é de fato uma reação química cujo índice de evidenciação reside na apresentação de uma determinada cor.

Quando estudamos as colorações em geral, vemos que todas elas se efetuam por uma afinidade de ordem química entre os reativos e as células, isto por mais simples ou complexas que sejam.

Antes do advento da Microquímica elas já existiam (as colorações), e assim foram postos em evidência, paulatinamente, todos os constituintes da célula.

Pensamos aqui da mesma maneira em relação a estes processos, pois, ainda não se cogitava de Histoquímica e ela já se fazia sentir, por mais grosseiras que fossem as técnicas, na demonstração dos elementos essenciais da célula, tingindo de uma maneira geral, o citoplasma, núcleo e algumas de suas edificações e elaborações. A Histoquímica foi lançada assim, aos poucos, e hoje ela nos dá técnicas delicadíssimas como as que se utilizam na pesquisa dos diferentes elementos constitutivos e próprios a cada célula, cada tecido, cada órgão e cada aparelho: assim verificamos a presença do ferro, potássio, sódio, cálcio, colete-

ról, etc. Mas, sempre tendo na nossa opinião, como resultante final, a adição da análise cromática à Microquímica, isto é, à aparição de colorações exatas em relação aos reativos empregados; finalizando, em um processo cromático. Justificamos ainda a nossa maneira de encará-las, lembrando que todas as vezes em que a Histoquímica é realizada ou se originam cores próprias às diversas reações ou então, não se processam, e a substância a investigar muda de estado, isto é, sofre alterações de ordem física, como por exemplo a pesquisa do colesterol pela digitonina em que não há formação de côr, mas, sim, a cristalização da mesma ou então verifica-se pela solubilização ou precipitação.

Finalizando estas considerações podemos dizer que tanto em Microquímica como em Histoquímica fazemos análise físico-química, pois de acôrdo com certos autores a análise cromática serve para nos dar os caractéres morfológicos, enquanto que a Microquímica e a Microanálise nos informam sobre a constituição dos elementos em estudo.

Técnica da Histoquímica

Após as definições e conclusões de ordem geral que preliminarmente estabelecemos, necessário torna-se a coordenação de técnicas esparsas adotadas por vários histólogos e a orientação que desejamos dar ao desenvolvimento da Histoquímica como grande recurso técnico e ilustrativo para a Histologia de nossos dias e do porvir.

Contando ainda com poucos colaboradores, vem a técnica histoquímica, entretanto, abalando o homem de laboratório, que ao procurar esmiuçá-la, dá a cada substância a investigar métodos e processos diversos. Conforme nossas observações, fruto da experimentação, julgamos que necessário se torna traçar em face da substância a pesquisar um método que devemos seguir para a obtenção do que desejamos.

Assim, tentamos da maneira que nos é possível, estabelecer um esboço de técnica geral a ser seguida neste departamento da anatomia microscópica.

Estudando os trabalhos do Prof. Policard e de seus discípulos e contribuindo com a nossa insignificante observação técnica, propomos que a marcha a seguir em tais pesquisas, obedeça em linhas gerais ao plano que abaixo expomos, si bem que, casos há, que além desta conduta tenhamos que associar, de acôrdo com a matéria a pesquisar, outros métodos.

Assim pensamos e partindo do princípio básico que a preocupação da Histoquímica é a revelação, in loco, dos elementos químicos nas diversas partes das células e dos tecidos, achamos conveniente, antes de mais nada, distribuirmos o assunto da seguinte maneira:

- 1) — Material a fresco ("in-vivo")
- 2) — Material fixado ("post-mortem")
- 3) — Material incinerado ("cinzas).

Material a fresco

Para realizarmos pesquisas em material a fresco, isto é, "in vivo", temos que recorrer às colorações vitais, utilizando naturalmente reativos cujas reações citológicas já nos sejam previamente conhecidas (colorações específicas).

Este processo, indiscutivelmente, constitue o ideal em técnica histológica, mas infelizmente o seu campo de ação nos apresenta fronteiras reduzidas.

Material fixado

Constitue a fixação a base da técnica histológica. Em histoquímica a escolha do fixador representa, de regra, papel fundamental, pois, temos que utilizar fixadores simples, cuja composição não traga posteriormente prejuízos relativos à impregnação dos tecidos fixados.

Em geral, opinam os técnicos que o fixador empregado seja o formol a 10%.

Após a fase anterior, tratamos a peça consoante a técnica geral, tomando cuidado de empregarmos os corantes conforme a substância a pesquisar.

Material incinerado

Este processo idealizado por Policard encontra sua ampla aplicação na pesquisa dos elementos minerais das células e dos tecidos.

Consiste o método, de acôrdo com as prescrições do autor, em se colocar sobre lâmina de vidro (especial) o corte de um tecido e levar a temperatura de 600 a 700 graus, em forno especial, com o objetivo de produzir a formação de cinzas, que comparadas com um corte idêntico, corado pelos métodos comuns da histologia, possibilite a pesquisa da natureza das referidas cinzas, bem como, a sua localização no corte.

O forno utilizado recebeu o nome do autor.

Para verificar a localização das cinzas podemos ainda lançar mão de aparelhos denominados micromanipuladores (Chambers ou Petterfi-Zeiss) que realizam verdadeira microcirurgia (Escola Americana) das células e tecidos.

Este processo permite assim a pesquisa do ferro, cálcio, potássio, sódio, etc., que são transformados pela microincineração em sais minerais.

O método, como diz muito bem Policard, dá como resultado o "esqueleto mineral" do corte.

Na técnica histoquímica podemos ainda lançar mão de um processo novo que é a histoespectrografia, que permite analisar as substâncias em fases sucessivas, apreciando assim, de maneira mais nítida, a marcha do processo empregado.

E' de real valor também em Histoquímica o processo de congelção, conservando a peça sem coagular os albuminóides protoplásmicos, dispensando a ação de fixadores.

E' objetivo da Histoquímica, não só a análise qualitativa, mas interessa-se igualmente na análise quantitativa, cujos métodos variam também de acôrdo com a natureza da substância a investigar.

Como síntese do que acabamos de expor, apresentamos a seguir o quadro sinótico da melhor maneira que nos foi possível condensar tão palpitante assunto.

Técnica histoquímica

Material a fresco ("in vivo")	{ Colorações vitais Congelção Histoesspectrografia
Material fixado ("post-mortem")	{ Formol a 10% (fixador) Coloração conforme a pesquisa (corantes específicos) Histoesspectrografia
Material incinerado (cinzas)	{ Forno de Policard Lâminas de vidro especial Micromanipulador Reativos para microquímica Histoesspectrografia

Para a tosse e suas funestas
consequencias, uzar sómente
Peitoral de Angico Pelotense

E' tiro e queda.

Deposito: Laboratorio Peitoral de Angico Pelotense, Pelotas