

UNIFEOB  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO  
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR  
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**AS HISTOTÉCNICAS PARA O ESTUDO DE  
HISTOLOGIA**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

UNIFEOB

CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO

OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR

BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## **AS HISTOTÉCNICAS PARA O ESTUDO DE HISTOLOGIA**

### NOME DO MÓDULO

Cálculos aplicados aos Sistemas Biológicos – Carlos Alberto Colozzo De Souza

Química dos Sistemas Celulares – Odair José dos Santos

Biologia Celular – Cíntia Lima Rossi

Projeto Integrado – Ricardo Alexandre Rosa

Anatomia e Histologia – Amilton Cesar dos Santos

### Estudantes:

Dezidéria Cristine **DE PAULA**

Emile Carvalho **HIRATA**

Laura Simões dos **SANTOS**

Lucas André Constantino de **CASTRO**

Maria Eduarda Grama **MACHADO**

Natan **BATISSOCO**

Stefany Luiza **DE PAULA**

Vinícius Willian Brandão **COSTA**

2022

## **AS HISTOTÉCNICAS PARA O ESTUDO DE HISTOLOGIA**

Dezidéria Cristine **DE PAULA**<sup>1</sup>; Emile Carvalho **HIRATA**<sup>1</sup>; Laura Simões dos **SANTOS**<sup>1</sup>;  
Lucas André Constantino de **CASTRO**<sup>1</sup>; Maria Eduarda Grama **MACHADO**<sup>1</sup>; Natan  
**BATISSOCO**<sup>1</sup>; Stefany Luiza **DE PAULA**<sup>1</sup>; Vinícius Willian Brandão **COSTA**<sup>1</sup>;

<sup>1</sup> Discente do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos  
Amilton Cesar **DOS SANTOS**<sup>2</sup>; Carlos A. C. **SOUZA**<sup>2</sup>; CÍNTIA L. **ROSSI**<sup>2</sup>; Odair  
**SANTOS**<sup>2</sup>; Ricardo A. **ROSA**<sup>2</sup>;

<sup>2</sup> Docente do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos

Curso de Ciências Biológicas e Biomedicina Bacharelado

UNIFEOB

### **INTRODUÇÃO**

Junqueira e Carneiro na obra Histologia Básica (2004, p. 1) afirmaram que: “Histologia é o estudo das células e dos tecidos do corpo e de como essas estruturas se organizam para construir os órgãos.” Tendo como principal objetivo entender suas matérias e assim, tendo certa noção sobre sua estrutura e o modo no qual funcionam - como um grupo ou de forma individual - de maneira com que seus determinados conjuntos também sejam analisados, compreendendo que cada célula é responsável por desenvolver um papel, buscando sobretudo proteger, calcificar, retratar, curar, revestir e substituir em caso de perda de alguma dessas células contribuintes para as demais funções.

A histologia também constitui as principais ferramentas usadas para a ampliação desses estudos tais como os aparelhos usados como auxílio no processo de entendimento do tecido, sendo estes responsáveis pela reparação e pela expansão da visibilidade dos detalhes que muitas vezes não pode ser visto a olho nu, isto porque existem determinadas condições que são ampliadas no laboratório para que a percepção da matéria seja aprofundada, fazendo assim sua histologia ser um pouco mais desenvolvida e certa. Contudo, é necessário ressaltar a importância do microscópio de luz (também intitulado microscópio óptico) que desenvolve a parte única e principal da histologia pois, é através deste que as análises são feitas, construindo assim uma percepção e estudo da sua química, física, imunologia e também de sua patologia, consequentemente tendo a realização de que isto também contribui para sua parte biológica e,

no entanto, compreendendo como seus reagentes funcionam. Além disso, são descritas algumas das metodologias mais utilizadas para investigar a função e o metabolismo dessas estruturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Evidencia-se que, o microscópio além de ser o principal instrumento de estudo, é o contribuinte da ampliação da imagem que se instaura através da lâmina pelo feixe de luz, sendo como um grande aumento para os mínimos detalhes escondidos numa pequena parte do material estudado, facilitando a visibilidade de suas substâncias ao longo do período em que aquele tecido está sendo analisado, além de criar uma melhor percepção através das lentes de aumento.

No entanto é de extrema importância ressaltar que a histologia é moldada pelo uso de cortes histológicos sendo uma das principais etapas dentre as demais citadas, já que é a partir disto que a preparação das lâminas são feitas, para depois serem observadas ao microscópio óptico, levando também o uso de outras ferramentas essenciais para examinar o material, tais como a base o tecido usado para o estudo, ou seja, seu material, pincéis, pinças para uma melhor segurança e higiene e luvas por algumas das vezes, buscando sempre preservar a estrutura da matéria.

A histologia, contudo, busca ampliar o conhecimento através de estudos aprofundados e tem como principal característica compreender a estrutura, a função e a capacidade das células.

O objetivo do início desta etapa de histotécnica tem como princípio a análise de estudos sobre as lâminas, os protocolos de segurança dentro e fora do laboratório, os métodos histológicos no processo de criação dos materiais usados para análise e as diversas funções desses materiais como métodos de estudo.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Materiais gerais: álcoois 70%, 80%, 95%, 100% e etílico, banho maria histológico, bisturi, elatan, estufa, lâmina e lamínula, luvas de procedimento, microscópio óptico, micrótomo, moldes de metais, parafina, pinça dente de rato, rato da espécie *Rattus norvegicus*, suporte de lâminas, tesoura romba-romba e xilóis 1,2 e 3.

Materiais para a coloração da hematoxilina e eosina: como corantes foi usado a hematoxilina e a eosina, além dos álcoois e xilóis.

Materiais para a coloração de Tricômico de Masson: As soluções usadas foi ácido acético, a solução de fosfomolibdico-fosfotungstico, e também os seguintes corantes: hematoxilina férrica, fucsina ácida e azul de anilina; além dos álcoois e xilóis.

Métodos: Para que possamos fazer a preparação de uma lâmina histológica e proporcionar uma observação de qualidade nas estruturas teciduais é necessário seguir os passos do preparo da lâmina corretamente.

O tecido coletado veio de ratos da espécie *Rattus norvegicus*, os órgãos de amostra da lâmina descrita neste trabalho são a traqueia e o esôfago.

Primeiramente é necessário fazer a fixação. No caso, o espécime já estava fixado no formol, dispensando, portanto, esta etapa.

Para que fosse feita a coleta, utilizando-se de um bisturi, foi aberta a cavidade abdominal e através desta foi retirado os órgãos. Esta técnica requer habilidade e cuidado, a perfuração de órgãos ou o manuseio incorreto com o bisturi pode danificar as estruturas e impossibilitar uma boa observação depois de pronta a lâmina.



Imagem x. Retirada dos órgãos (imagem: Laura S. Santos)

Não houve necessidade de realização da descalcificação, uma vez que o material coletado não tinha estrutura rígida de componentes inorgânicos (ossos e cartilagens).

Depois, foi feita a clivagem, onde o órgão foi cortado em uma parte menor. A clivagem deve ser considerada tanto para obter uma melhor fixação (caso o órgão ainda não esteja fixado) quanto para redução de tamanho para que possa caber no bloco de parafina sem ultrapassar o tamanho da lâmina. É importante considerar, tanto no momento de cortar quanto na inclusão, a posição do órgão e como ele será observado na lâmina.

A amostra deve então passar por um processamento histológico, que irá desidratar e diafanizar a peça.

A desidratação serve para retirar toda água do tecido, para que a parafina depois possa penetrar no tecido para a realização da microtomia. Para isso utiliza-se do álcool etílico em diferentes concentrações, de forma gradual.

Depois de desidratada, a amostra passou por dois banhos de xilol, para retirar o álcool e penetrar o xilol, que depois irá proporcionar uma melhor impregnação da parafina. Durante esse processo o xilol retira a cor do tecido, por isso essa etapa do processo recebe o nome de diafanização ou clarificação.

Para a impregnação, utilizou-se da parafina. É necessário deixar a parafina em estado líquido antes de avançar para esta etapa, para isso, coloca-se a parafina dentro da estufa a uma temperatura de 60°C.

Para que a parafina penetre totalmente no tecido e ocupe todo espaço, é realizado dois banhos de 1 hora cada. É importante respeitar o tempo e a temperatura para que o tecido não seja danificado.

Podemos observar na tabela abaixo o processo de acordo com cada substância e o tempo mínimo de imersão da amostra:

<b>Desidratação</b>	
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora

Álcool 90%	1 hora
Álcool 100% (I)	1 hora
Álcool 100% (II)	1 hora
<b>Diafanização ou clarificação</b>	
Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora
<b>Impregnação</b>	
Parafina I	1 hora – 60°C
Parafina II	1 hora – 60°C

Uma vez impregnado, o tecido precisa ser incluído, ou seja, colocado em um molde junto de parafina para que possa passar pela microtomia. Para isso utilizou-se de moldes de metais para realizar a inclusão. O molde foi colocado sob uma superfície lisa e limpa. A amostra foi colocada com a parte clivada voltada para baixo e a parafina preencheu todo restante do espaço.

Depois do resfriamento, o bloco ficou pronto para passar pelo corte.

Para realizar os cortes (microtomia) utilizou-se o micrótomo, uma máquina própria para fazer cortes histológicos. Os cortes realizados tiveram espessura de 5 micrômetros, ao lado do micrótomo estava o banho maria histológico, aquecido a 40°C.

Antes de atingir a superfície da amostra ainda havia uma camada relativamente espessa de parafina, para agilizar o corte realizou-se o desbastamento desta parafina para atingir o tecido.

Os cortes foram colocados no álcool 70%, assim foi realizada, com a ajuda de uma lâmina de corte, a separação dos cortes e depois com uma lâmina de microscopia foram colocados um a um no banho maria.

Como a parafina não se mistura com a água e sua densidade é menor que a da água, os cortes ficaram flutuando, possibilitando a organização dos mesmos para que não haja dobras.

Foi realizada então a pesca dos cortes, com a lâmina de microscopia em um ângulo de 45°, é realizado movimento para que o corte agarre à superfície da lâmina.

Com o corte já posicionado na lâmina é importante verificar se não há dobras aparentes, caso haja, ainda existe a chance de voltar a lâmina no banho maria para fazer novamente a pescagem sem a dobra.

Uma vez certo o corte na lâmina, é aconselhável levá-la à estufa a 60°C para que a parafina se prenda ainda mais à lâmina e não se desprenda durante o processo de coloração.

Para coloração da lâmina utilizou-se do protocolo Hematoxilina-Eosina (HE), seguindo os passos descritos na tabela abaixo:

<b>Protocolo Hematoxilina-Eosina (HE)</b>	
Xilol I	10 minutos
Xilol II	5 minutos
Álcool 100%	5 minutos
Álcool 95%	5 minutos

Álcool 70%	5 minutos
Água corrente	10 minutos
Hematoxilina	2 minutos
Água corrente	10 minutos
Eosina	3-8 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Xilol III	5 minutos

Feito a coloração o último passo é a colagem da lamínula sobre a lâmina. Para isso foi colocado uma gota de xilol sobre a lâmina (pois é solvente da cola) e uma gota da resina líquida, depois colocou-se a lamínula cuidadosamente para que não houvesse a formação de bolhas. A quantia excedente que extravasou pelas bordas da lâmina foi limpa com papel absorvente.

O Tricrômico de Masson (TM) é uma coloração especial usada principalmente para caracterizar e discriminar diferentes tecidos conjuntivos e componentes de tecidos moles. Músculo liso e queratina são corados em rosa a vermelho, colágeno em azul ou verde, e fibras elásticas em preto. Quando o colágeno é corado em verde a coloração é chamada de Tricrômico de Masson modificado por Goldner. O ácido fosfotúngstico ou fosfomolibdico é usado junto com os corantes aniônicos para criar uma solução de coloração equilibrada. A coloração consiste em coloração sequencial com hematoxilina de ferro, que cora os núcleos de preto; Escarlate de Biebrich que cora de vermelho o citoplasma e azul de anilina ou verde claro de anilina que cora o colágeno de azul ou verde, respectivamente. Essa coloração é empregada para diferenciar leiomiomas e tumores neurais. Fibrose perivascular, formação de cicatriz e lesões escleróticas também são melhor apreciadas com o uso do tricrômico de Masson.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coloração pela Hematoxilina e Eosina, conhecida também por H.E., é uma coloração mais simples, usadas para diferenciar o citoplasma do núcleo celular, podendo ser usada para auxiliar em diagnósticos e para a melhor observação dos tecidos. Nessa coloração pode ser observada duas cores o roxo e o rosa, em que no roxo podemos ver os núcleos e em rosa o citoplasma celular. Isso pode-se ser observado nas imagens abaixo:

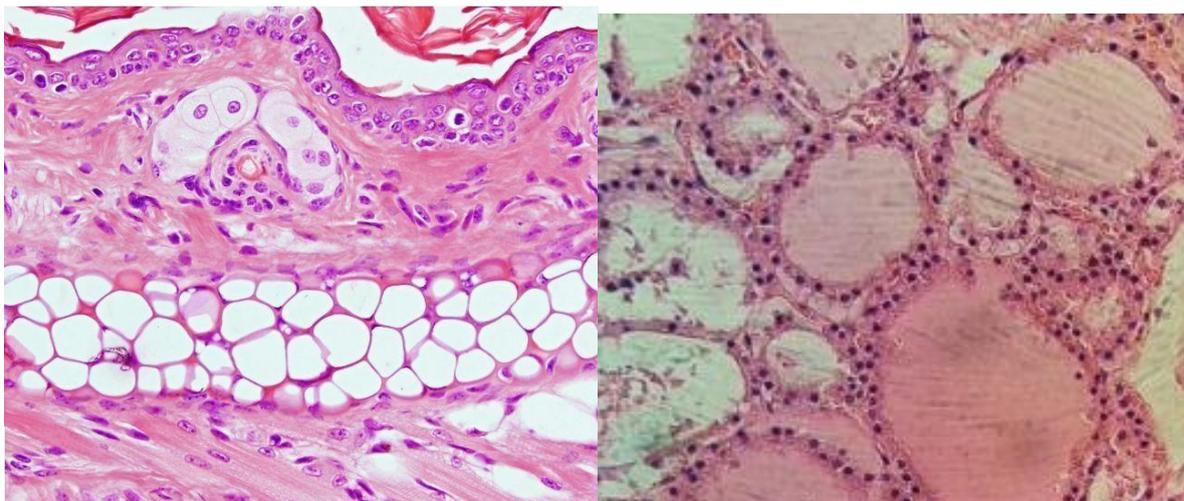
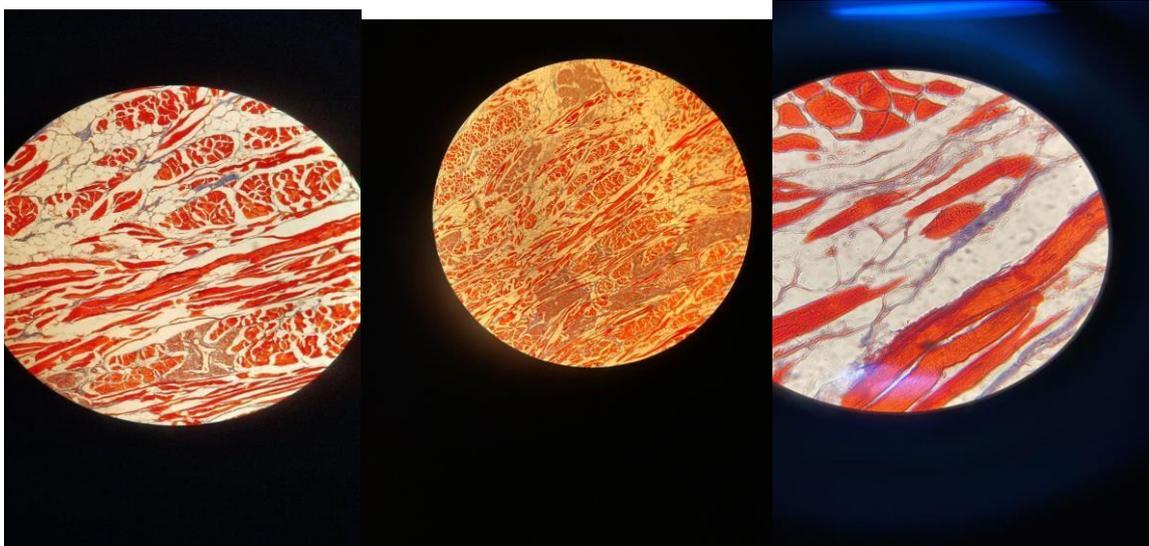


Imagem 1- Tecido cartilaginoso de um rato corado em H.E., pode se ver os núcleos em roxo e o citoplasma em rosa. Imagem 2- Glândula tireoide, corada em H.E., em roxo vemos os núcleos das células foliculares e em rosa vemos o citoplasma dessas células.

Como resultado da coloração do Tricômico de Massom podemos observar três tipos de cores diferentes, vermelho da hematoxilina férrica, preto da fucsina ácida e azul do azul de anilina. Essas cores evidenciam estruturas diferentes na célula, o vermelho cora o citoplasma, fibras e queratina, em preto os núcleos e em azul o muco e o colágeno. Este procedimento é mais complexo e é geralmente usado para destacar-se determinados microrganismos no tecido que nos ajudam a ter a percepção de seus mínimos detalhes, ajudando no diagnóstico de doenças.

É possível observa-la nas imagens abaixo:



Em ambas as imagens podemos ver o citoplasma em vermelho, em azul o muco e em preto os núcleos, todas são de um mesmo tecido só com lentes diferentes.

## CONCLUSÃO

Durante o processo de montagem da lâmina, conclui-se que os processos são bastante delicados, tendo em conta os produtos químicos.

O cuidado desde a coleta do material até a montagem da lâmina foi bastante minucioso, por conta de não danificar o tecido do material. Colocando em prática os procedimentos; Coleta e fixação do material, processo de inclusão do material em parafina, e junto a esse processo tendo a desidratação, Branqueamento, impregnação e a inclusão em parafina.

Para o próximo passo que será os cortes na microtomia onde obteremos os cortes exatos para análise dos tecidos e em seguida a coloração que consiste em nós ajudar a interpretar os componentes teciduais no microscópio óptico. E por final a montagem da lâmina.

Ao longo do processo pudemos participar na realização de cada etapa para a moldagem das lâminas. Contudo, finalizamos este ciclo de histotécnicas realizados por cada processo concluído com sucesso, pois todas as lâminas deram certo e saíram como esperado, o grupo pode entender e compreender cada método de coloração e hidratação do processo de coloração, tendo percepção de todas as etapas na criação de uma lâmina, conhecendo agora também os seus protocolos e métodos de moldagens, e satisfeitos por concluir esta etapa desse modo.

## REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia Básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 558 p

