

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**OBTENÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS PARA
ESTUDO CIENTÍFICO**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP
2022

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OBTENÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS PARA ESTUDO CIENTÍFICO

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:

Joyce **PEREIRA**

Kailane **SOUZA**

Pedro **MANOEL**

Natasha **PIZARRO**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

OBTENÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS PARA ESTUDO CIENTÍFICO

Joyce **PEREIRA**¹; Kailane **SOUZA**¹; Natasha **PIZARRO**¹; Pedro **MANOEL**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
SANTOS²; Ricardo A. **ROSA**²;

² Docente do Centro Universitário da Fundação de Ensino Octávio Bastos

UNIFEOB

1 INTRODUÇÃO

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação delas com os constituintes da matriz extracelular. A histotecnologia proporciona o entendimento dos fundamentos técnicos para a análise dos elementos teciduais, normais ou patológicos, isto é, suas células e os elementos da matriz extracelular, abrangendo diversas técnicas histoquímicas. Os procedimentos técnicos aplicados na histotecnologia incluem técnicas citoquímicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas, voltadas para a pesquisa científica e para o diagnóstico patológico, além de análises em nível de microscopia eletrônica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Neste capítulo, serão realizadas considerações somente sobre as técnicas histológicas voltadas para a análise histoquímica e imunohistoquímica dos tecidos.

Histotecnologista, ou histotécnico, é designada e conferida ao profissional responsável por executar a técnica histológica para atuar em instituições de saúde, instituições voltadas à pesquisa científica e ao controle de qualidade, normalmente em laboratórios de histologia ou anatomopatologia. Sua função, além de ser essencial aos serviços de saúde, pelo apoio ao diagnóstico e ao tratamento de

pacientes, está também localizada de forma central no moderno paradigma médico anatomoclínico. Os procedimentos utilizados para se obterem amostras de tecido ou preparados histológicos retirados de um organismo para exame microscópico incluem: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia (corte) e coloração. No caso de tecidos calcificados, o material é descalcificado após a fixação, em seguida, realizam-se os outros procedimentos, os quais discutiremos um a um. Nosso objetivo é mostrar passo a passo do processo de obtenção de lâminas histológicas para estudo e pesquisa, utilizando as técnicas histológicas aprendidas em laboratório (CAPUTO, Luzia; GITIRANA, Lycia; MANSO, Pedro Paulo. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratório de saúde).

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Para análise, são necessários álcool 70%, formaldeído, bisturi com lâmina 21, parafina, quadrado de Leuckart, pinça cirúrgica, tesoura sem corte, navalha, cassete e um camundongo, conforme mostrado na Figura a



FIGURA 1. Materiais utilizados para fixação

Primeiro, prepare uma solução de formaldeído a 10%, um fixador químico destinado a preservar o material histológico, usando 9 partes de água para 1 parte de formaldeído puro. Obviamente, a imersão da peça em um volume 20 vezes maior que seu tamanho é essencial para uma fixação adequada. Para tanto, os camundongos foram dissecados em decúbito com auxílio de bisturi para os cassetes, juntamente com a identificação dos órgãos, e então inseridos no fixador por um período de tempo entre 6 e 24 horas. Portanto, depois que a parafina é derretida, o tecido é colocado nela com o auxílio de pinças aquecidas por lamparina, permitindo que o tecido seja liberado com facilidade e identificação do material histológico.(Etelcia Moraes; CAPUTO, Luzia Fátima Gonçalves; AMENDOEIRA, Maria Regina Reis. Técnicas Histológicas. Vol. 2 Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. pag: 89 - 188).



FIGURA 2. Parafina derretida para fazer o emblocamento do tecido



FIGURA 3. Bloco de parafina antes da lapidação

Recomenda-se uma navalha descartável ao usar a máquina, pois corta os tecidos de forma mais limpa, sem deixar lacunas ou sulcos. Também é importante definir a espessura do corte, que varia de 3 a 6 μm , e geralmente é definida em 4 μm em laboratório. Assim, reduzindo, expostos na figura 8, devem ser encaminhados ao banho histológico, com auxílio de uma pinça, a uma temperatura entre 40 e 44°C, com a finalidade de desprender o tecido sobre a água para que assim retire as possíveis dobras.



FIGURA 4. Bloco de parafina posicionado no micrótomo

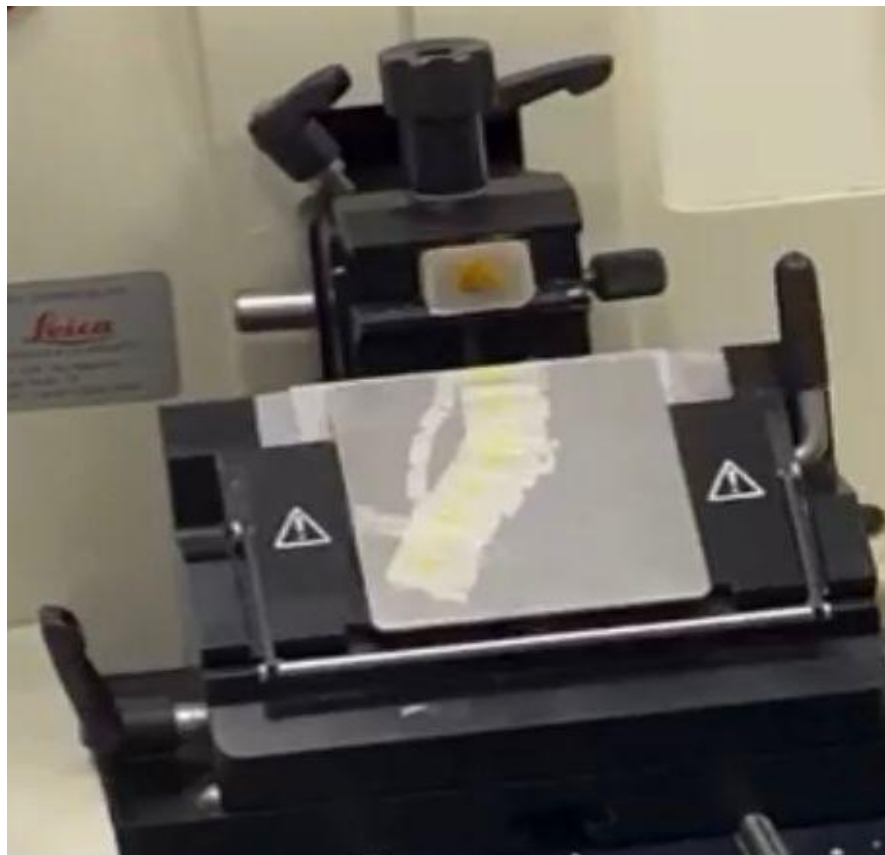


FIGURA 5. Início do corte do bloco de parafina

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 fosca da mesma submergindo no banho histológico e realizando a captura do tecido. Subsequente. a lâmina será encaminhada a uma estufa, que se encontra em uma temperatura de 60°C, e deverá ser mantida durante 2 horas para o derretimento da parafina



FIGURA 6. Aparelho utilizado para realização do banho histológico



FIGURA 7. Material em banho histológico para a realização da “pescagem”

Para completar a montagem das seções de tecido, a coloração é essencial. Neste caso, foi utilizado o procedimento de coloração HE (hematoxilina e eosina). Inicialmente, a parafina foi retirada e os cavacos foram reidratados, iniciou-se o processo de desparafinação em capela com xileno 1 e xileno 2 por 10 a 5 minutos, respectivamente, seguido do processo de hidratação a 100%, álcool 95% e álcool 70%. , deixe a média a cada 5 minutos. Certos processos são realizados no mesmo recipiente de vidro.

Protocolo HEMATOXILINA-EOSINA (HE)

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

FIGURA 8. Protocolo para coloração Hematoxilina e Eosina



FIGURA 9. Baterias de Hematoxilina e Eosina usadas para a coloração da lâmina

À vista disto, é realizada a lavagem da 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. Retira-se a água do tecido com concentrações crescentes de álcool, e finalizada com Xilol 1, Xilol 2 e Xilol 3 para a clarificação do tecido. Determinados processos são feitos na mesma vidraria, mostra a figura .(OVALLE, William. Netter Bases da Histologia. São Paulo: Grupo GEN, 2014.)

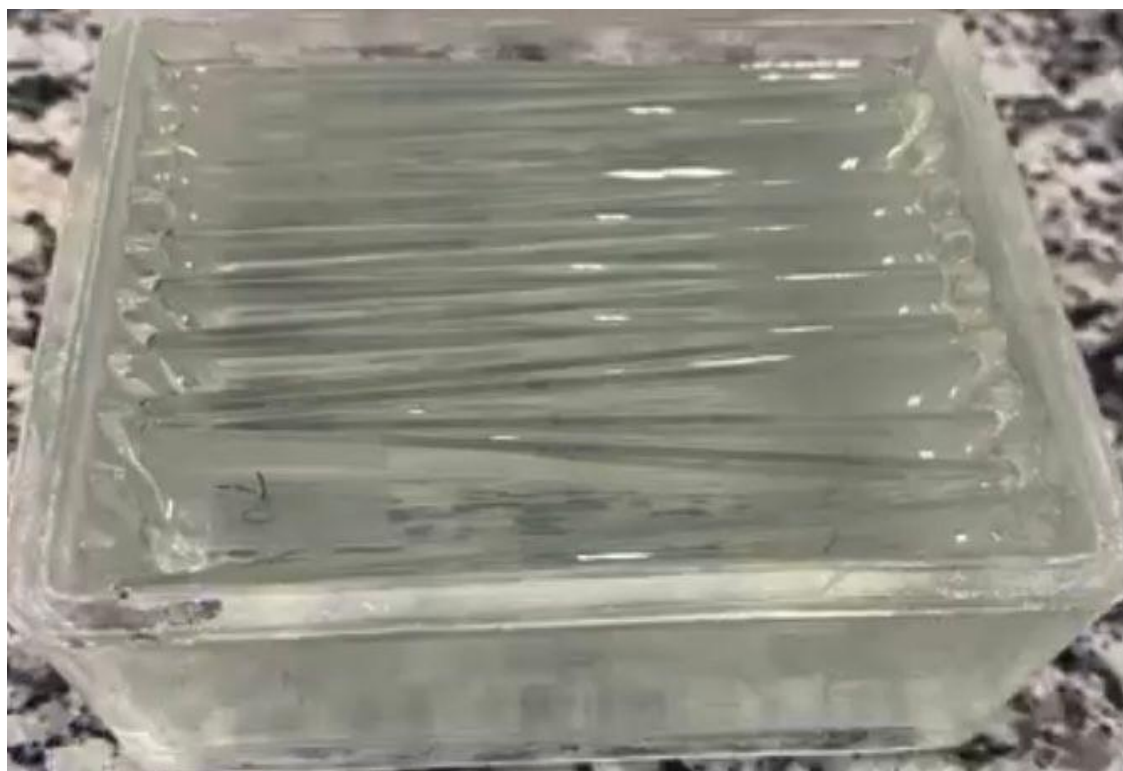


FIGURA 10. Lâmina inseridas em cuba de vidro para banhos de álcool, xilol e coloração

Portanto, como a última etapa do processo realiza-se a selagem da lâmina, equivalente à cobertura do tecido utilizando uma lamínula de vidro, com o auxílio de material adesivo (exemplo Bálsamo do Canadá, Ethelan) entre outros .Por fim deixa-se em repouso durante 24 horas para a visualização no microscópio óptico. (GARTINER, Leslie. Tratado de Histologia. São Paulo: Grupo GEN, 2017.)



FIGURA 11. Lâminas prontas para a visualização no microscópio

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após montar as lâminas , inicie o processo de visualização dos resultados. A seguir, as imagens das lâminas serão apresentadas em diferentes ampliações, incluindo pele de camundongo, para expor aspectos corretos e incorretos do preparo.

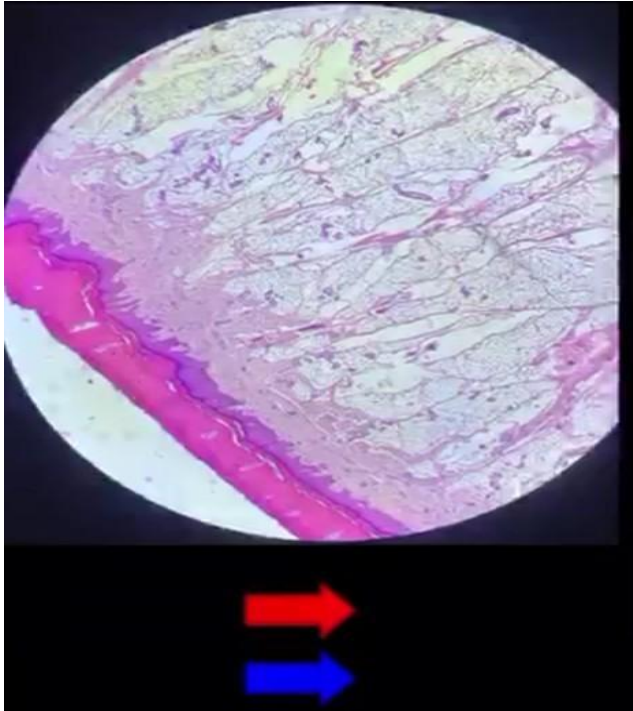


FIGURA 12. Tecido de pele corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 4x/0,1

A indicação da seta azul denota o tecido epitelial estratificado pavimentoso queratinizado. Logo a seta vermelha aponta o tecido conjuntivo frouxo, construído por muitas células e poucas fibras colágenas.

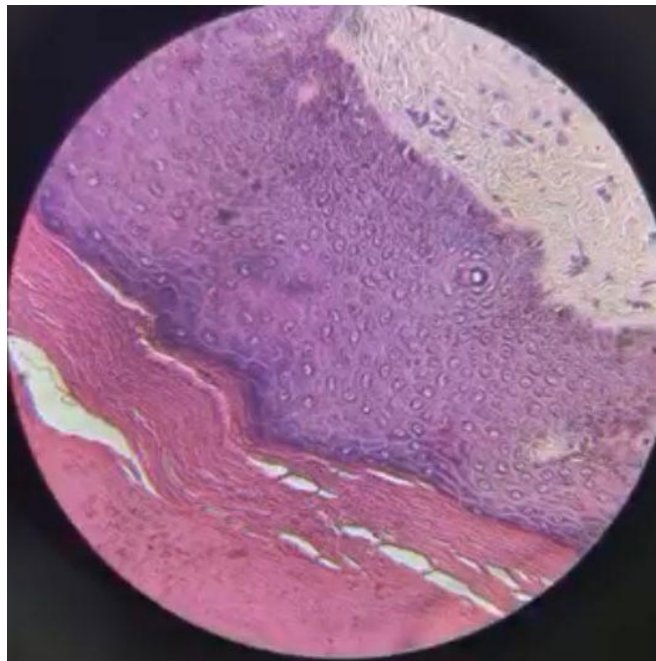


FIGURA 13. Tecido de pele corado com hematoxilina e o eosina, visualizado na objetiva 10x/0,25

indica-se, na figura 13, que a camada superficial denota o tecido epitelial pavimentoso queratinizado, corado em rosa, integrado por células mortas e grande quantidade de queratina, juntamente com a presença do tecido conjuntivo frouxo, corado em roxo escuro, que contém células em abundância. Já na área corada em roxo claro, visualizada na figura 14, mais ao centro da lâmina é identificado a presença de tecido conjuntivo denso não modelado, que possui menor quantidade de células e maior parcela de fibras colágenas.



FIGURA 14. Tecido adiposo cm presença de queratina, corado com hematoxilina e eosina visualizado na objetiva de 40x/0,65

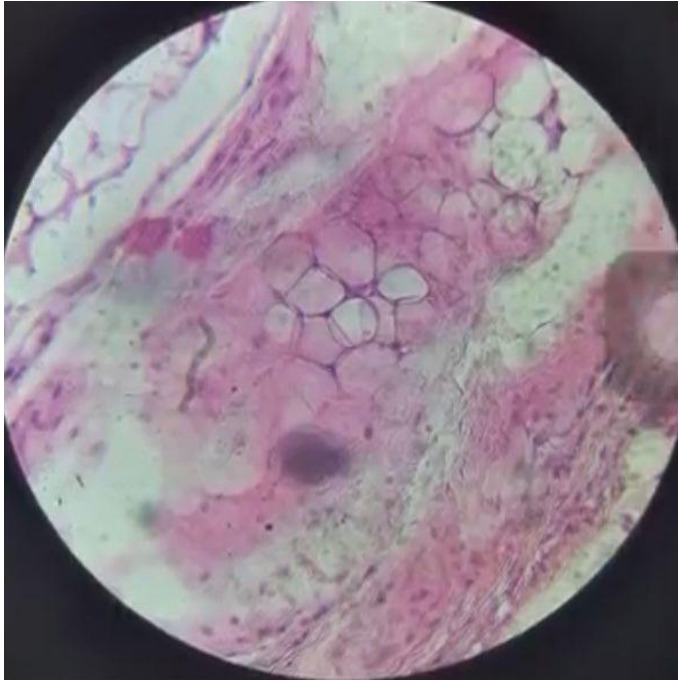


FIGURA 15. Dobras no tecido adiposo, corado com hematoxilina e eosina com objetiva de 40x/0,65

Vale ressaltar que, na figura 15 tem-se dobras, resultado de uma falha no momento da produção da lâmina, que prejudicam, tal como os artefatos, a visibilidade da análise.

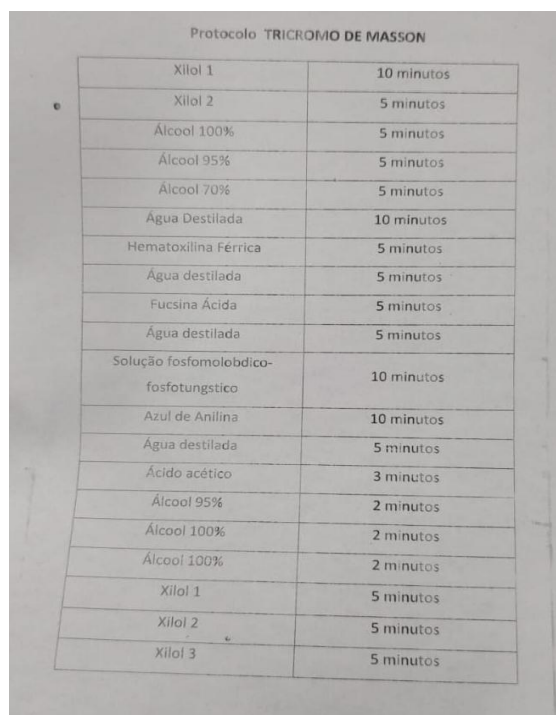
3 TRICROMO DE MASSON

Tricrômios: nos tricrômios é feita a combinação de três corantes que evidenciam, por afinidade tintorial, determinado tipo de tecido em cor destacada, separando-o de elementos patológicos circundantes ou de outros tecidos, ou mesmo aumentando sua evidência em situações patológicas. Existem diversos tipos de tricrômios, segundo a combinação de corantes. O tricromo de Masson é uma técnica de coloração diferencial que permite distinguir os dois os dois principais grupos de bactérias por microscopia óptica. A técnica de coloração de Gram consiste em observar as bactérias Gram - positivo (que coram em roxo, pois não permitem a entrada do agente diferenciador) e as bactérias Gram - negativo (que coram em rosa, pois permitem a entrada do agente diferenciador). tricrômio de Masson: destaca o colágeno em azul ou verde-azulado, núcleos em roxo ou preto, citoplasma fracamente púrpuro e músculo em vermelho (AARESTRUP, Beatriz Julião. Histologia Essencial, 2012. pag 15 .)

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

As etapas de coloração do tricrômico constituem em desparafinar e hidratar o tecido, lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto. Em seguida, colocar em solução de Boiün por 1 hora na estufa a 60 graus. Lavar em água corrente até tirar o amarelado deixado pela solução anterior e depois em água destilada; Então corar com Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos. O próximo é corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos, passar por água destilada. Diferenciar pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos e novamente lavar em água destilada. Depois de corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos, lavar em água destilada. Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos, e de novo lavar em água destilada. E por fim desidratar e clarificar para realizar a montagem das lâminas.

Foram utilizados blocos de parafina contendo amostras de fígado suíno que foram



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

utilizados para a obtenção das lâminas. Cortes feito no micrótomo a 4 µm.

FIGURA 16. Protocolo de coloração tricrômico de masson



FIGURA 17. Baterias da coloração tricrômico de masson

Após toda a preparação do tecido ocorre a preparação das soluções e dos corantes

.Solução de Bouin

75 ml de solução saturada de ácido pícrico

25 ml formaldeído puro

5 ml ácido acético glacial

. Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A - colocar 1 g de hematoxilina pó 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.

.Solução de Escarlata de Biebrich

90ml de solução aquosa de Escarlata de Biebrich 1%

10ml de solução aquosa de fucsina ácida 1%

1 ml de ácido acético glacial.

.Solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica

2,5 g de ácido fosfotúngstico

2,5 g de ácido fosfomolibdico

100 ml de água destilada

.Solução de azul de anilina

2,5g de azul de anilina

2 ml de ácido acético glacial

100 ml de água destilada

.Solução de água-ácido

100 ml de água destilada

1 ml de ácido acético glacial

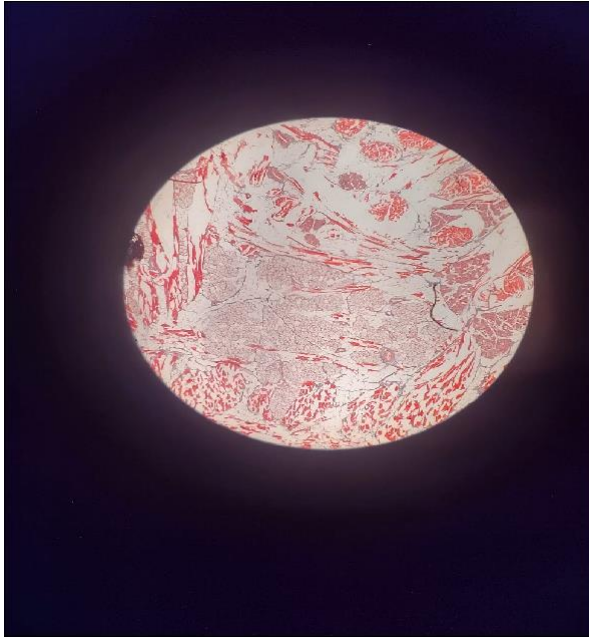
(Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações:pág 25-27)

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A obtenção da lâmina foi realizada com sucesso não houve dobras no tecido, e não foi possível visualizar bolhas na coloração e na visualização no microscópio óptico



FIGURA 18. Lâmina de tricrômo masson finalizada observação a olho nu



Fígado suíno corado com tricromo de masson, visualizado na objetiva de 4x/0,1

tricroêmio de Masson: destaca o colágeno em azul ou verde-azulado, núcleos em roxo ou preto, citoplasma fracamente púrpuro e músculo em vermelho

4 CONCLUSÃO

Este relatório tem como objetivo a descrição dos resultados obtidos através de análises no laboratório de Histologia do Centro Universitário da Fundação Octávio Bastos, pelos alunos do primeiro período de Biomedicina. Durante o processo, teve-se a orientação do professor da disciplina em questão, Amilton Cesar Santos e do técnico de laboratório, Ricardo Alexandre, que demonstraram práticas das diferentes disposições dos tecidos em estudo e procedimentos técnicos aplicados na Histotecnologia voltadas para pesquisas científicas e diagnósticos patológicos. Nesse sentido, vê-se características estudadas teoricamente, presentes em análises práticas laboratoriais.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

GARTINER, 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.

AARESTRUP, Beatriz Julião. **Histologia Essencial**, 2012. pag 15 .

ANTÃO, Vitória de Santo. **Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações: 3.7. coloração de tricômico de masson**. 2021. 32 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2021. Cap. 1. Disponível em: <https://classroom.google.com/c/NDY0MDgwMzkwMjAy/a/NDg2ODM1NzkwNTgz/details>. Acesso em: 31 maio 2022.