

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MICROSCOPIA E 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

MICROSCOPIA E 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:

Caroline **LINO SALMASO**

Derek **GOMES CERQUEIRA LEITE**

João Augusto **BERTONI**

Juliana **OLIVA CAZALI**

Laisa Maria **CAMILO**

Mariana **MARTINS LEONI**

Sabrina **BELCHIOR MANGOLIN**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

MICROSCOPIA E TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Caroline **LINO SALMASO**¹; Derek **GOMES CERQUEIRA LEITE**¹; João Augusto **BERTONI**¹; Juliana **OLIVA CAZALI**¹; Laisa Maria **CAMILO**¹; Mariana **MARTINS LEONI**¹; Sabrina **BELCHIOR MANGOLIN**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 Bastos

Curso de Biomedicina e Ciências Biológicas Bacharelado

UNIFEQB

1 INTRODUÇÃO

Com o auxílio de microscópios, pesquisas em áreas químicas, fisiológicas, imunológicas e patológicas, a histologia estuda as células, os tecidos e os modos que as estruturas dos órgãos se organizam (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Portanto, este artigo visa demonstrar a realização das técnicas histológicas, conjunto de processos para a observação adequada dos tecidos, e histoquímicas, que consistem no estudo da constituição química das células e dos tecidos, por meio do preparo dos materiais para análise microscópica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Para isso, é utilizado principalmente o microscópio de luz ou óptico, composto por partes mecânicas e ópticas, que forma a imagem da estrutura observada ampliada, realizada pela objetiva e ocular, a partir da emissão de raios luminosos, projetado pelo condensador (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017), que atravessam o tecido em razão dos cortes histológicos feito pelo micrótomo, instrumento preciso que corta fatias extremamente finas para a obtenção de amostras.

Com tudo, para a observação supracitada, será necessário realizar a coleta do material, que consiste na remoção de amostras de tecido de um determinado organismo, podendo ser obtida através de biópsia ou durante o procedimento de necropsia. Desse modo, a fim de interromper o metabolismo celular, evitando o endurecimento dos fragmentos e a digestão por enzimas, é realizada a fixação, equivalente à imersão dos tecidos em soluções desnaturantes (fixadores), como por exemplo o glutaraldeído e o formaldeído. Logo, a clivagem consiste em reduzir as dimensões dos fragmentos dos tecidos coletados, ocorrendo em algumas horas após a fixação. Ademais, a parcela de tecido ou órgão deve passar pelo processo de desidratação e clareamento, para a retirada de água via imersão em etanol gradativamente e para a transparência do tecido em soluções de xilol, nessa ordem, preparando-o para banhos de parafina para que resulte numa consistência mais rígida (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Portanto, ressalta-se que a maioria dos tecidos são incolores, sendo necessário a coloração para possibilitar a visualização das estruturas teciduais, para tal são utilizados corantes como a hematoxilina – coloração roxa reagente aos núcleos celulares - e a eosina – coloração rosa resultante ao citoplasma e à matriz extracelular (OVALLE, 2014). Por fim, o corte é desidratado e clarificado novamente para permitir que uma fina lamínula de vidro o proteja e torne-o possível para a observação no microscópio de luz. Vale ressaltar que as microscopias de uso comum abrangem também a microscopia de contraste de fase, a microscopia confocal, e a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura (GARTNER, 2017).

Nota-se, assim, que a histologia, juntamente com suas técnicas de estudo, proporciona a identificação, a caracterização, a análise e a descrição das estruturas dos inúmeros tecidos e órgãos constituintes do organismo animal, resultando também em um diagnóstico, por meio de estudos comparativos de tecidos patológicos e saudáveis. Aliado a isso, tem-se como objetivo deste artigo a realização de pesquisas e de estudos dos materiais histológicos, a fim de proporcionar maiores conhecimentos e maior domínio nesse ramo.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização da análise, foi necessário a utilização de álcool 70%, formol 10%, um bisturi com lâmina 21, parafina, esquadros de Leuckart, pinças cirúrgicas, uma tesoura sem ponta, navalhas, um cassete, um camundongo, presentes na figura 1, e os corantes (Hematoxilina, Eosina e Tricromo de Masson).



FIGURA 1. Materiais utilizados para fixação

Primeiramente, foi preparada a solução de formol 10%, fixador químico do qual tem como objetivo preservar o material histológico, utilizando nove partes de água para uma parte de formol puro. Evidencia-se que, para uma fixação adequada, é fundamental que a peça fique imersa em um volume de vinte vezes maior que a dimensão da mesma. Por conseguinte,

sucedeu-se o corte no camundongo em posição decúbito dorsal com o auxílio do bisturi, aparente na figura 2, a fim de retirar amostras de vários órgãos com o amparo da tesoura, com o intuito de afastar os outros tecidos sem a ruptura dos mesmos, e das navalhas para o corte cruzado dos órgãos retirados do camundongo, exposto na figura 3.



FIGURA 2. Camundongos fixados previamente em decúbito dorsal para corte com auxílio do bisturi



FIGURA 3. Órgãos retirados do camundongo para a escolha do material

Ademais, destinou-se uma parte das amostras para o cassete, juntamente com a identificação dos órgãos, que logo foram inseridos no fixador por um período entre 6 a 24 horas. Portanto, após derreter a parafina, o tecido é colocado na mesma com a assistência de uma pinça aquecida pela lamparina, para que o tecido se solte na parafina com facilidade. Para a formação do bloco de parafina é primordial o uso do esquadro de Leuckart, apresentados nas figuras 4 e 5, e a identificação do material histológico.



FIGURA 4. Parafina derretida para fazer o emblocamento do tecido



FIGURA 5. Tecido inserido na parafina

Posteriormente ao preparo do bloco de parafina, deve-se realizar uma lapidação no bloco com o objetivo de retirarmos o excesso de parafina para que o tecido fique mais aparente. Antes de inserir o bloco no micrótomo, é necessário resfriar a peça de parafina para que o mesmo não amoleça durante o processo de microtomia, evidenciando-se que o ponto de fusão é de 50°C. É indispensável o uso do gelo, caso este imprevisto aconteça, friccionando o cubo de gelo no material já inserido no micrótomo.



FIGURA 6. Bloco de parafina antes da lapidação

É aconselhável que, durante o uso do maquinário, seja utilizado uma navalha descartável, perante que a mesma proporciona um corte mais limpo do tecido, sem deixar falhas ou ranhuras. Também é crucial configurar a espessura do corte, que varia entre 3 a 6 μm , geralmente no laboratório está configurado em 4 μm . Dessa forma, os cortes realizados, expostos na figura 8, devem ser encaminhados ao banho histológico, estrutura da figura 9, com o auxílio de uma pinça, a uma temperatura entre 40 e 44°C, com a finalidade de distender o tecido sobre a água para que assim retire as possíveis dobras, visto na figura 10.



FIGURA 7. Bloco de parafina posicionado no micrótomo



FIGURA 8. Início do corte do bloco de parafina

Em seguida, realiza-se o processo denominado “pescagem”, do qual utiliza-se uma lâmina previamente limpa e identificada, com o uso de um lápis na parte opaca da mesma, submergindo-a no banho histológico e realizando a captura do tecido. Subsequente, a lâmina será encaminhada a uma estufa, que se encontrará em uma temperatura de 60°C, e deverá ser mantida durante 2 horas para o derretimento da parafina.



FIGURA 9. Aparelho utilizado para realização do banho histológico



FIGURA 10. Material em banho histológico para a realização da “pescagem”

ETAPA 1 - COLORAÇÃO HE

Para a finalização da montagem das lâminas histológicas é imprescindível a coloração das mesmas. Nesse caso, foi utilizado o procedimento de coloração HE, ou seja, coloriu-se com Hematoxilina e Eosina, baterias da figura 11. Primordialmente, efetua-se a remoção da parafina e a reidratação do corte, iniciando-se o processo de desparafinização dentro do exaustor, com o Xilol 1 e Xilol 2 durante 10 e 5 minutos, respectivamente, e logo após é realizado o processo de hidratação, com concentrações de álcool 100%, 95% e 70% deixando agir em uma média de 5 minutos cada. Determinados processos são feitos na mesma vidraria, mostrada na figura 12.



FIGURA 11. Baterias de Eosina e Hematoxilina para coloração da lâmina

À vista disto, é realizada a lavagem das lâminas com água destilada durante 1 minuto, com o objetivo de receber o primeiro corante, a Hematoxilina, que deve ser mantido durante 5 minutos, e logo após deve passar por uma outra lavagem em água corrente, com o intuito de corar com Eosina entre 3 a 8 minutos. Assim sendo, retira-se a água do tecido com concentrações crescentes de álcool, e finalizando com Xilol 1, 2 e 3 para a clarificação do tecido. Determinados processos são feitos na mesma vidraria, mostrada na figura abaixo.



FIGURA 12. Lâminas inseridas em cuba de vidro para banhos de álcool, xilol e coloração

Portanto, como última etapa do processo realiza-se a selagem da lâmina, equivalente à cobertura do tecido utilizando-se uma lamínula de vidro, com o auxílio de material adesivo, como por exemplo o Bálsamo do Canadá, o Ethelan, dentre outros. Por fim, deixando-a em repouso durante 24 horas para a sua visualização no microscópio óptico.



FIGURA 13. Lâminas prontas para a visualização no microscópio

ETAPA 2 - COLORAÇÃO TRICROMO DE MASSON

É primordial para o término da montagem das lâminas histológicas a realização do processo de coloração. Nessa etapa, foi aplicada a metodologia de coloração Tricromo de Masson, sendo um conjunto sequencial de corantes, tais como, Hematoxilina Férrica, e Azul de Anilina. A princípio, remove-se a parafina e reidrata-se o corte, começando, assim, o processo de desparafinização, com o Xilol 1 e Xilol 2 durante 10 e 5 minutos, respectivamente, e posteriormente realiza-se a técnica de hidratação, com concentrações de álcool 100%, 95% e 70% deixando agir em uma média de 5 minutos cada.

Por conseguinte, é sucedida a lavagem das lâminas por 10 minutos, em água destilada, com finalidade de adquirir o primeiro corante, a Hematoxilina Férrica (combinação de cloreto de ferro), por 5 minutos. Novamente, é realizada a lavagem em água destilada por 5 minutos, a fim de receber o próximo corante, a Fucsina Ácida. Sendo assim, a lâmina retorna para o banho em água destilada durante 5 minutos e obtém a solução fosfotúngstico-fosfomolibdico, no tempo de 10 minutos, um ácido ordente responsável pela preparação do tecido para o contato com o último corante, o Azul de Anilina, no decorrer de 10 minutos. Estes processos podem ser visualizados nas figuras 14 até 16.



FIGURA 14. Banhagem das lâminas nos dois primeiros corantes



FIGURA 15. Inserção das lâminas na solução fosfotúngstico-fosfomolibdico



FIGURA 16. Coloração no Azul de Anilina

Portanto, repete-se a imersão em água destilada e ácido acético, ao longo de 5 e 3 minutos, sequencialmente, como pode-se observar nas imagens 17 e 18. Logo após, mergulha-se em concentrações crescentes de álcool, por 2 minutos cada, retirando a água do tecido, e

finalizando com Xilol 1, 2 e 3, por 5 minutos, na devida ordem, como apresentado nas figuras 19 e 20.



FIGURA 17. Lavagem da lâmina em água destilada



FIGURA 18. Passagem da lâmina pelo ácido acético

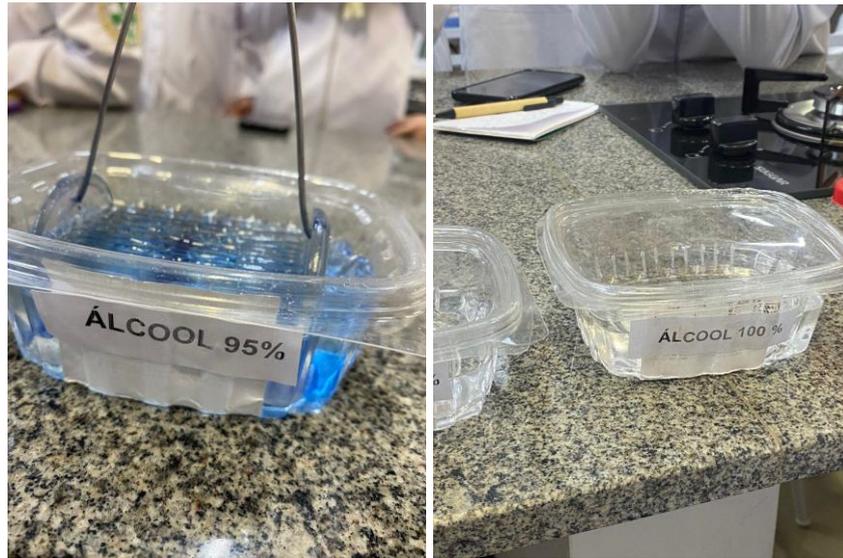


FIGURA 19. Bateria de Álcool



FIGURA 20. Finalização do processo com a bateria de Xilol

Por fim, como última etapa do processo, realiza-se a selagem da lâmina, equivalente à cobertura do tecido utilizando-se uma lamínula de vidro, com o auxílio do Ethelan, uma cola adesiva, e uma gota de xilol, ficando em repouso durante 24 horas, assim como observa-se na imagem 21.



FIGURA 21. Selagem da lâmina

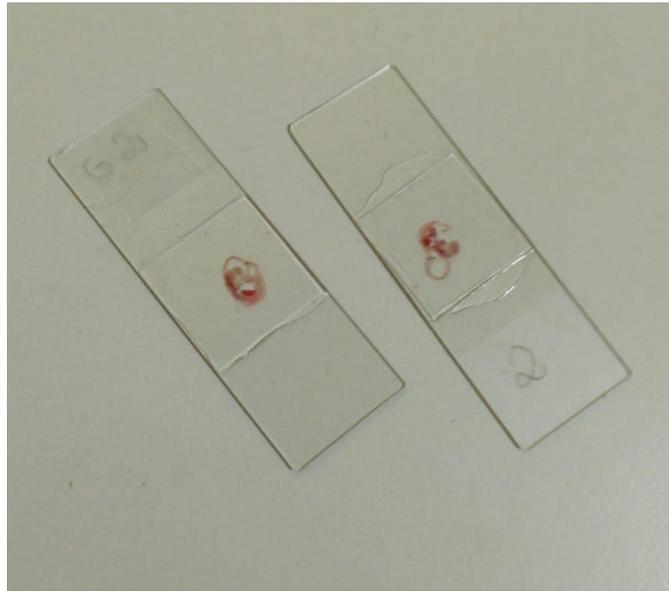


FIGURA 22. Lâminas finalizadas e prontas para visualização no microscópio

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a montagem das lâminas, inicia-se o processo de visualização dos resultados. A seguir serão apresentadas imagens da lâmina em diferentes aumentos oculares, contendo a pele e o crânio do camundongo, com a finalidade de expor os pontos corretos e incorretos da preparação.

ETAPA 1 - VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL CORADO COM HE

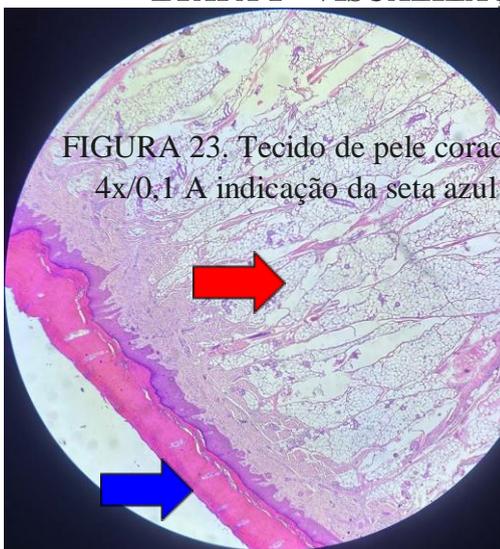


FIGURA 23. Tecido de pele corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 4x/0,1 A indicação da seta azul denota o tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado.

Logo, a seta vermelha aponta o tecido conjuntivo frouxo, constituído por muitas células e poucas fibras colágenas

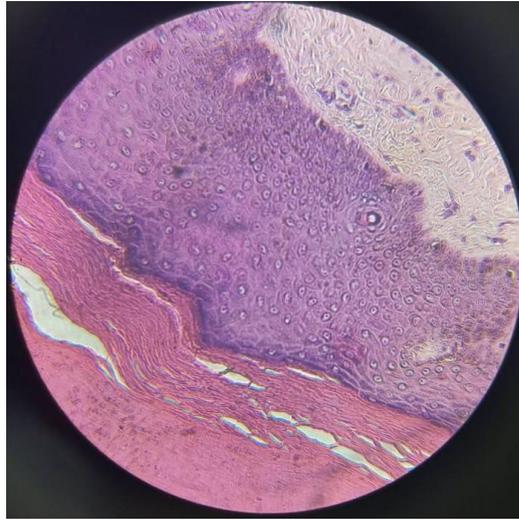


FIGURA 24. Tecido de pele corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 10x/0,25

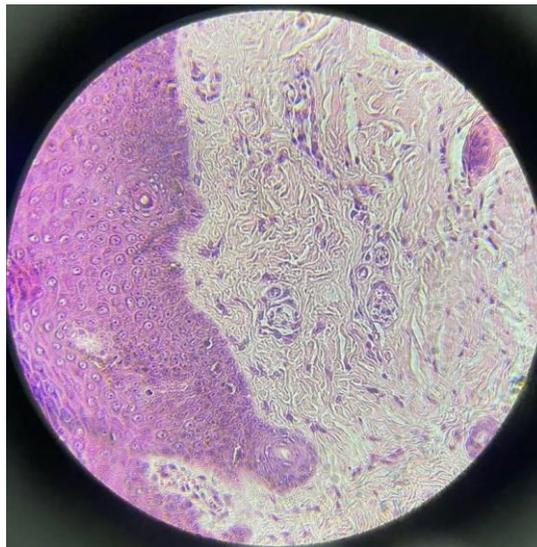


FIGURA 25. Tecido de pele situado no ponto central da lâmina, corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 10x/0,25

Indica-se, na figura 24, que a camada superficial denota o tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado, integrado por células mortas e grande quantidade de queratina, corada em rosa, juntamente com a presença do epitélio estratificado, corado em roxo escuro. Já na área corada em rosa claro, visualizada na figura 25, localizada mais ao centro da lâmina, identifica-se a presença de tecido conjuntivo frouxo e denso não modelado, respectivamente, sendo o frouxo aquele que possui maior quantidade de células e menor parcela de fibras colágenas, e o denso, abundante em colágeno e células em minoria.



FIGURA 26. Tecido adiposo com presença de queratina, corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 40x/0,65

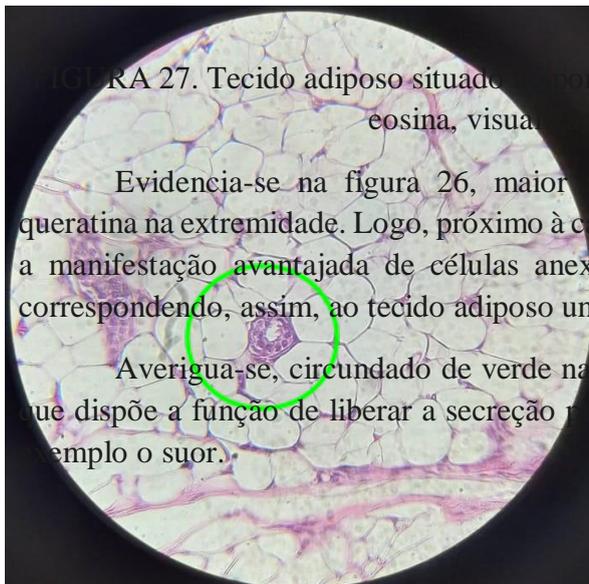


FIGURA 27. Tecido adiposo situado no ponto central da lâmina, corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 40x/0,65

Evidencia-se na figura 26, maior ampliação dos tecidos, com o aparecimento da queratina na extremidade. Logo, próximo à camada basal e salientado na figura 27, está presente a manifestação avantajada de células anexadas em uma grande e única gotícula lipídica, correspondendo, assim, ao tecido adiposo unilocular.

Averigua-se, circundado de verde na figura 27, a existência de uma glândula exócrina que dispõe a função de liberar a secreção para fora do sangue, por meio de ductos, como por exemplo o suor.



FIGURA 28. Dobras no tecido adiposo, corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 40x/0,65

Vale ressaltar que, nas figuras 26, 27 e 28, há aparição de pontos pretos, denominados artefatos, ou seja, sujeiras presentes na lâmina. Assim como, na imagem 28, tem-se dobras, resultado de uma falha no momento da produção da lâmina, que prejudicam, tal como os artefatos, a visibilidade na análise.

ETAPA 2 - VISUALIZAÇÃO DO MATERIAL CORADO COM TRICROMO DE MASSON

Na observação deste material, analisa-se o crânio de um embrião de rato. Dessa forma, os tecidos ainda estão em desenvolvimento para a composição dos órgãos do animal.



FIGURA 29. Formação do tecido nervoso, corado com Tricromo de Masson, visualizado na objetiva 4x/0,1

Nota-se, na figura 29, a evolução do tecido nervoso, circulado em azul, composto por neurônios, responsáveis pelos impulsos nervosos, e pelas células da Glia que possuem a função de envolver e nutrir os neurônios.



FIGURA 30. Tecido da cabeça de camundongo corado com Tricromo de Masson, visualizado na objetiva 10x/0,25. Indicado pela seta verde, tem-se a pele queratinizada, já a seta rosa sinaliza o tecido conjuntivo e as fibras colágenas, por último, observa-se o tecido muscular, denotado pela seta amarela

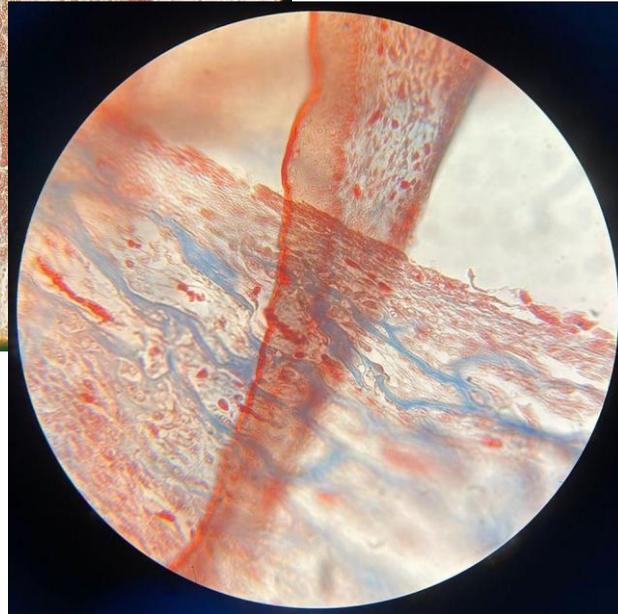


FIGURA 31. Tecido com presença de fibras colágenas densas, corado com Tricromo de Masson, visualizado na objetiva 40x/0,65

Logo, corado em azul, na figura 31, explora-se o conceito da ossificação intramembranosa, resultado da diferenciação das células mesenquimais em osteoblastos, que constitui os ossos finos do crânio.



FIGURA 32. Dobras no tecido , corado com Tricromo de Masson, visualizado na objetiva 40x/0,65

Assim como, na figura 31, há presença de dobras, como também na figura 32, decorrente de falhas no momento da produção da lâmina, comprometendo a verificação dos tecidos em estudo.

CONCLUSÃO

Em suma, o desenvolvimento do presente estudo possibilitou a verificação das técnicas histológicas, tanto na extração, quanto na visualização do material biológico, além das competências práticas sobre a microscopia e o conhecimento sobre diferentes metodologias de coloração. Mediante a isso, ressalta-se que diferentes tipos de tecidos se coram com cores distintas, sendo possível, assim, o reconhecimento dos elementos que compõem o material analisado. Ademais, experimentalmente, é notório que a coloração Tricromo de Masson exibe um grau de dificuldade maior do que a coloração HE, uma vez que o mesmo apresenta mais detalhes e etapas.

Por fim, conclui-se que, para a obtenção de melhores resultados, é imprescindível a efetuação de todas as etapas do procedimento histológico, seguindo os regulamentos propostos. Em prática, obtiveram-se dobras e artefatos, tais quais inibiram a visualização excepcional do material em estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPUTO, Luzia; GITIRANA, Lycia; MANSO, Pedro Paulo. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.** In: MOLINARO, Etelcia Moraes;

CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. **Técnicas Histológicas**. Vol. 2 Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 89-188.

GARTNER, Leslie. **Tratado de Histologia**. São Paulo: Grupo GEN, 2017.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos U.; CARNEIRO, José. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. São Paulo: Grupo GEN, 2017.

OVALLE, William. **Netter Bases da Histologia**. São Paulo: Grupo GEN, 2014.