

UNIFEOB  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO  
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR  
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**PREPAROS 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

## **PREPAROS 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:

Adrian R.B. **LOPES**

Isabela C. R. P. **MORAES**

Letícia M.G. **PALERMO**

Lívia M.H. **CUNHA**

Maria T.N. da **SILVA**

Yasmim P. **AMARO**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

## **PREPAROS DE HISTOTÉCNICAS**

Adrian R.B. **LOPES**<sup>1</sup>; Isabela C. R. P. **MORAES**<sup>1</sup>; Letícia M.G.**PALERMO**<sup>1</sup>; Livia M.H.**CUNHA**<sup>1</sup>; Maria T.N. da **SILVA**<sup>1</sup>; Yasmim P. **AMARO**<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

### **INTRODUÇÃO**

Histologia (histo= tecidos, logia= estudo). Segundo Histologia Comparada de George, Alves e Castro (1997) os estudos histológicos se distinguem em Histologia animal e vegetal. Na animal, obtém-se a histologia geral, que estuda as características, funções e propriedades de cada tecido e a histologia especial cujo o estudo é associado aos diversos tecidos necessários para constituição de um órgão, estuda sua estrutura microscópica. Ela busca conhecer e compreender a forma com que esses demais conjuntos em agrupamento trabalham, sendo por sua própria desenvoltura e/ou voltados para seus órgãos – onde cada um é responsável por uma determinada função, seja para revestir, proteger, curar ou até mesmo servindo como um “step” para caso onde exista a necessidade de um membro reserva.

Para realizar o estudo das células e dos tecidos é necessário o uso de técnicas e instrumentos específicos que nos ajudam a estudá-los e analisá-los mais a fundo. O conjunto dessas técnicas é chamado de ‘histotécnicas’ e é necessário conhecimento dessa metodologia e deixar o tecido, material de estudo, apto para não sofrer autólise e preservar suas estruturas e composição molecular. Somente com a preparação que podemos fazer análises nos microscópios, pois não será possível enxergar o tecido sem tratamento. A luz passaria direto por ele, por isso a importância de corar os tecidos e as demais técnicas para torná-la eficiente (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Ao estudar por meio deste método, é compressível a construção do conhecimento sobre as células mais importantes presentes em nossos organismos, no entanto, é através da histologia que ficamos a par da física, química, imunologia e também da patologia que são essenciais para um melhor aproveitamento e entendimento da estrutura das células, dos tecidos e dos órgãos, sendo assim, a sua biologia e, como esses diversos componentes são capazes de agir, enfrentar e combater doenças

inflamatórias, infecciosas, resfriados, hematopoiéticos, metabólicas, neoplasias, nutricionais, transtornos imunitários, doenças do sistema nervoso, entre outras. Vale ressaltar que para uma melhor desenvoltura, o conhecimento básico do aparelho microscópio é de extrema precisão, afinal, será este que irá possibilitar a compreensão e percepção da matéria.

Concluindo assim, a histologia que também aborda meios técnicos como os instrumentos/aparelhos usados como auxílio em métodos de estudo, é capaz de reparar e consultar os mínimos detalhes tendo a maior precisão quando necessário. Contudo, compreende-se que neste meio há diversas possibilidades para a melhoria e voltada para métodos de estudo e compreensão através da histologia que busca ampliar a visibilidade e contribuir para um melhor entendimento das relações de suas dadas estruturas.

Na preparação para o estudo de tecidos ao uso de microscópio, reside o fundamento de cortes histológicos, além de é claro, uma preparação com lâminas, pincéis, e o material vegetal que será analisado. Este material geralmente é analisado no microscópio de luz – também conhecido como microscópio óptico e/ou fotônico – onde a imagem observada instaura-se no ato dos raios luminosos pelo feixe de luz que, atravessa o material observado.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O material biológico para ser analisado tende a ser preparado, compreendendo várias etapas, são elas: Coleta do material; fixação; descalcificação; clivagem; desidratação; diafanização; infiltração; inclusão; microtomia; coloração e selagem.

Coleta do material - Por meio de uma lâmina de barbear, são retiradas partes de órgãos, segmentados em pequenos fragmentos. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Fixação - Sua importância consiste na preservação das células e tecidos, evitando autólise e ataque bacteriano. Após a coleta, estes fragmentos devem ser fixados por métodos químicos ou físicos. Método químico: Os tecidos são imersos em soluções de agentes desnaturantes ou agentes que estabilizam as moléculas ao formar pontes com moléculas adjacentes. O método químico é o mais usado, dentre eles os mais usados são o formaldeído em proporção de 9 para 1 de concentração,

e o paraformol é mais recomendado para pesquisa e patologia. O fixador tem que ser colocado 20x o volume do tamanho da peça e no mínimo 6 horas de fixação, sendo mais correto a peça ficar 24 horas no fixador para obter um melhor resultado. Método físico, os procedimentos usados são o calor ou o frio, o calor (a chama de um bico de Bunsen), o frio (a congelação do material, vários graus abaixo de zero). A Fixação física por congelação é um método alternativo para separar diferentes secções de tecidos. Submete-se o material coletado a um congelamento rápido, assim os tecidos são fixados por congelação, tornando-os rígidos e prontos para serem seccionados. O criostato ou crio micrótomo foi desenvolvido para a produção de cortes e tecidos fixados por congelação. Esse método permite uma preparação objetiva, sem os processos de desidratação e inclusão. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Descalcificação- Tecidos calcificados são mais resistentes e a rigidez dos tecidos acaba prejudicando os materiais de corte e a análise microscópica. É necessário retirar os sais do tecido para torna-lo mais maleável, existem três formas de descalcificar os tecidos, por ácidos e solução quelante (métodos químicos), ultrassom e micro-ondas (métodos físicos), mas em geral os métodos físicos auxiliam os processos químicos a serem mais rápidos em não atuam sozinhos. Os ácidos mais usados são os: Ácido fórmico, ácido acético e ácido pícrico, são mais usados pois também possuem ação fixadora e já iniciam o processo de descalcificação. Ácidos mais fortes como o clorídrico e nítrico são menos usados pois danificam mais os tecidos. Nos tecidos calcificados a descalcificação é feita logo após a fixação. (NUNES, CINZA, 2016).

Clivagem - Após a fixação o tecido é seccionado. A secção deve ser precisa, o corte deverá acompanhar o maior diâmetro, e suas faces devem ser planas e paralelas. Os órgãos ocos, pele e mucosa precisam ser segmentados de forma perpendicular à superfície, enquanto os de tecido muscular devem acompanhar paralelamente a orientação das fibras. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Desidratação - Mesmo após a fixação os tecidos ainda se encontram com cerca de 85% de água. Ocorre a extração de água nos tecidos por diversos banhos de soluções de concentrações crescentes de álcool (desde álcool 70% até 100%). (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Diafanização - Consiste na retirada do álcool para que os tecidos possam ser englobados pela parafina, pois essa é insolúvel em água e muito menos em álcool. As substâncias intermediárias usadas são o xilitol e o tuluol, que embalam esses tecidos, deixando-os transparentes ou translúcidos. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Infiltração - Os fragmentos de tecidos e órgãos devem ser infiltrados com substâncias que lhes proporcione uma consistência rígida. As substâncias mais utilizadas são algumas resinas de plástico (para microscopia de luz e eletrônica) e a parafina (para microscopia de luz). (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Inclusão - Novamente o tecido é embebido em parafina. Desta vez a parafina vai enrijecer o exterior, já que na infiltração ela ocupa os espaços interiores dos tecidos que antes eram ocupados por água e gorduras. A parafina para ser utilizada (tanto na infiltração quanto na inclusão) precisa ser derretida (56 a 60°C). É importante que sua temperatura esteja correta para evitar que as estruturas celulares sejam danificadas. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Bloco de

Tecido incluído no

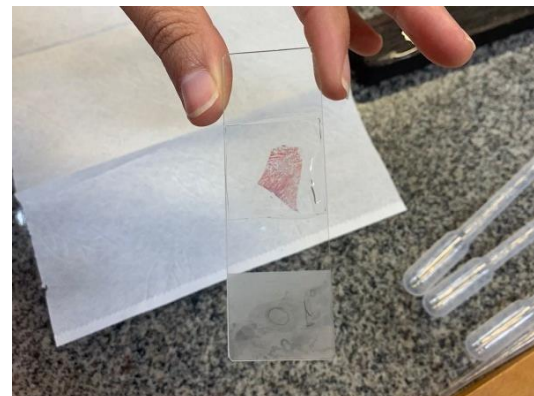
Microtomia - Após a solidificação ao sair da estufa, esse bloco é levado a um micrótomo, onde uma lâmina de aço ou de vidro, fornece cortes de 1 a 10 micrômetros de espessura. (1 micrômetro = 0,001mm). Ao realizar o corte, estes são colocados sobre uma superfície de água aquecida (banho-maria) para evitar dobras e depois são catadas pelas lâminas de vidro (laminação). (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Coloração – Através do uso da coloração torna-se mais evidente a observação dos tecidos e seus componentes. Muitos corantes apresentam substâncias de caráter ácido ou básico e tendem a formar ligações eletrostáticas (salinas) com componentes ionizados dos tecidos. Os componentes que se coram bem com corantes básicos são chamados basófilos e com corantes ácidos de acidófilos. O azul de toluidina, azul de metileno e a hematoxilina são corantes de caráter básico. A eosina é um corante de caráter ácido. A hematoxilina e a eosina são os mais utilizados nas colorações básicas, sendo reconhecidos como H.E. Eosina: é usada para colorir o citoplasma, tendo coloração rosácea. Hematoxilina: colore os núcleos das células (RNA e DNA), tendo coloração roxa-azulada. Lembrando que para fazer o uso dos corantes o tecido precisa ser reidratado novamente, pois os corantes são solúveis em água, neste processo a lâmina passa por concentrações de xilol para a retirada da parafina e posteriormente por concentrações decrescente de álcool até a água pura para reidratação. Após a coloração com os corantes o tecido tem de ser desidratado novamente, pelo caminho inverso, com concentrações crescentes em álcool até 100 por cento. Para a retirada do álcool dos tecidos, passa por fim por soluções de xilol. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Colorações Histoquímicas tendem a ter um melhor desempenho em colorações de tecidos especiais como o conjuntivo. Elas pigmentam melhor fibras colágenas e tecidos especiais. Ao longo dos nossos estudos em histotécnicas pudemos estudar a coloração tricômico de Masson. Tricômico de Masson, etapas da coloração: 1º desparafinar e hidratar; 2º lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto; 3º colocar em solução de Boiün por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente

deixar por uma noite em temperatura ambiente; 4º lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin e depois em água destilada; 5º corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos; 6º lavar em água corrente por 10 minutos e em água destilada; 7º corar pela solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos; 8º passar por água destilada; 9º diferenciar pela solução de ácido fosfotúngstico- fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos; 10º lavar em água destilada; 11º corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos; 12º lavar em água destilada; 13º passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos; 14º lavar em água destilada; 15º 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. (SANTOS K, R, P; ANTÃO V, S, 2021).

Selagem - Adiciona-se uma cola solúvel em xilol, substância presente devido ao último processo após a coração com os corantes, e cobre o conjunto com uma lâmina de vidro. A amostra foi preparada permanentemente e está pronta para ser estudada nos microscópios. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).



*Lâminas seladas e prontas. Coloração Tricômica de*

## **MICROSCOPIA**

Devido as pequenas dimensões das células e dos componentes da matriz extracelular, utiliza-se o auxílio de microscópios. Há dois tipos fundamentais de

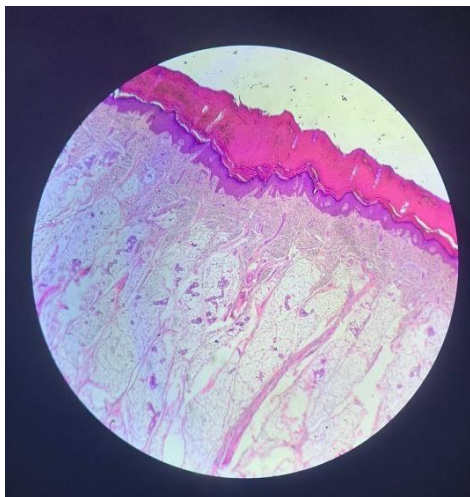


microscópios: Microscópio óptico ou de luz e o microscópio eletrônico. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

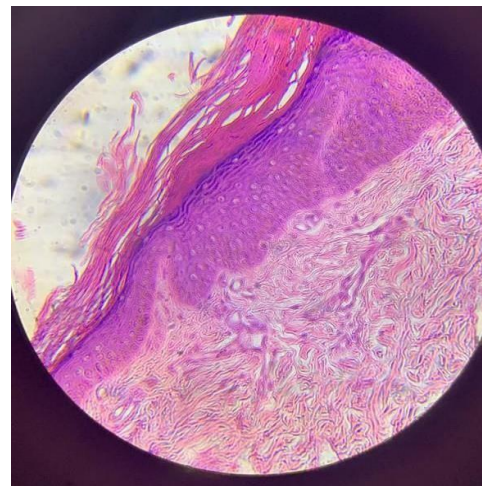
O Microscópio óptico ou de luz (MO) é composto por partes mecânicas e ópticas. O componente óptico consiste em três sistemas de lentes: condensador, objetivas e oculares. O condensador concentra a luz de uma lâmpada e projeta esse feixe sobre o espécime. A objetiva recebe a luz que atravessou o espécime e projeta uma imagem aumentada em direção a ocular, que novamente ampliada, é direcionada a retina, em uma tela, em uma câmera fotográfica ou em um detector eletrônico. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

Microscópio eletrônico (ME): Existem dois tipos, o de varredura e de transmissão, ambos se baseiam na interação entre elétrons e componentes dos tecidos. (GEORGE, ALVES E CASTRO, 1997).

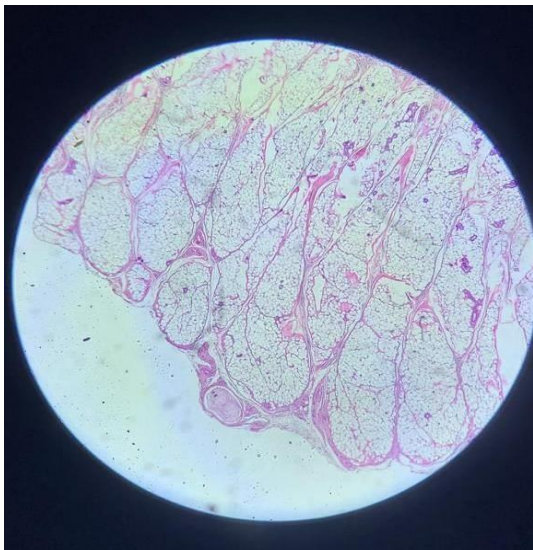
## RESULTADOS E DISCUSSÕES



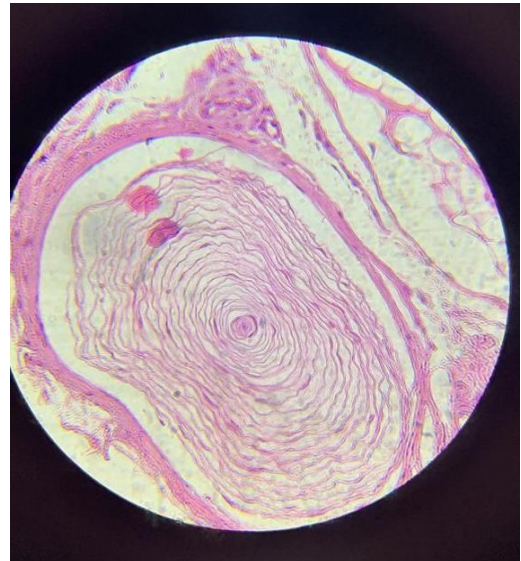
*Tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado, objetiva 10X. Coloração H.E.*



*Tecido epitelial de revestimento estratificado pavimentoso queratinizado, objetiva 10X. Coloração H.E.*



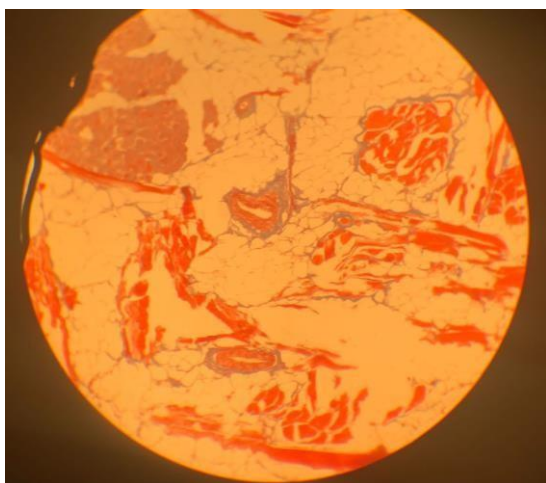
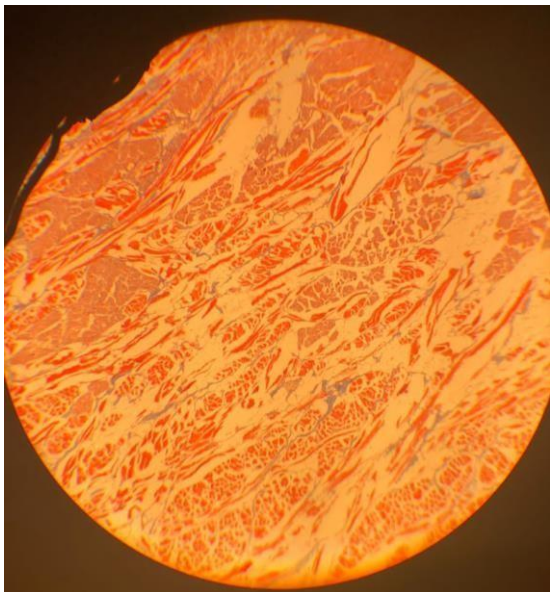
*Tecido conjuntivo e adiposo presentes na pele. Aparência mais amarelada, tecido adiposo. (Microscópio Óptico -objetiva 40X). Coloração H.E.*



*Tecido conjuntivo e adiposo presentes na pele, aparência mais rosácea tecido conjuntivo.*



*Tecido conjuntivo e adiposo presentes na pele. Aparência mais amarelada, tecido adiposo; aparência mais rosácea tecido conjuntivo (microscópio Óptico -objetiva 40X). Coloração H.E.*

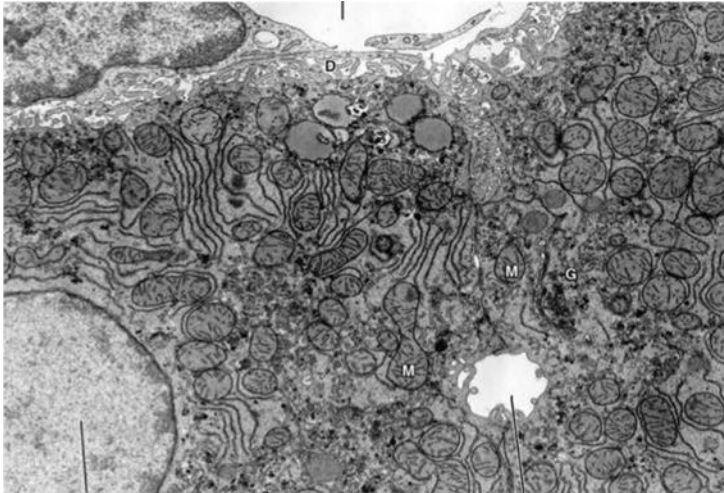


*Tecido do fígado. Observa-se células parênquimais, células adiposas, artéria e fibras musculares. Coloração de Masson.*

A Histoquímica é um ramo que estuda os componentes químicos das células, é a partir de suas colorações que obtemos os melhores diagnósticos que nos permitem uma maior detecção de antígenos específicos e imunofenotipagem de tecidos ou agentes infecciosos. É um exame muito útil na avaliação confirmatória de um determinado diagnóstico, podendo ser utilizado também na avaliação prognóstica de pacientes. (Gabriela Fredo- CRMV-RS- 12455).

Conforme pudemos observar nas nossas lâminas epiteliais coradas em H.E, os tecidos estão saudáveis de acordo com a histologia, o que não podemos dizer das

lâminas coradas em tricômico de Masson do tecido do fígado. Nas lâminas do fígado têm muitas células adiposas, sendo possível o diagnóstico de esteatose. Isso em comparação com lâminas hepáticas presentes no livro Histologia Básica de Junqueira L, C e Carneiro, J (2013).



*Micrografia eletrônica do fígado. Os hepatócitos contêm numerosas mitocôndrias, retículo endoplasmático liso e granuloso. O sinusoide é revestido por células endoteliais com amplas fenestras abertas. O espaço de Disse (D) é ocupado por numerosos microvilos que se projetam dos hepatócitos. (9.200x. Cortesia de O. Schmucker.)  
Imagem do livro Histologia Básica, Junqueira L, C e Carneiro, J (2013).*

## CONCLUSÃO

Ao longo de nosso aprendizado constatamos que todas as etapas devem ser feitas com êxito para não afetar nos resultados das lâminas e não prejudicar na visualização dos tecidos. Dentre os erros mais cometidos, são contudo erros banais, que apenas uma atenção redobrada os impediria. Itens que exigem atenção: Temperatura ideal da parafina, afiação das lâminas do micrótomo, tempo exigido de reação em cada solução, formato do bloco da parafina, ele precisa estar bem moldado para não dificultar o corte no micrótomo.

Concluimos que a histotécnica proporciona o entendimento dos fundamentos técnicos para a análise dos elementos teciduais. É de suma importância para o descobrimento de novas patologias através de suas técnicas, proporcionando o entendimento do tecido. É essencial aos serviços de saúde, pelo apoio do diagnóstico e tratamento aos pacientes. O domínio correto das histotécnicas é fundamental para

pesquisas científicas, pois os resultados podem variar e não ser o esperado, se houver em uma das etapas erros técnicos.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**, 12ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 538p.

GEORGE, L.L; CASTRO, R.R.L; ALVES, C.E.R; **Histologia comparada**, 2ed. São Paulo: Roca LTDA, 1997. 298p.

NUNES, C.S; CINZA, L.A; Princípios do Processamento Histológico de Rotina, **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. v. 8, n. único, p. 31-40, 2016.

GABRIELA FREDO. Diagnóstico Veterinário. **Imuno-Histoquímica na Medicina Veterinária**. 2018. Disponível em: <https://www.diagnosevet.com.br/noticias/o-que-e-e-para-que-serve-um-exame-imuno-histoquimico>

SANTOS K, R, P; ANTÃO V, S. **Manual de técnica histológica de rotina e de colorações**. 2021. 32 p. Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, 2021.