

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROJETO 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

PROJETO 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:

Amanda Fernandes **ZINGONI**

Ana Carolina V. **XAVIER**

Cainã Tupá da **CUNHA**

Fellipe Kozerski **SILVA**

Gabriel A. Valentim **BETITO**

Laura Vitória Melotto **PEREIRA**

Letícia Mara Rodrigues **GOMES**

Tauane F. Barbosa **RANGEL**

PROJETO DE HISTOTÉCNICAS

Amanda Fernandes **ZINGONI**¹; Ana Carolina V. **XAVIER**¹; Cainã Tupá da **CUNHA**¹; Fellipe Kozerski **SILVA**¹; Gabriel A. Valentim **BETITO**¹; Laura Vitória Melotto **PEREIRA**¹; Letícia Mara Rodrigues **GOMES**¹; Tauane F. Barbosa **RANGEL**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

UNIFEQB

INTRODUÇÃO

A histologia é o estudo das células e dos tecidos do corpo e como essas estruturas se organizam para constituir os órgãos, mas para que isso seja possível é necessária a produção de uma lâmina histológica, que será estudada com o auxílio de um microscópio, devido á pequena dimensão das células. Essa lâmina será produzida por meio de histotécnicas, prática que consiste nos procedimentos necessários para a sua produção, dividida em etapas que serão descritas posteriormente.

O passo inicial para o estudo de quaisquer cortes histológicos consiste na coleta do material a ser observado. Em relação a isso, existem duas diferentes classificações: coleta in vivo, mais conhecida como biópsia e post-mortem. Imediatamente após a coleta, é fundamental acondicionar o material e identificar a amostra devidamente (inclusive a região da qual foi coletado, se necessário). Após essas etapas, deve ser realizada a fixação das amostras.

A fixação é fundamental, pois evita o dano aos tecidos causado por bactérias ou autólise, preservando a composição estrutural e química, além de permitir uma coloração adequada. Pode ser realizada por métodos químicos ou, menos comumente, métodos físicos, seja por frio através do congelamento das amostras em câmaras frigoríficas ou por calor, método conhecido como fixação por esfregaço. Existem dois principais tipos químicos de fixação: imersão, quando acontece em pequenos fragmentos de órgãos e/ou tecidos, que podem ser submergidos inteiramente em substâncias fixadoras, ou perfusão intravascular, quando o processo é realizado no organismo de forma integral, ou seja, a substância fixadora é bombeada através do sistema vascular do cadáver, espalhando-a para todos os tecidos e preservando-os

por inteiro. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

Em seguida é feito a clivagem do material, ou seja, reduzir o tamanho das peças, que serve para facilitar a penetração das substâncias que serão utilizadas a seguir. A orientação do corte é essencial, pois determina como os tecidos serão incluídos no bloco de corte e, posteriormente, ter sua influência na análise microscópica. É muito importante lembrar que não deve ser feita pressão no material fixado com a pinça ou com qualquer outro instrumento utilizado, pois isso causaria a distorção da estrutura tecidual.

Mesmo após o processo de fixação do material biológico, seu corpo ainda retém 85% de água em seu interior e, como a parafina é um produto derivado do petróleo (insolúvel em água), é necessário realizar a desidratação para que ela possa penetrar no tecido processado. Muitas substâncias desidratantes são eficazes, apenas variando seu tempo de desidratação. Inicialmente a água contida no tecido é extraída por diversos banhos em soluções crescentes de etanol, formol ou álcool (80% até 100%). Após esse processo, pode-se ver que o fragmento recuperou sua cor original e diminuiu de tamanho. O correto é fazer de forma progressiva quanto à graduação alcoólica e não diretamente no álcool absoluto.

Após a desidratação, o tecido é tratado com xileno (xilol), uma substância química que é miscível tanto com o álcool como com a parafina derretida. Este processo é conhecido como diafanização ou clarificação, porque os tecidos se tornam transparentes quando impregnados pelo xileno.

Para permitir a distinção entre as células sobrepostas e a matriz extracelular em um tecido, deve-se impregnar os tecidos em um meio de inclusão adequado, para em seguida cortá-los em finíssimas fatias. Para a microscopia de luz, o meio de inclusão usual é a parafina. O tecido é colocado no cacete e imerso em um recipiente contendo parafina derretida, até que ele se torne completamente impregnado por essa substância formando um bloco de parafina.

A microtomia do material consiste, basicamente, em utilizar um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina com as peças incluídas (cortes entre 1µm e 6µm). Após o corte, os materiais biológicos devem passar pelo banho-maria (temperatura aproximada de 40°C, afim de evitar a formação de “pregas”) para realizar a distensão dos cortes, posteriormente devem ser coletados por lâminas limpas e adesivadas, que irão à estufa, para a retirada de todos os resíduos da parafina e adesão do corte à lâmina. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2012)

Para ser estudada ao microscópio, a maioria dos cortes histológicos deve ser corada, foram desenvolvidos métodos de coloração que tornam evidentes os vários componentes dos

tecidos, das células e da MEC. Os corantes mais utilizados nesse processo são a hematoxilina e eosina (HE). A hematoxilina cora em violeta ou azul as estruturas ácidas da célula (como o núcleo) e a eosina, por outro lado, cora os componentes básicos (como o citoplasma) em rosa. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

Para a coloração ser feita é necessária a hidratação das amostras que já estão na lâmina, a imersão no corante de acordo com o tempo necessário, a retirada do excesso com água corrente ou álcool acético, mais um processo de desidratação e diafanização. E por fim, adiciona-se uma cola própria e cobre-se as amostras com lamínulas de vidro, para evitar que sejam danificadas. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

Após todas as etapas o último passo consiste na observação da lâmina histológica, é nessa hora que será possível ver se o trabalho teve o resultado esperado, pois, um erro despercebido em qualquer processo da sua confecção acaba alterando seu conteúdo. A observação é feita por meio de microscópios (podendo ser de vários tipos), na qual o diagnóstico ou o estudo será realizado.

MATERIAS E MÉTODOS

Para a confecção da lâmina histológica foram utilizados o mesmos métodos citados no capítulo anterior, com variações de acordo com matérias disponíveis no laboratório.

Para que uma amostra de tecido seja analisada microscopicamente, é preciso, antes de tudo, que seja retirada do organismo, vivo ou morto, por meio de biópsia e/ou durante uma cirurgia, ou necropsia, respectivamente (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). No caso do tecido para a confecção da nossa lâmina, a coleta foi feita com o animal morto, o qual estava fixado em formol para evitar o processo de autólise.

É fundamental que, imediatamente após a remoção do organismo, as peças sejam imersas em líquido fixador para que o processo de autólise (morte tecidual) seja interrompido e as estruturas biológicas se mantenham praticamente intactas. No caso de peças cirúrgicas grandes, recomenda-se que sejam clivadas para que, com a espessura diminuída (preferencialmente de 2 a 6 mm), seja mais fácil a penetração do fixador (MICHALANY, 1990). Após a coleta, o material deverá ser registrado e identificado por número próprio, além de passar por um exame macroscópico, descrevendo cor, tamanho, peso e aparência do órgão analisado. No caso de diagnóstico patológico, este registro deve vir acompanhado de uma ficha técnica com identificação do órgão e as datas de fixação e da entrada do material no laboratório, e informações do paciente (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

O manuseio das peças deve ser feito com delicadeza, devido à fragilidade dos tecidos. Uma pressão exagerada ou mesmo o uso de instrumentos inadequados, além de dificultar o exame histopatológico, pode alterar o tecido de tal maneira que possa simular uma lesão. Um exemplo que se pode citar é uma agressão no tecido conjuntivo fibroso, geralmente provocado por pinças com “dentes”, que se assemelha a uma lesão patológica de necrose fibrinoide (MICHALANY, 1990).

A fixação é a fase destinada a interromper o processo de autólise pelo qual qualquer tecido passa ao ser retirado do organismo ou após a sua morte (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Quando o tecido deixa de ser oxigenado, moléculas de dióxido de carbono começam a se acumular, fazendo com que enzimas lisossomais atuem sobre as próprias células. Para que esse fenômeno não ocorra e seja possível analisar-se os tecidos com seu aspecto original (ou pelo menos próximo a isso), faz-se necessário o processo de fixação. Além de interromper o metabolismo celular, conservando o aspecto natural dos tecidos, a fixação estabiliza as estruturas bioquímicas intra e extracelulares, permite a penetração de outros reagentes necessários no decorrer de todo o processamento histológico (como os agentes de coloração, por exemplo), impede que o tecido seja colonizado por micro-organismos e faz com que a amostra comece a endurecer (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010, AARESTRUP, 2012).

Os mecanismos e princípios pelos quais os diferentes tipos de fixadores agem são muito diversos. A fixação pode se dar por agentes físicos (frio e calor) ou químicos (líquidos fixadores), e, muito frequentemente, com associação dos dois tipos, pois uma fixação química pode sofrer influência de fatores físicos, como a temperatura do ambiente e ondas eletromagnéticas, por exemplo (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010; SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013).

A fixação química é a mais utilizada no processamento de tecidos para diagnósticos histopatológicos, sendo a possibilidade de se corar em HE um fator determinante para a escolha do líquido fixador (SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013).

Embora cada fixador tenha suas vantagens, há também desvantagens, como a perda molecular, inchaço ou retração dos tecidos, variação na qualidade de colorações histoquímicas e imunoistoquímicas, interferência na análise bioquímica, entre outros fatores (SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013). O ideal seria que o fixador tivesse rápido poder de penetração, baixo potencial de modificação dos tecidos, preservação das estruturas bioquímicas e que possibilitasse qualquer método de coloração. Sendo inviável que ocorra dessa forma, é

fundamental que se tenha conhecimento sobre os diversos tipos de fixadores para escolher o mais apropriado de acordo com o que se deseja analisar (MICHALANY, 1990).

Mais comumente utilizada, a fixação química tem seus agentes fixadores divididos em duas categorias: os fixadores coagulantes – que não se ligam às proteínas dos tecidos – e os não coagulantes, que se ligam e precipitam as proteínas (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). No caso dos fixadores coagulantes, quando se mergulha o tecido na solução, pode-se observar rapidamente a modificação de seus aspectos externos, como coloração e opacidade.

Isto se dá pela coagulação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, entre outras substâncias presentes nos tecidos. De ação inicial na superfície da amostra, o líquido fixador atinge seu interior por apresentar propriedade de penetração (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Os fixadores podem ser misturas que reúnem vários tipos de substâncias visando abater as desvantagens de um agente químico pelas vantagens de outro (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Os reagentes mais utilizados nos fixadores não coagulantes (que precipitam as proteínas) são o cloreto de mercúrio e o ácido pícrico. Já os fixadores coagulantes mais utilizados são o formaldeído (conhecido como fixador universal), teróxido de ósmio e o glutaraldeído (SOUZA JUNIOR, 2010). Porém, há vários outros tipos de fixadores empregados na técnica histológica e são classificados, segundo Leong (1996), da seguinte forma:

- Fixadores aldeídos: formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído comercial;
- Agentes oxidantes: teróxido de ósmio, dicromato de potássio, permanganato de potássio e ácido crômico;
- Agentes desnaturantes ou coagulantes de proteínas: metanol, etanol, acetona e ácido acético;
- Mecanismo desconhecido: cloreto de mercúrio, ácido pícrico e sais de zinco;
- Combinação de reagentes: tetróxido de ósmio e glutaraldeído, tetróxido de ósmio e iodeto de zinco, glutaraldeído e carbodiamida, formaldeído e glutaraldeído.

A boa fixação de um tecido depende dos seguintes fatores: temperatura, espessura do tecido, penetração, tempo de fixação, escolha do fixador, relação do volume fixador/tamanho do espécime, estocagem apropriada, pH do fixador, osmolaridade da solução fixadora, adição de sais na mistura e concentração dos fixadores.

O tempo de fixação de cada agente fixador depende da temperatura, que, quando elevada, faz com que a penetração do fixador no tecido seja mais rápida.

Todavia, uma penetração muito rápida pode retrair bruscamente o tecido, gerando artefatos posteriores, além de poder comprometer a qualidade das colorações.

Ademais, certos tecidos necessitam de uma penetração lenta para melhor preservar suas estruturas. Nesses casos, aconselha-se que a fixação seja realizada sob resfriamento de 0°C a 6°C (SOUZA JUNIOR, 2010; PINTO, 2010).

Assim como a falta de fixação, o excesso de tempo destinado à fixação pode ser prejudicial à observação do tecido, podendo produzir artefatos como retração nuclear e perda de definição de detalhes celulares. A exposição prolongada a aldeídos, por exemplo, pode inibir severamente a atividade enzimática, enquanto os fixadores oxidativos promovem a degradação dos tecidos por clivagem oxidativa de proteínas e perda de peptídeos (PINTO, 2010).

Novamente destaca-se que, após a obtenção das amostras, as mesmas sejam reduzidas a uma espessura máxima de 6 mm, pois, do contrário, não haverá boa penetração pelo fixador; quanto mais delgada a clivagem da peça, mais rápida e eficiente será a fixação (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Além do tempo de fixação, a quantidade de líquido deve ser observada.

Segundo Michalany (1990), o volume do fixador deve ser, no mínimo, 20 vezes maior que o volume da peça. Porém, atualmente há autores que defendam a boa ação fixadora em um volume de fixador 10 vezes maior que o da peça (PINTO, 2010; AARESTRUP, 2012). Uma quantidade insuficiente de fixador faz com que a penetração seja insuficiente, tornando a fixação inadequada, por autólise parcial ou total da amostra (MICHALANY, 1990).

A penetração do fixador também depende do seu contato com a peça. Portanto, é importante estar atento às características do recipiente que contém as peças. Um recipiente muito pequeno pode fazer com que a peça se dobre, resultando num aumento de espessura e consequente má penetração pelo fixador. Além disso, como a peça endurece durante a fixação, após esse processo o tecido pode adquirir o formato do recipiente, dificultando ou impedindo o processamento (MICHALANY, 1990).

Quando retirados do organismo, os tecidos liberam um líquido albuminoso em sua superfície. Sendo assim, aconselha-se agitar o recipiente para que o fixador esteja sempre em contato com a superfície da peça.

Ainda, é importante observar o pH do fixador, que deve estar entre 6,0 e 7,0; tal cuidado se justifica pois, durante a autólise, ocorrem modificações no pH que podem alterar a afinidade aos corantes e, conseqüentemente, produzir artefatos.

Um bom fixador é aquele que possui boa capacidade tampão e que seja capaz de estabilizar a solução (MICHALANY, 1990; SOUZA JUNIOR, 2010; PINTO, 2010).

A clivagem é o processo que tem como objetivo diminuir o tamanho do material a ser analisado com a finalidade de facilitar a penetração do fixador em menor tempo evitando o processo de autólise. O corte desse material determina como o material será incluso no bloco para serem cortados no micrótomo, após a clivagem o material deve ser devidamente identificados. (UFP, 2021).

Por padrão os fragmentos teciduais devem ter 3mm de espessura, mas em alguns casos o fragmento pode chegar a 5mm. (CAPUTTO; GITIRANA; MANSO,2010)

Os cuidados com o instrumental e o manuseio das peças, pois como o meio mais comum utilizado é o bisturi cirúrgico ou gilette, o corte deve ser feito em um único golpe e com o movimento iniciando a partir do cabo para ponta da lamina, para que obtenham fragmentos planos e paralelos. (CAPUTTO; GITIRANA; MANSO,2010)

Importante ressaltar que não se deve pressionar o material fixado com pinça ou qualquer outro instrumental utilizado para que não cause distorção da estrutura tecidual. (CAPUTTO; GITIRANA; MANSO,2010).

Para que substâncias tal como a parafina, possam penetrar no tecido no momento da infiltração seu conteúdo em água deve ser removido. A desidratação é levada a efeito, imergindo o bloco de tecido em concentrações crescentes de álcool etílico. (PORTAL EDUCAÇÃO, 2022)

O álcool é o agente mais comumente utilizado neste processo, sendo empregado numa série crescente (70% - 80% - 90% - 100%) para se evitar a retração pronunciada do tecido ocasionando lesões estruturais da célula de caráter irreversível. O álcool tem a vantagem de endurecer mais o tecido. O volume de álcool deverá ser 10 a 20 vezes maior que o volume da peça. A eficiência da desidratação depende da relação entre a quantidade de álcool e o número de banhos empregados que devem ser suficientes. (PORTAL EDUCAÇÃO, 2022)

Os álcoois etílico, butílico, metílico e isopropílico, a acetona, o éter, o clorofórmio ou o óxido propileno são exemplos de substâncias que podem ser usadas como agentes desidratantes. O álcool etílico é o mais utilizado em técnica de rotina quando o processo está

finalizado no álcool 100 significa que toda a água foi retirada da célula, ficando no lugar da água o etanol, que mais à frente passará por um processo de diafanização ou clareamento.

(PORTAL EDUCAÇÃO, 2022)

A finalidade da diafanização ou clarificação é remover completamente o álcool do interior dos tecidos. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

A parafina não se mistura com água e nem com álcool, de modo que ambos devem ser completamente removidos para que a parafina possa penetrar eficientemente no tecido. O xilol é comumente utilizado para esta finalidade. Tal substância é muitas vezes chamada de agente clarificador, porque torna o tecido semitranslúcido, quase transparente.

A quantidade de xilol utilizada deve ser 10 a 20 vezes o volume da peça, e a duração da clarificação varia de acordo com as dimensões e a constituição do material, além da temperatura ambiente. (MIRANDA, 2017)

Nesse processo é recomendado o tecido passar mais de uma vez no diafanizador (xilol) para que obtenha um maior sucesso nesta etapa, o ideal é deixar o tecido por 1 hora em casa banho de Xilol. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004)

Por ser um agente químico volátil, o xilol deve ser manuseado em capela de segurança com eficiente sistema de aspiração e filtração do ar, utilizando, também, os EPIs adequados. (NASCIMENTO, 2007). São equipamentos de proteção individual de uso obrigatório, máscara respiratória modelo, PFF 2 ou N 95, luva de procedimento (látex), óculos de proteção ampla visão e jaleco de uso laboratorial (USP, 2019)

Sabe-se que os principais efeitos provocados pela inalação de vapores de xilol são dores de cabeça, vertigens, náuseas e vômitos, além de depressão do sistema nervoso central (NIOSH, 1981; ATSDR, 2005).

A infiltração dos elementos teciduais em parafina é importante, pois a parafina também é o meio de inclusão tecidual. Para a infiltração, a parafina deve ter sido previamente aquecida, pois ela é líquida somente em temperatura entre 56°C a 60°C, sendo sólida à temperatura ambiente. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

A impregnação deve ser realizada em estufa a 60°C. Os fragmentos serão transportados de uma parafina a outra em intervalos de tempo predeterminados. Não se deve realizar somente uma passagem pela parafina, pois será insuficiente para remover todo o xilol dos tecidos. Contudo, recomenda-se nunca deixar o material permanecer na parafina por muito tempo, pois

como a parafina somente é líquida em temperatura alta, o calor em um longo período de tempo poderá causar grande dano ao tecido. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

A inclusão se baseia em colocar, com o auxílio de uma pinça previamente aquecida, os tecidos que foram previamente infiltrados em parafina no interior de um molde que já contém parafina líquida com a superfície a ser seccionada (a ser cortada ao micrótomo) para baixo. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

Os fragmentos devem ser colocados na parafina enquanto aquecidos, evitando-se a formação de bolhas de ar em torno deles. Após o resfriamento, os blocos de parafina com o material incluído são obtidos. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

Para se realizar uma boa inclusão é necessário que o fragmento esteja completamente desidratado, clarificado e corretamente impregnado. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

Quando se observa que uma dessas etapas não foi corretamente efetuada (observando áreas opacas ou esbranquiçadas no material), deve-se, nesse caso, retroceder o processamento executando-o da seguinte forma:

- remover a parafina de infiltração com vários banhos do agente clarificador (xilol);
- após a completa remoção da parafina, proceder a remoção do xilol, passando o fragmento por várias trocas do agente desidratante (álcool), ou mesmo água, caso o tecido não tenha sido desidratado corretamente;
- em seguida, desidratar e clarificar novamente;
- infiltrar e incluir o material novamente em parafina.

É importante que logo após o término da infiltração seja efetuada a inclusão, evitando que o material se torne quebradiço e retraído pelo efeito da temperatura da parafina aquecida.

Procedimentos para inclusão:

- Abrir o cassete e verificar o número de fragmentos contidos no cassete;
- Selecionar o molde a ser utilizado de acordo com as dimensões dos fragmentos a serem incluídos de maneira a sobrar cerca de 2 mm de parafina nas margens do bloco;
- Preencher o molde com parafina líquida pré-aquecida;
- Com o auxílio de uma pinça, selecionar o fragmento, sem deixá-lo esfriar, e colocá-lo no molde preenchido previamente com parafina;

- Colocar a base do cassete, ou suportes, sobre o molde de maneira que a parafina entre em contato com o cassete. Se para a inclusão não se utilizar o cassete, deve-se utilizar um papel para escrever a identificação do bloco.
- Levar o molde com o material incluído para a placa resfriada.
- Quando o molde começar a suar, é o momento certo de retirar o bloco do molde. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Para que seja possível analisar um tecido em microscópio óptico, é necessário que esteja disposta a lâmina uma seção bem fina do tecido. Rotineiramente, nos laboratórios recomenda-se a espessura de 4 a 6 micrômetros, que é a espessura ideal para a passagem de luz e evidênciação do tecido em microscópio (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

O equipamento utilizado para a obtenção dos cortes é o micrótomo, composto por três peças principais: o corpo, o porta-bloco e o porta-objeto, além da navalha. Há vários tipos de micrótomo, como o criostato, o micrótomo de congelação, o ultra micrótomo, o do tipo serra e o vibratório. Porém, os mais utilizados na técnica histológica de rotina são o micrótomo rotatório em que a navalha é fixa e o porta-objeto vai ao seu encontro e o micrótomo do tipo corredeira, no qual a navalha que se move em direção ao porta-objeto, ambos encontrados em modelos manuais, automáticos ou semiautomáticos (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Fundamentais para a execução dos cortes são as navalhas, que podem ser de diversos tipos, utilizadas de acordo com a especificidade do material a ser secionado quanto à sua dureza, ao substrato no qual está incluído e ao tipo de micrótomo no qual será acoplada, por exemplo. As navalhas de aço são tradicionalmente utilizadas em microtomia de material incluído em parafina, e não devem conter impurezas nem substâncias anticorrosivas. Demandam um cuidado maior quanto à qualidade do fio de corte, sendo necessária a utilização de equipamentos afiadores que são muito caros. Já as navalhas descartáveis, confeccionadas em platina ou em material cromado, possibilitam o uso continuado com o fio de corte bastante afiado. Produzem cortes sequenciais, chamados cortes em fita, e de alta qualidade (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Com o bloco resfriado fixo no micrótomo por um mandril, faz-se o procedimento de corte, de acordo com o aparelho de microtomia utilizado. As fitas que vão sendo produzidas devem ser levadas, com o auxílio de uma pinça e com delicadeza, ao banho-maria à temperatura aproximada de 40°C para que elas se distendam sobre a água, evitando a formação de dobras. Com os cortes devidamente prontos, faz-se sua pesca com lâminas previamente limpas e

identificadas que, dali, serão encaminhadas à estufa à 60o (MICHALANY, 1990; SOUZA JUNIOR, 2010).

Antes de realizar a microtomia, deve-se fazer a limpeza das lâminas onde serão colocados os cortes. Geralmente submerge-se as lâminas em solução de detergente alcalino seguido de lavagem em água corrente, banho em álcool 100% e secagem com papel toalha ou flanela própria (USP, 2002). Após a limpeza, é imprescindível a identificação das lâminas com o número de registro correspondente ao bloco, que pode ser feita com marcações a lápis de diamante (marcação permanente), lápis demográfico ou etiquetas próprias. E para evitar que os cortes se desprendam das lâminas durante o processo de coloração, é comum a utilização de adesivos, sendo os mais utilizados a albumina de Mayer, a gelatina e celoidina (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

É necessário ter atenção e cuidado para possíveis erros no momento da microtomia, o surgimento de artefatos no corte pode ser devido ao estado inadequado da navalha ou a problemas ocorridos durante etapas anteriores, no processamento. Por exemplo, fitas de cortes curvas ou irregulares podem surgir quando a navalha e o bloco não estão paralelos, ou porque a borda de corte da navalha estava irregular, ou porque na impregnação a parafina estava impura ou não misturada homogeneamente. Quando há formação de cortes comprimidos ou pregueados, é porque a navalha não estava bem afiada, o bloco ou a navalha estavam quentes, ou ainda porque o parafuso do micrótomo estava solto. Cortes fragmentados ou rasgados surgem quando houve contato com parafina muito quente durante a impregnação ou inclusão, e quando o tecido se separa do bloco de parafina é pelas seguintes razões: o álcool ou o diafanizador não foram completamente removidos. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010)

O passo seguinte é a montagem da lâmina na qual, as fitas obtidas a partir do micrótomo são transferidas para um banho-maria, com o auxílio de uma pinça, para serem distendidas. A água deve estar entre 3° e 8° abaixo do ponto de fusão da parafina utilizada. Nesta etapa, são retiradas as dobras e evitadas as bolhas abaixo da fita. Após a distensão, os cortes são separados individualmente ou em grupos, conforme a conveniência, utilizando-se lâminas de vidro previamente limpas com detergente, estocadas em álcool 80% e previamente secas. Antes da utilização das lâminas, é necessário revestir suas superfícies com uma fina camada de albumina para facilitar a adesão da peça. Os cortes obtidos podem ser transferidos, inicialmente, para uma estufa onde ficam alguns minutos (não mais que dez minutos) para posteriormente serem colocados em um suporte inclinado. Finalmente, os cortes devem ser

depositados em uma estufa a 60° para secagem entre uma e 24 horas. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

A utilização de corantes é fundamental para visualizar os tecidos ao microscópio de luz. Após a microtomia, as células e o material extracelular são habitualmente transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas teciduais. Para realizar o processo de coloração do objeto histológico, utiliza-se os corantes não vitais, como a hematoxilina e a eosina.

Para descobrir se tal objeto é ácido usa-se o corante de hematoxilina, pois tem caráter básico, que quando entra em contato com o material, deixa-o com uma coloração azulada, adquirindo a denominação de basófila. Já quando se trata de um material de natureza básica, utiliza-se o corante de Eosina, pois possui caráter ácido, deixando o material histológico com uma cor avermelhada, recebendo o nome de acidófilas. O tecido da lâmina produzida por nós foi corado com HE. (JUNQUEIRA C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos, 1983.)

A segunda etapa do projeto consistiu na coloração lâminas usando a técnica Tricrômico de Masson. O Masson é um tricrômico, ou seja, as estruturas são demonstradas em três cores: núcleos em roxo (hematoxilina); citoplasma em vermelho (fucsina ácida) e colágeno em azul (azul de anilina). (ANATPAT, UNICAMP, 2022). A técnica é dividida em etapas assim como outras colorações, as quais são executadas por meio de um protocolo, podendo conter variações de um laboratório para outro.

Algumas soluções utilizadas no processo de coloração precisam ser preparadas anteriormente como a hematoxilina férrica A e B, azul de anilina e a solução ácida fosfotúngstica-fosfomolíbica:

Hematoxilina férrica de weigert:

- Solução A:
- Hematoxilina pó, 1 g;
- Álcool 95%, 100 ml.
- Solução B:
- Solução aquosa de Cloreto Férrico a 29%, 4 ml;
- Água destilada, 95 ml;
- Ácido Clorídrico Concentrado, 1 ml.

- Solução de trabalho: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B. (VÊNANCIO; ANATPAT, UNICAMP, 2011).

Solução de azul de anilina:

- Azul de Anilina, 2,5 g;
- Ácido Acético Glacial, 2 ml;
- Água destilada, 100 ml. (VÊNANCIO; ANATPAT, UNICAMP, 2011).

Solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica:

- Ácido Fosfotúngstico, 2,5 g;
- Ácido Fosfomolibdico, 2,5 g;
- Água destilada, 100 ml. (VÊNANCIO; ANATPAT, UNICAMP, 2011).

Após todas as soluções estarem prontas juntamente com as lâminas montadas é hora de realizar a coloração em si, o protocolo utilizado foi:

- Xilol 1 – 10 minutos;
- Xilol 2 – 5 minutos;
- Álcool 100 % - 5 minutos;
- Álcool 95 % - 5 minutos;
- Água destilada – 5 minutos;
- Hematoxilina Férrica – 5 minutos;
- Água destilada – 5 minutos;
- Fucsina ácida – 5 minutos;
- Água destilada – 5 minutos;
- Solução fosfotúngstica-fosfomolibdica -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;

Cada substância a qual as lâminas são submetidas tem uma função específica sobre o tecido, o xilol por exemplo serve para a desparafinização do tecido, já a hematoxilina férrica, a fucsina ácida e o azul de anilina, são os corantes utilizados nessa técnica e iram cada um deles corar uma estrutura como já dito acima e a água destilada retira o excesso das substâncias.

Algumas fotos do processo:



O processo de selagem ou montagem da lâmina é a etapa final da preparação da lâmina para análise ao microscópio de luz. Essa etapa consiste em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula (geralmente utiliza-se cola).

Existem dois meios de selagem, os permanentes e os provisórios. Os meios permanentes são meios resinosos e hidrofóbicos, sendo necessária a completa remoção da água do interior dos tecidos pela desidratação e pela clarificação com o diluente do meio de selagem. Os meios provisórios são meios hidrofílicos e não necessitam da remoção da água dos tecidos, sendo os preparados descartados após a observação ao microscópio. (MICHALANY, J. Técnica histológica em anatomia patológica. 3. ed. São Paulo: Michelany, 1981.)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após todas as etapas do processo serem devidamente realizadas, foi possível analisar o resultado das lâminas produzidas com duas diferentes técnicas de coloração, hematoxilina-eosina e tricrômio de masson, observando as diferenças em cada uma delas e suas principais utilizações.

A primeira lâmina apresentava pele de rato e foi corada com HE, qual é possível identificar as partes basófilas e acidófilas do tecido. Já a segunda lâmina foi corada com a técnica do tricrômio de masson, essa técnica cora em 3 cores diferentes estruturas do tecido núcleos em roxo, citoplasma em vermelho e colágeno em azul, o tecido corado nesta lâmina foram traqueia e esôfago.

Na lâmina corada por HE pudemos visualizar as principais características do tecido em questão: células do tecido epitelial estratificado pavimentoso; a camada de queratina na parte superior e as camadas de diferentes tecidos conjuntivos abaixo.

Na lâmina de traqueia e esôfago corada pelo tricrômio de masson, é possível observar a mucosa (epitélio de revestimento) do esôfago, cartilagem da traqueia, epitélio de revestimento da traqueia (pseudoestratificado ciliado)

O resultado final apresenta uma lâmina bem feita, onde é possível identificar as estruturas do tecido, entretanto é possível visualizar algumas sujeiras na imagem podendo ser da própria lâmina ou do aparelho microscópio utilizado. A seguir imagens que comprovam os resultados obtidos:

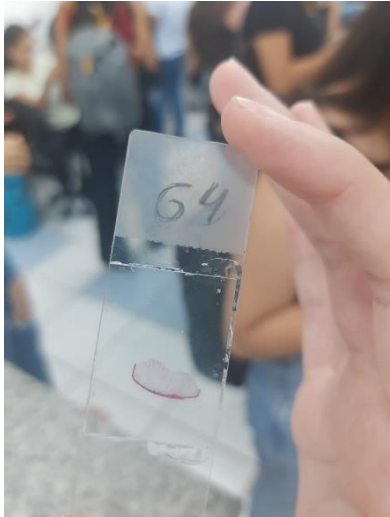


Foto 1: Imagem feita no laboratório da lâmina de pele de rato finalizada.

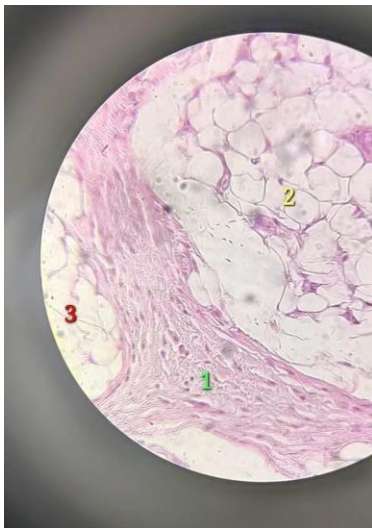


Foto 2: Tecido de pele fina do rato, aumento na objetiva de 40x, corado em HE. 1 - Tecido pavimentoso estratificado queratinizado; 2 - Tecido adiposo unilocular; 3 - Camada de queratina.

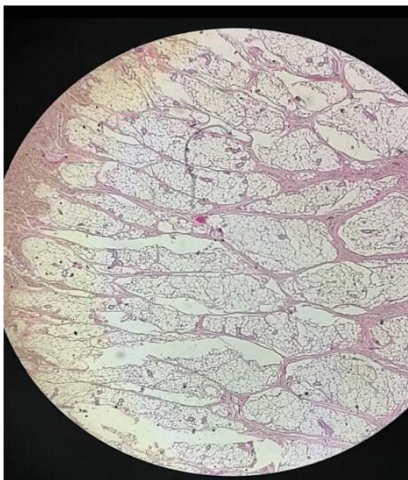


Foto 3: Lâmina na objetiva de menor aumento.

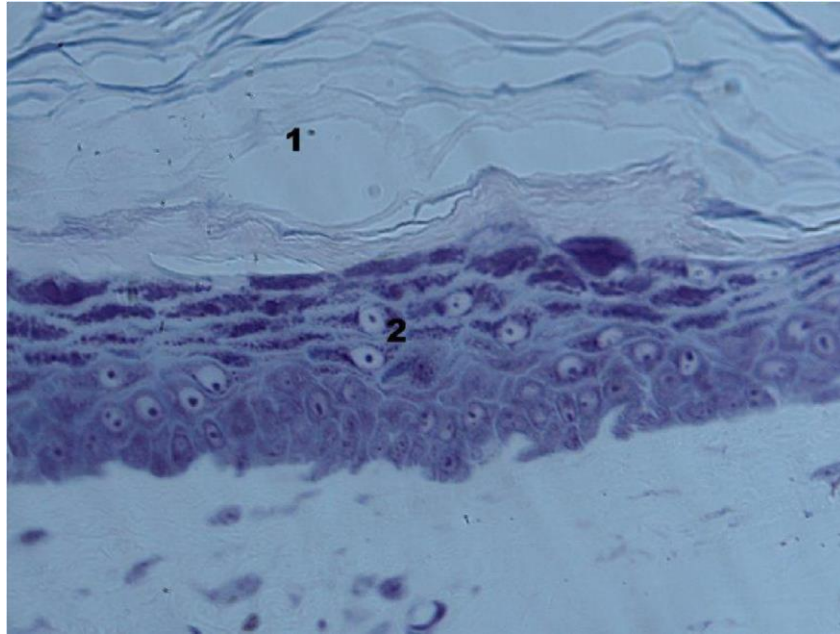


Foto 4: Lâmina de pele fina de rato produzida pela UNIFAL, utilizada para a comparação e identificação de estruturas (aumento 40x, corada em Azul de Toluidina). Fonte: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-fina/>

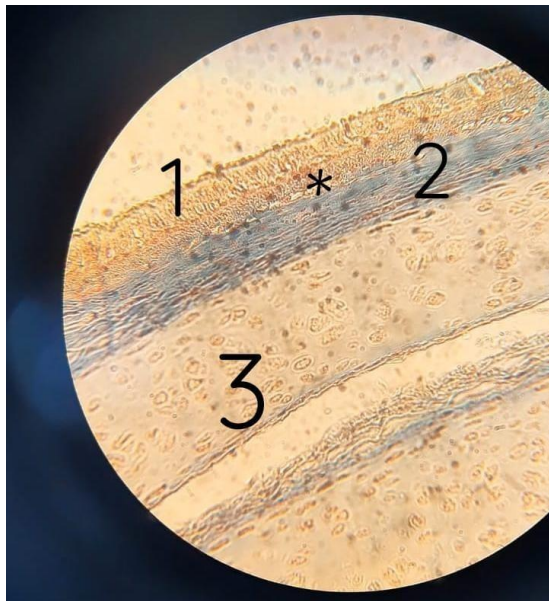


Foto 5: Lâmina de traqueia corada em tricrômio de masson. 1 - Tecido epitelial de revestimento colunar pseudoestratificado ciliado; 2- tecido conjuntivo frouxo; 3 - cartilagem hialina *lâmina basal



Foto 6: Lâmina de esôfago e traqueia corada em tricrômio de masson. * - Cartilagem hialina da traqueia; Em azul a mucosa do esôfago (epitélio de revestimento); em verde a submucosa; em vermelho camada muscular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E AGRADECIMENTOS

Ao final de todo o processo foi possível compreender as etapas para a confecção de lâminas histológicas, por meio das aulas práticas e estudos através de livros e artigos sobre o tema, observando possíveis erros que alteram o resultado esperado e impossibilitam o estudo do tecido e como evita-los, buscando assim a excelência na execução das histotécnicas. Agradecimentos ao professor Amilton Santos que orquestrou todo o projeto de histotécnicas e nos conduziu até o caminho da ciência e o Ricardo responsável pelo laboratório do campos, que nos passou toda a sua bagagem de conhecimentos práticos para a confecção das lâminas.

REFERÊNCIAS

- JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José; ABRAHAMSOHN, Paulo.
Histologia básica: texto e atlas. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- GARTNER, Leslie P; **Tratado de Histologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- ESPÍRITO SANTO. Secretaria de Estado da Saúde. Laboratório Central de Saúde Pública.
Manual de procedimentos técnicos para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas. Vitória (ES) 2017. Disponível em: <

<https://saude.es.gov.br/Media/sesa/LACEN/Manuais/MAN.NQ01.002%20%20REV%200920%20MANUAL%20DE%20PROCEDIMENTOS%20TECNICOS%20PARA%20COLETA,%20ACONDICIONAMENTO%20E%20TRANSPORTE%20DE%20AB.pdf> >.

Acesso em:13/03/2022.

PREPARAÇÃO DE LÂMINA HISTÓLOGICA: DESIDRATAÇÃO. Portal

Educação. Disponível em: <

<https://siteantigo.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/biologia/preparacao-de-laminahistologica-desidracao/31095>>. Acesso em: 29/04/2022.

SANTOS, Vitoria. **Manual da Técnica Histológica de Rotina e de Coloração.**

Universidade Federal de Pernambuco,2021.

MIRANDA, Gesiana. **“Bem Vindo Ao Portal Do CENBAM E PPBio Amazônia Ocidental!**

Disponível em: <Ppbio.inpa.gov.br/Inicio>. Acesso em: 29/04/2022

SILVA, Márcia Do Nascimento, et al. **“Avaliação Dos Riscos Associados Ao Uso Do Xilol Em Laboratórios de Anatomia Patológica E Citologia * Assessing Risks Concerning the Use of Xylol in Cytology and Patho Logy Laboratories.”** Rev. Bras. Saúde Ocup, vol. 32, no. 116, 2007, pp. 50–56.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. de B.; MANSO, P. P. de A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde.** Rio de Janeiro: EPSJV; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010. p. 89-188.

COSTA, K. N. S. dá; PINHEIRO, I. O.; CALAZANS, G. T.; NASCIMENTO, M. S.

do. **Avaliação dos riscos associados ao uso de xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia.** Rev. bras. Saúde ocup, São Paulo, v. 32, n. 116, p. 50-56, 2007.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico.** 2. ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.

JUNQUEIRA C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia.** São Paulo: Santos, 1983.

MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica.** 3. ed. São Paulo: Michelany, 1981.

PELE FINA. **Histologia interativa – Universidade Federal de Alfenas.** Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/pele-fina/>>. Acesso em: 29/04/2022

MALFORMAÇÃO ARTERIO – VENOSA (MAV). 2. COLORAÇÕES ESPECIAIS:
TRICRÔMIO DE MASSON, VERHOEFF. **Anatomia Patológica, Neuropatologia e Neuroimagem –UNICAMP.** Disponível em: <https://anatpat.unicamp.br/nptmav2b.html>.
Acesso em: 22/05/2022

VÊNANCIO, Ismael. **Técnicas histológicas empregadas no departamento de anatomia patológica – FCM – UNICAMP.** Disponível em:
<https://anatpat.unicamp.br/tecnicashistologicas.html#t8>. Acesso em:22/05/2022