

UNIFEOB  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO  
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR  
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**INTRODUÇÃO DE HISTOTÉCNICAS**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

UNIFEOB  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO  
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR  
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## INTRODUÇÃO DE HISTOTÉCNICAS

### 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:

Anor **Soares Filho**

Gabriel **Gregório**

Gustavo **Gregório**

Letícia **Courelle Geres**

Lorena **Fernandes**

Lucas **Leonardo**

2022

## **INTRODUÇÃO DE HISTOTÉCNICAS**

Anor **Soares Filho**<sup>1</sup>; Gabriel **Gregório**<sup>1</sup>; Gustavo **Gregório**<sup>1</sup>; Letícia **Couelle Geres**<sup>1</sup>; Lorena **Fernandes**<sup>1</sup>; Lucas **Leonardo**<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

UNIFEOB

### **INTRODUÇÃO SOBRE TÉCNICAS DE OBTENÇÃO**

Histologia é responsável pelo estudo das células e tecidos do corpo humano e da forma que essas estruturas se organizam para a formação dos órgãos. Para isso é necessário o auxílio de microscópio por se tratarem de pequenas dimensões celulares. É essencial conhecer as ferramentas e métodos de investigação para compreender o funcionamento das estruturas das células, dos tecidos e dos órgãos. O mínimo erro desde a coleta até a observação pode fracassar todo o estudo. (JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia básica. 13ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 1832p.).

#### **FIXAÇÃO**

O objetivo da fixação é manter intacta a estrutura celular, impedindo que aconteçam a autólise, ou seja, destruição da célula pelas suas próprias enzimas e também a ação e proliferação de bactérias. A fixação pode ser feita através do uso de agentes químicos ou por processos físicos. A criofixação é um exemplo de agente físico e tem por fundamento submeter o material a ser analisado a um congelamento rápido. A fixação mais empregada é a que utiliza agentes químicos. Normalmente o espécime é imerso numa mistura de compostos químicos. Tecidos

fixados em soluções não tamponados passam por profundas alterações, pois a amostra sofre uma acidificação que modifica a estrutura das proteínas. (BENCHIMOL, Marlene et al. Métodos de estudo de célula. Editoração Eletrônica, Fenorte/UENF, 1996.)

## **TÉCNICAS HISTOPATOLÓGICAS: PREPARAÇÃO DE TECIDOS<sup>2</sup>**

A análise histopatológica consiste no estudo das células e tecidos do nosso corpo para realizar o diagnóstico de uma doença. Para realizar o estudo da anatomia patológica é necessário ter uma amostra do material biológico, obtido através de biópsias e peças cirúrgicas. Preparação do tecido para análise histopatológica:

1. Coleta: É a primeira etapa e consiste na retirada de uma amostra de tecido para a investigação.

2. Fixação: A fixação evita a autólise celular e impede a proliferação de microrganismos, preservando a morfologia do tecido. Os agentes fixadores usados são o formol tamponado e o líquido de Bouin.

3. Desidratação: Consiste na remoção da água dos tecidos. O método mais utilizado, são soluções alcoólicas, chegando até o álcool 100%.

4. Clarificação ou diafanização: Essa etapa remove totalmente o álcool, utiliza-se o xilol, deixando o material mais claro.

5. Inclusão: Ainda com os tecidos frágeis acontece então a impregnação do tecido com uma substância de consistência firme. Assim o tecido é endurecido, facilitando o corte em camadas finas.

6. Microtomia: Depois de endurecido, o bloco de parafina deve ser cortado em seções extremamente finas, que permitam a visualização do tecido ao microscópio.

7. Coloração: Como as seções de parafina incolores, são então corados para possibilitar a análise. E finalmente após a coloração, os cortes são protegidos por uma lamínula e podem ser analisados por microscopia.

(ROSS, Michael H., PAWLINA, Wojciech. Ross | Histologia – Texto e Atlas – Correlações com Biologia Celular e Molecular, 7ª edição. Guanabara Koogan, 2016.)

(MEDRADO, Leandro. Carcinogênese – Desenvolvimento, Diagnóstico e Tratamento das Neoplasias. Érica, 2015. )

(ORÉFICE, Rodrigo Lambert, PEREIRA, Marivalda Magalhães, MANSUR, Herman Sander. Biomateriais – Fundamentos e Aplicações. Guanabara Koogan, 2012.)  
(MOREIRA, Maria da Vieira, MONTENEGRO, Sérgio Tavares, PAOLA, Angelo Amato V. (eds.). Livro-texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2ª edição. Manole, 2015.)  
(HAMMER, Gary D., McPHEE, Stephen J. Fisiopatologia da Doença, 7th edição. AMGH, 2015).  
(SALU, Enio Jorge. Administração Hospitalar no Brasil. Manole, 2013).  
(MOLINARO, Etelcia M., CAPUTO Luzia F., AMENDOEIRA, Maria R. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010).  
(SPTI – IOC/Fiocruz . Técnicas Histológicas – Uma Abordagem Prática)

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **Coleta e fixação do Material.**

O objetivo da coleta é retirar os órgãos a serem analisados de um determinado organismo. A fixação é uma das etapas mais importantes e tem por finalidade a interrupção do metabolismo celular. A fixação química é a mais utilizada na técnica histológica de rotina. Os mais utilizados são os fixadores formaldeídos, como formalina a 10%; formol-salino; formalina tamponada de Carson ou formalina em tampão Millonig; formalina-alcoólica e a mais utilizada rotineiramente, é a formalina neutra tamponada a 10%. Outras substâncias também são utilizadas como a acetona, os ácidos acético e pícrico, o álcool etílico e o fixador de Bouïn. Alguns fatores influenciam na fixação, como temperatura, espessura do tecido, tempo de fixação, escolha do fixador, pH e concentração do fixador.

A clivagem tem por objetivo reduzir o tamanho do material biológico com a finalidade de facilitar a penetração do fixador em menor tempo. O corte do material (sagital, transversal ou oblíquo) determina como os tecidos serão incluídos no bloco para serem cortados no micrótomo. Após a clivagem o material será acondicionado em cassetes histológicos identificados.

## **Processamento de inclusão do material em parafina**

O processamento histológico consiste na difusão de reagentes químicos para o interior dos tecidos e remoção do líquido. O processo torna os fragmentos dos tecidos rígidos facilitando a obtenção de cortes finos para a observação ao microscópio. O processo de rotina, tem as seguintes etapas: desidratação, diafanização, impregnação e inclusão, sendo a parafina é substância mais utilizada nas duas últimas etapas.

### **Desidratação**

O objetivo é retirar a água do tecido já que a parafina é insolúvel água. O álcool etílico é o mais utilizado para esse fim. O processo é progressivo quanto a graduação alcoólica.

- \* álcool 70%
  - \* álcool 80%
  - \* álcool 90%
  - \* absoluto I (álcool 100%)
  - \* absoluto II (álcool 100%)
- 1 hora para cada banho de álcool

### **Diafanização ou Clarificação**

A finalidade da diafanização ou clarificação é remover completamente o álcool do interior dos tecidos, visto que a parafina não se mistura homoganeamente com o álcool. Desta forma:

O xilol é o agente utilizado nesta etapa do processo histológico de rotina. Ao substituir o álcool esse diafanizador vai deixando o tecido mais claro (quase transparente), por isso este processo também é chamado de clarificação. Nesse processo é recomendado o tecido passar mais de uma vez no diafanizador (xilol) para que obtenha um maior sucesso nesta etapa.

- Xilol I
- Xilol II

(1h para cada banho de xilol).

### **Impregnação**

A impregnação consiste na infiltração da parafina líquida no material biológico para que o tecido adquira rigidez suficiente e seja possível a realização de cortes finos.

O objetivo desta etapa é eliminar completamente o xilol contido na peça e a total penetração da parafina nos espaços deixados pela água e pela gordura, antes existentes no tecido. Neste procedimento, também é recomendável passar o material mais de uma vez na parafina líquida, visando garantir uma impregnação eficiente. Esta etapa deve ser realizada em estufa regulada a 60o C. Lembrar que a parafina deve ser colocada na estufa, anteriormente à realização desta etapa, para que ela possa derreter.

- Parafina I
- Parafina II (1h para cada banho de parafina em estufa regulada a 60o C).

### **Inclusão em parafina.**

A inclusão tem como seu objetivo envolver o exterior do material biológico com a parafina líquida, para assim formar blocos que serão submetidos futuramente à microtomia. Nesta etapa do processo o material é colocado em uma superfície clivada a ser cortada para baixo em um molde para a inclusão da parafina, e em seguida coberto com o cassete. Depois do tempo de resfriamento, os blocos de parafina com o material são obtidos. É de grande importância estar atento na posição que as pequenas peças serão colocadas, visto que isso determinará a incidência de corte que será realizada.



Figura 1: Preenchendo bloco com parafina e inserindo material.

## Microtomia

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. A navalha é uma das peças fundamentais nesse equipamento, sendo responsável por executar os cortes que podem ser de diversos tipos. 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 distendam 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.

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



Figura 2: Micrótomo e laminas em banho maria

## Coloração

A coloração compreende uma etapa importantíssima para a visualização e interpretação do material citológico e histológico, a coloração é imprescindível para a observação dos componentes teciduais, uma vez que o processamento de rotina deixa a peça translúcida devido ao xilol e à microtomia. A coloração deve seguir o objetivo da análise. Para uma observação geral, a técnica de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (H.E.) é a mais indicada. Para a análise de elementos específicos do tecido, é recomendável técnicas histoquímicas. Como os corantes utilizados para ambas as técnicas (rotina e histoquímica), são hidrossolúveis, é



necessário a remoção da parafina e a reidratação do corte. Após a coloração, a desidratação e a clarificação são necessárias para possibilitarem a montagem da lâmina tanto citológica, quanto histológica.

### **Procedimentos gerais para colorações**

Consiste em remover a parafina do tecido a ser corado, seguindo as etapas abaixo:

**Desparafinização:** tem por objetivo remover a parafina do tecido após a microtomia, utilizando dois banhos de xilol.

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

**Hidratação:** Tem por finalidade hidratar o tecido com concentrações decrescentes de álcool.

- Álcool absoluto I (1 min)
- Álcool absoluto II (1 min)
- Álcool 90% (1 min)
- Álcool 80% (1 min)
- Álcool 70% (1 min)
- Água destilada (1 min)

**Coloração:** é o ato de corar o tecido com o corante escolhido para a posterior visualização em microscópio de luz.

**Desidratação:** tem por objetivo retirar a água do tecido por meio de concentrações de álcool crescentes, visto que os meios de selagem não são miscíveis em água.

- Álcool 70% (1 min)
- Álcool 80% (1 min)
- Álcool 95% (1 min)
- Álcool absoluto I (3 min)
- Álcool absoluto II (3 min)

**Clarificação:** tem por finalidade usar o xilol para remover o álcool, que este último também não é miscível com o meio de montagem, e após esta etapa, realizar a montagem da lâmina.

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

**Selagem ou montagem da lâmina:** esta etapa consiste em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando um meio de montagem para fixar a lâmina à lamínula (selagem).

Os meios de montagem mais utilizados são com Bálsamo do Canadá, Ethelan etc.

### **Coloração HE**

1ª Etapa: desparafinar e hidratar.

2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto, para assim receber o primeiro corante, a hematoxilina. As lâminas ficam imersas no corante por 3 minutos.

3ª Etapa: lavar as lâminas com água corrente por 10 minutos e corar com eosina por 7 minutos.

4ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

**Resultados:** os núcleos coram-se de azul a roxo pela hematoxilina, enquanto que o citoplasma e os espaços extracelulares são corados pela eosina, em róseo ou avermelhado.



Figura 3: Lâmina corada em HE.



Figura 4: Núcleos corados em roxo; citoplasma e material extracelular corado em rosa.

### **Coloração de Tricromico de Masson** Etapas

da coloração do Tricômico de Masson 1ª

Etapa: desparafinar e hidratar.

2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.

3ª Etapa: colocar em solução de Boiün por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente.

4ª Etapa: lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin e depois em água destilada.

5ª Etapa: corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos.

6ª Etapa: lavar em água corrente por 10 minutos e em água destilada.

7ª Etapa: corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos. 8ª

Etapa: passar por água destilada.

9ª Etapa: diferenciar pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos.

10ª Etapa: lavar em água destilada.

11ª Etapa: corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos.

12ª Etapa: lavar em água destilada.

13ª Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos. 14ª

Etapa: lavar em água destilada.

15ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: os núcleos serão corados em preto; o citoplasma, queratina e fibras em vermelho; colágeno e muco em azul.



Figura 5: Preparando a montagem da lâmina.

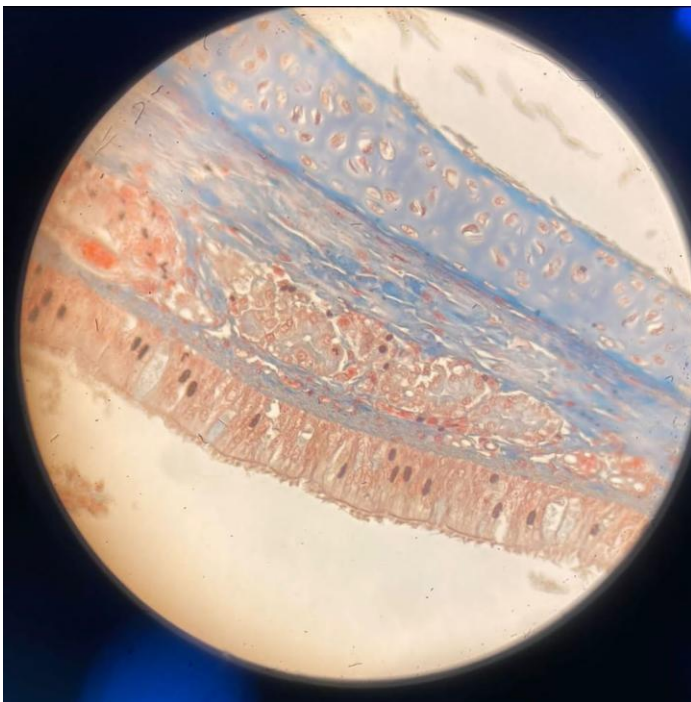


Figura 6: Coloração Tricromo de Masson tecido Esôfago e traqueia

(os núcleos serão corados em preto; o citoplasma, queratina e fibras em vermelho; colágeno e muco em azul).

## **2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Chegamos ao resultado que todas as etapas são extremamente importantes para não comprometer o procedimento final, respeitando seus tempos e suas etapas.

## **3 CONCLUSÃO**

Entretanto a Histotécnica visa a preparação dos tecidos para o estudo microscópico. O processamento histológico é um conjunto de procedimentos técnicos executados em fases seqüenciais que requerem, ao mesmo tempo, observação dos protocolos e capacidade de adaptação dos mesmos diante da necessidade de cada amostra, que é única. Apenas o conhecimento dos princípios físicos e químicos de suas diversas etapas, aliado à experiência laboratorial, possibilitam que o corte histológico tenha a qualidade ideal e esperada.

## REFERÊNCIAS

- BENCHIMOL, M. **Métodos de estudo de célula**. Editoração: Eletrônica, Fenorte/UENF, 1996. Site:cesad.ufs.br
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017; 1832p.  
(Banks, 1992: Junqueira e Carneiro, 1999)
- ROSS, Michael H., PAWLINA, Wojciech. Ross | **Histologia – texto e Atlas - Correlações com Biologia Celular e Molecular**, 7ª edição. Guanabara Koogan, 2016.
- MEDRADO, Leandro. **Carginogênese - Desenvolvimento , Diagnóstico e Tratamento das Neoplasias**. Érica, 2015.
- ORÉFICE, Rodrigo Lambert, PEREIRA, Marivalda Magalhães, MANSUR, Herman Sander. **Biomateriais – Fundamentos e Aplicações**. Guanabara Koogan, 2012.
- MOREIRA, Maria da Vieira, MONTENEGRO, Sérgio Tavares, PAOLA, Angelo Amato V.(eds.). **Livro-texto da Sociedade Brasileira de Cardiologia**, 2ª edição. Manole, 2015.
- HAMMER, Gary D., McPHEE, Stephen J. **Fisiopatologia da Doença**, 7th edição. AMGH, 2015.
- SALU, Enio Jorge. **Administração Hospitalar no Brasil**. Manole, 2013. MOLINARIO, Etelcia M., CAPUTO Luzia F., AMENDOEIRA, Maria R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: volume 2**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.
- SPTI – IOC/Fiocruz. **Técnicas Histológicas – Uma abordagem Prática**