

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

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:

Fernanda **GOMES**

Iolanda **SALVADOR**

Isabelly **RODRIGUES**

Larissa **REZENDE**

Maria Fernanda **MUCIN**

Mariane **LUCATELLI**

Puebla **AGNES**

Yasmin **NICOLETI**

IMPORTÂNCIA DAS TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Fernanda **GOMES**¹; Iolanda **SALVADOR**¹; Isabelly **RODRIGUES**¹; Larissa **REZENDE**¹; Maria Fernanda **MUCIN**¹; Mariane **LUCATELLI**¹; Puebla **AGNES**¹; Yasmin **NICOLETI**¹;

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

² Docente do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos

Curso de Ciências Biológicas e Biomedicina Bacharelado

INTRODUÇÃO

A histologia é o estudo dos tecidos do corpo, esses tecidos são formados por grandes agrupamentos de células e matriz extracelular, e por sua vez os tecidos se organizam para construir órgãos. Pesquisas em química, fisiologia, imunologia e patologia são fundamentais para um conhecimento adequado da biologia das células, dos tecidos e dos órgãos, e de como seus vários componentes interagem na saúde e na doença. Conhecer as ferramentas e os métodos de investigação também é essencial para a compreensão adequada da estrutura e do funcionamento das células, dos tecidos e dos órgãos. São reconhecidos quatro tecidos fundamentais e divididos em: Tecido Epitelial, Tecido conjuntivo, Tecido nervoso e Tecido muscular. O tamanho pequeno das células e dos componentes da matriz, torna o estudo destes tecidos dependente do uso do microscópio. Que são eles: Óptico ou de luz, eletrônico de transmissão e eletrônico de varredura. O procedimento mais usado nesses estudos é a preparação de cortes histológicos ou delgados, conhecidos como (Histotécnicas). Esses tecidos ou órgãos devem passar por um processo antes de serem colocados em lâminas de vidro. Passando primeiro pela “Coleta de material”. Essas secções são feitas a partir de tecidos que necessitam sofrer uma série de tratamentos prévios para então poderem ser fatiados por meio de instrumentos de grande precisão, chamados “Microtomos”.

Esses procedimentos incluem: Coleta, fixação, clivagem, processamento, desidratação, diafanização, infiltração, inclusão, microtomia, coloração e selagem para observação.

Neste projeto realizamos métodos de coleta do material, corte, produção de lâminas e verificação da qualidade do material voltadas para análise dos tecidos.

DESENVOLVIMENTO

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta:

Esse processo de coleta com camundongo, ele já estava em eutosanásia, com formol e por isso ficou mais rígido e duro 'post mortem'.

Colocamos o animal em decúbito dorsal e o primeiro passo para coleta foi a retirada em monobloco por inteiro deste animal.

Após a coleta, o material é emblocado em parafina deverá ser identificado por número, data...(neste caso) que o acompanhará durante todos os procedimentos da técnica histológica (Fixação, clivagem, diafanização, infiltração, inclusão, microtomia e coloração).



Coleta no camundongo



Monobloco



Emblocamento

Cortes do material:

A microtomia consiste em executar cortes bem finos com espessura de 3 a 6 micrômetros para a passagem de luz e observação do tecido ao microscópio. O equipamento utilizado para a obtenção dos cortes é o micrótomo. Há vários tipos de micrótomos, porém, o mais utilizado na técnica histológica de rotina é o micrótomo rotatório (tipo Minot). A navalha é uma das peças fundamentais nesse equipamento, sendo responsável por executar os cortes que podem ser de diversos tipos. As navalhas mais utilizadas são as descartáveis por possuírem custo menor em relação às de aço. Para a realização da microtomia, o bloco precisa estar resfriado e fixo no micrótomo para obter uma fatia fina do material. Os cortes obtidos devem ser levados com o auxílio de uma pinça ao banho-maria à temperatura aproximada de 40 a 50°C para que as fitas de parafina se distendem sobre a água, evitando a formação de dobras no tecido. Em seguida, os cortes são pescados com lâminas previamente limpas e identificadas, que serão encaminhadas à estufa à 60°C por um período mínimo de 2 horas.

Para evitar que os cortes se desprendam das lâminas durante o processo de coloração utilizam-se adesivos, como a albumina de Mayer.



Micrótomo (Laboratório Unifeob)

Coloração:

A coloração pode trabalhar com até 4 tipos de corantes diferentes, nós trabalhamos com a Hematoxilina e a Eosina e Tricromo de Masson, sendo a Hematoxilina para a análise do núcleo celular e a Eosina para análise do citoplasma e do tecido conjuntivo corados em tons de rosa e vermelho e o Tricromo de Masson para a análise dos núcleos do tecido que são corados em preto, o citoplasma e as fibras são coradas em vermelho e o colágeno em azul.

Para que o processo de coloração seja realizado com sucesso é necessário que se siga uma série de protocolos laboratoriais, no caso da Hematoxilina-Eosina o primeiro deles a retirada da parafina da lâmina e a hidratação do tecido, em seguida ele passa por uma série de xilol, álcool e água pelo tempo determinado pelo protocolo em cada etapa, para então seguir para a coloração. O primeiro corante usado é a Hematoxilina que deve ficar no tecido por 2 minutos e depois retirar o excesso em água corrente por 10, para então ser colocado a coloração de Eosina de 3 a 8 minutos, após esse processo a lâmina passa novamente por uma bateria de álcool e xilol para fixar a coloração. Após essa fase do processo ter ocorrido bem, podemos observar os núcleos das células do tecido coloridos em tons de azul e o citoplasma colorido em tons de vermelho.

Já no Tricromo de Masson é necessário desparafinizar a lâmina e hidratar o tecido, em seguida o tecido passa por uma série de xilóis e alcoóis e água pelo tempo determinado pelo protocolo, para então seguir para a coloração. O primeiro corante usado é a Hematoxilina Férrica que deve ficar no tecido por 5 minutos e depois retirar o excesso com água corrente por 5, para então ser adicionada a fucsina ácida por 5 minutos, ela deve ser lavada para a adição da solução fosfomolibdico-fosfotungístico, em seguida é adicionado azul de anilina, após esse processo a lâmina passa novamente por uma bateria de alcoóis e xilóis para que a coloração se fixe no tecido. Após essa etapa ter ocorrido bem pôde-se observar todas as estruturas coloridas perfeitamente.

Xilol 1	10 minutos
Xilol 2	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 1	5 minutos
xilol 2	5 minutos
xilol 3	5 minutos

Protocolo de coloração de Hematoxilina-Eosina

Coloração com Tricrômicos

Nessa coloração usamos tricrômico de masson, mas existe também de “Mallory”. Os tricrômicos além de mostrar muito bem o núcleo e o citoplasma, ajudam a diferenciar colágeno e músculo liso entre si. Uma técnica especialmente boa para observar e diferenciar o colágeno é o uso do corante associado com a luz polarizada (microscopia de polarização).

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução de Bouin

75 ml de solução saturada de ácido pícrico 25 ml formaldeído puro

5 ml ácido acético glacial

B) Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A - colocar 1 g de hematoxilina em 100 ml de álcool 95%.

Solução B- colocar 4 ml de solução aquosa de cloreto férrico a 29% em 95 ml de água destilada e 1 ml de ácido clorídrico concentrado.

Observação: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B.

C) Solução de Escarlate de Biebrich

90ml de solução aquosa de Escarlate de Biebrich 1% 10ml de solução aquosa de fucsina ácida 1%

1 ml de ácido acético glacial.

D) Solução ácida fosfotúngstica-fosfo molíbdico 2,5 g de ácido fosfotúngstico

2,5 g de ácido fosfomolíbdico

100 ml de água destilada

E) Solução de azul de anilina 2,5g de azul de anilina

2 ml de ácido acético glacial 100 ml de água destilada

F) Solução de água-ácido 100 ml de água destilada

1 ml de ácido acético glacial

(Livro de his.Básica; JUNQUEIRA e CARNEIRO)



Protocolo TRICROMO DE MASSON

Xilol 1	10 minutos
Xilol 2	5 minutos
Álcool 100%	5 minutos
Álcool 95%	5 minutos
Álcool 70%	5 minutos
Água Destilada	10 minutos
Hematoxilina Férrica	5 minutos
Água destilada	5 minutos
Fucsina Ácida	5 minutos
Água destilada	5 minutos
Solução fosfomolibdico-fosfotungstico	10 minutos
Azul de Anilina	10 minutos
Água destilada	5 minutos
Ácido acético	3 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Álcool 100%	2 minutos
Xilol 1	5 minutos
Xilol 2	5 minutos
Xilol 3	5 minutos

- Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Tricromo de Masson objetiva 4x
- Protocolo de coloração de Tricrômio de Masson

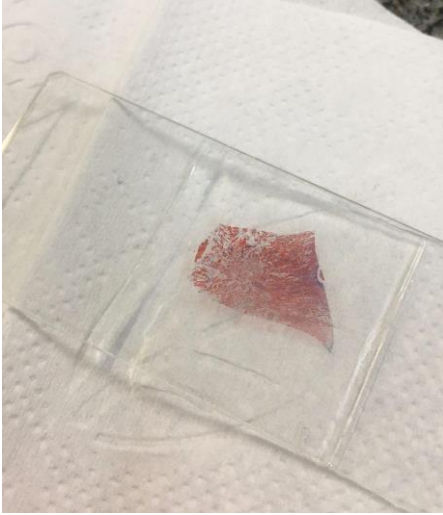
RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lâminas produzidas obtiveram um resultado positivo, não possuem nenhuma bolha que poderia ter surgido no fechamento da lâmina, as colorações foram feitas corretamente dando um bom resultado na observação dos tecidos. Os tecidos utilizados foram traquéia de camundongo e fígado de porco.

Lâminas produzidas:



Lâmina de traquéia de camundongo produzida na coloração de Hematoxilina-Eosina



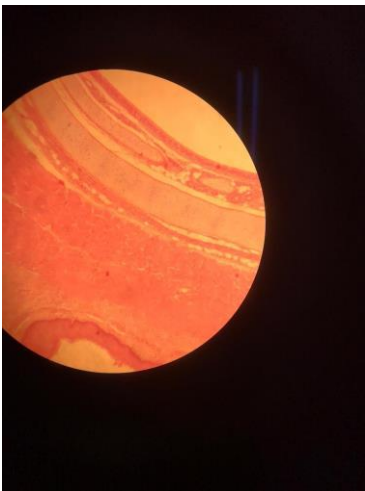
Lâmina de fígado de porco produzida na coloração de Tricromo de Masson



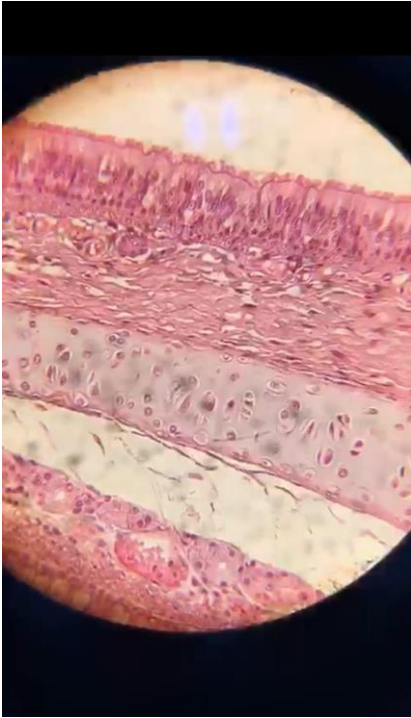
Lâminas de traquéia de camundongo produzidas nas colorações Hematoxilina-Eosina e Tricromo de Masson



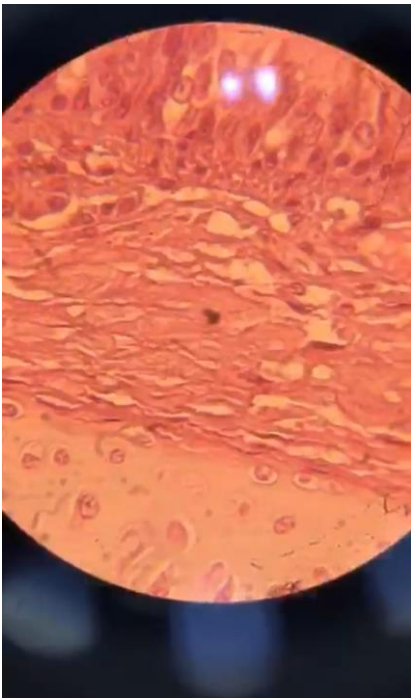
Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Hematoxilina-Eosina objetiva 4x



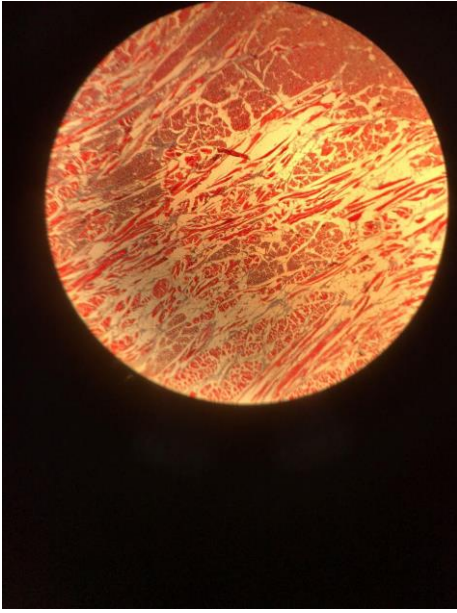
Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Hematoxilina-Eosina objetiva 10x



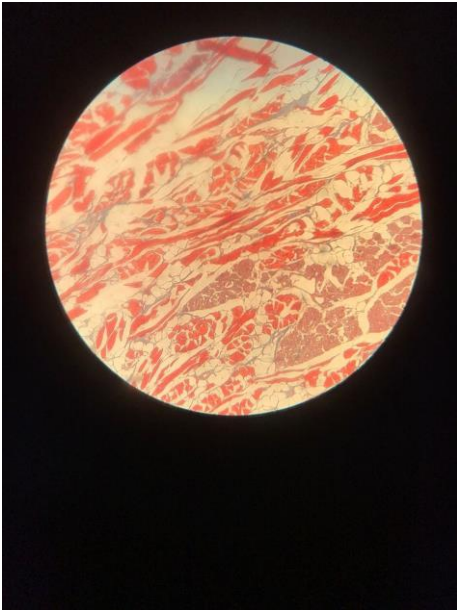
Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Hematoxilina-Eosina objetiva 40x



Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Hematoxilina-Eosina objetiva 100x



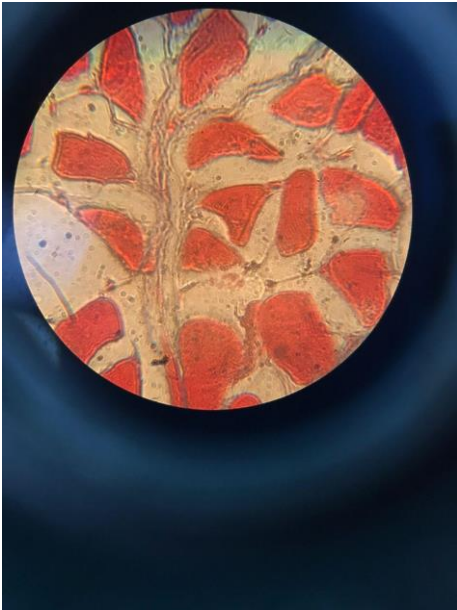
Lâmina de fígado de porco colorida com Tricromo de Masson objetiva 4x



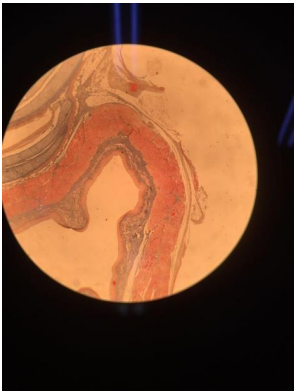
Lâmina de fígado de porco colorida com Tricromo de Masson objetiva 10x



Lâmina de fígado de porco colorida com Tricromo de Masson objetiva 40x



Lâmina de fígado de porco colorida com Tricromo de Masson objetiva 100x



Lâmina de traquéia de camundongo colorida com Tricromo de Masson objetiva 4x

CONCLUSÃO OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Depois de conhecermos os métodos de estudo da histologia, visualizarmos e analisarmos como são feitas as etapas técnicas do processo histológico, concluímos que tivemos um ótimo avanço de acordo com os resultados obtidos, todos os processos foram extremamente perfeitos desde a coleta do material até lâmina pronta, destacando principalmente a produção do bloquinho de parafina e as colorações utilizadas (Hematoxilina e eosina e o Tricomo de Masson).

REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 487p.