

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, FIXAÇÃO E PREPARO
PARA ANÁLISES DE MATERIAIS BIOLÓGICOS**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, FIXAÇÃO E PREPARO PARA ANÁLISES DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

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:

Alorrane Kaylane Porcino **DOS SANTOS**

Beatriz Suellen Gerts **ROQUE**

Danielle **CASSIANO**

Flávia de Godoi **MOREIRA**

Sophia Vicente **SULATO**

Tarcilla Vitória Bertholucci **LUCIANO**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

TÉCNICAS DE OBTENÇÃO, FIXAÇÃO E PREPARO PARA ANÁLISES DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Alorrane Kaylane Porcino **DOS SANTOS**¹; Beatriz Suellen Gerts **ROQUE**¹; Danielle **CASSIANO**¹; Flávia de Godoi **MOREIRA**¹; Sophia Vicente **SULATO**¹; Tarcilla Vitória Bertholucci **LUCIANO**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

UNIFEQB

INTRODUÇÃO

Histologia é o estudo das células e dos tecidos do corpo e de como essas estruturas se organizam para constituir os órgãos. Em razão das pequenas dimensões das células, seu estudo é realizado com auxílio de microscópios. Neste capítulo, esses instrumentos serão apresentados, e também serão abordadas algumas maneiras usadas para preparar as células, os tecidos e os órgãos para análise microscópica. Além disso, serão descritas algumas das metodologias mais utilizadas para investigar a função e o metabolismo dessas estruturas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta

É a primeira etapa e consiste na retirada de uma amostra de tecido para a investigação, chamadas de biópsias (ABRAHAMSOHN, 2016).

Fixação

Na fixação química, os tecidos são imersos em soluções de agentes desnaturantes ou de agentes que estabilizam as moléculas ao formar pontes com moléculas adjacentes. Um dos fixadores mais usados para microscopia de luz é uma solução de formaldeído a 4%; outro fixador bastante utilizado é o glutaraldeído (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Clivagem

O processo de clivagem é utilizado para reduzir o tamanho das peças, facilitando a penetração da substância fixadora em curto período de tempo.

A orientação do corte das peças é essencial, pois assim determina como os tecidos serão incluídos no bloco para corte e melhor visão para a análise. As peças são cortadas em um padrão de 3 mm podendo chegar a 5 mm dependendo do cã. (AARESTRUP, 2012).

Nas peças sólidas o corte terá que ser de maior diâmetro e suas faces devem ser planas e paralelas. As seções das peças são realizadas com lâmina de aço cortante afiada (bisturi cirúrgico ou gilete); o corte deve ser feito em somente uma vez, com movimento inicial do cabo para a ponta da lâmina. Com o uso do bisturi cirúrgico tem o resultado de fragmentos planos e paralelos. (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Importante lembrar de não usar pinça ou outros instrumentos para pressionar o material fixado para não ocorrer distorção da estrutura tecidual (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Desidratação

Consiste na remoção da água dos tecidos. Vários métodos são utilizados, porém o mais comum compreende uma série de soluções alcoólicas em concentrações diferentes, chegando até o álcool 100% (ABRAHAMSOHN, 2016).

Diafanização

Essa etapa remove totalmente o álcool, preparando o espécime para a etapa seguinte. Para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina, utiliza-se o xilol. Conforme o xilol penetra o tecido, em substituição ao álcool, o material se torna mais claro e transparente. Por essa razão, é denominada de clarificação (ABRAHAMSOHN, 2016).

Inclusão

Devem ser infiltrados com substâncias que lhes proporcionem uma consistência rígida. As substâncias mais utilizadas para esse fim são a parafina e algumas resinas de plástico. A parafina é habitualmente utilizada para microscopia de luz, e as resinas, para microscopia de luz e eletrônica (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Impregnação

O processo de impregnar os tecidos com parafina é chamado inclusão ou embebição em parafina e geralmente é precedido por duas etapas: desidratação e clareamento.

Nessa etapa, as peças são infiltradas por alguma substância de consistência firme para que adquiram rigidez suficiente e seja possível a realização de cortes finos. São vários os materiais utilizados para esse fim, como parafina, resina, ágar, gelatina, parafina plástica, goma arábica, polietileno glicol, parafina esterificada e celoidina (SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013; SOUZA JUNIOR, 2010).

Microtomia

Depois de endurecido, o bloco de parafina deve ser cortado em seções extremamente finas, que permitam a visualização do tecido ao microscópio. Para isso, é utilizado o equipamento de precisão micrótomo, que alcança a espessura dos cortes de 5 a 15 µm (micrômetros) (ABRAHAMSOHN, 2016).

Coloração

Para ser estudada ao microscópio, a maioria dos cortes histológicos deve ser corada, porque, com poucas exceções, os tecidos são incolores. Os componentes dos tecidos que se coram bem com corantes básicos são chamados de basófilos, e os que têm grande afinidade com corantes ácidos, de acidófilos. O azul de toluidina e o azul de metileno são exemplos de corantes básicos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Os principais componentes dos tecidos que reagem com corantes básicos o fazem por conter ácidos na sua composição – ácidos nucleicos, glicosaminoglicanos e glicoproteínas ácidas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Montagem

O material a observar é colocado entre a lâmina e a lamínula: segurando a lamínula, com a ajuda de uma agulha de dissecação, de modo a que ela faça um ângulo de 45° com a lâmina, deixa-se cair lentamente (TORRÃO, 2022).

Este processo consiste em depositar uma ou duas gotas de resina líquida sobre o corte que está aderido à lâmina de vidro e cobri-lo com a lamínula. Nesta etapa deve-se evitar as bolhas de ar que se formam na resina durante a colocação da lâmina (TIMM, 1996).

Sequência da montagem:

Pingar 2 gotas de resina líquida (Bálsamo do Canadá);

Colocar a lamínula sobre a lâmina;

Pressionar levemente para tirar as bolhas;

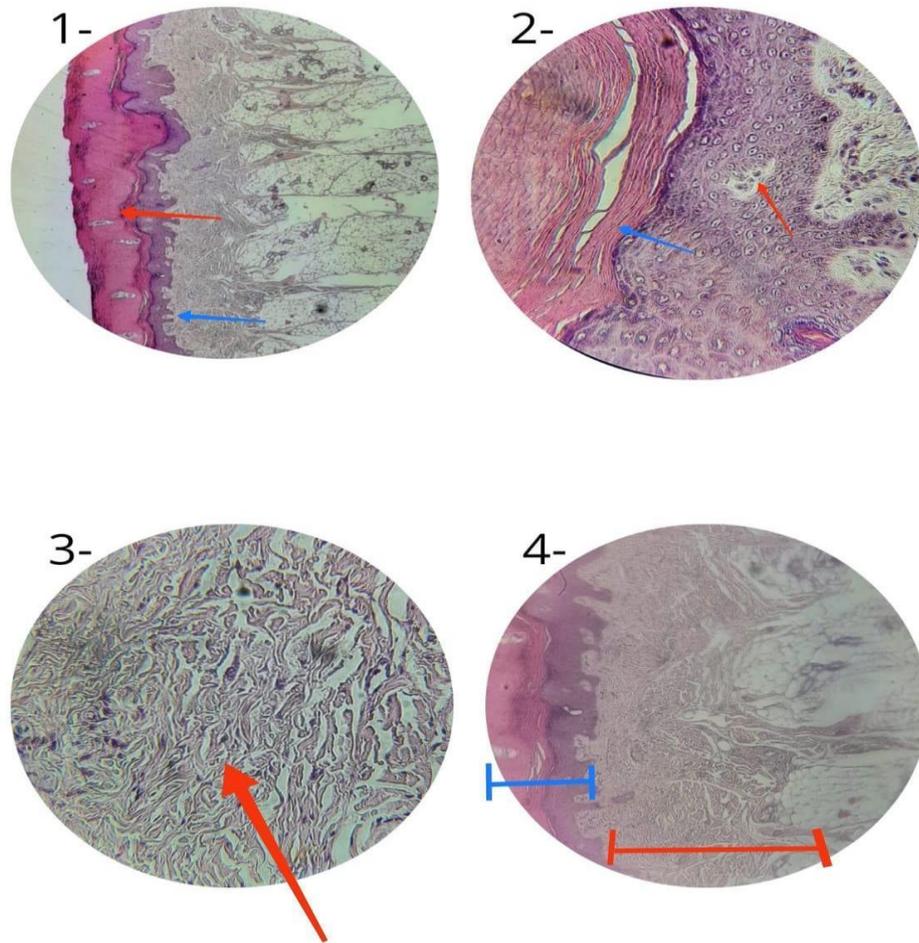
Levar as lâminas até a estufa para secagem ou deixar secando ao ar livre;

Após a secagem, as lâminas podem ser observadas ao microscópio de luz.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi feito para análise histológica uma lâmina de pele fina com queratina com os métodos citados anteriormente, o resultado foi satisfatório pode-se observar claramente no microscópio as camadas e características do tecido epitelial e do conjuntivo, e com isto podemos nos aprofundar no conhecimento de cada tecido e de técnicas histológicas preparando lâminas e observando-as no microscópio. No livro de histologia básica de Junqueira e Carneiro no capítulo 4 na página 75 figura 4.19 observa-se que o nosso resultado foi semelhante ao deles do tecido epitelial da imagem 1 e 2, no capítulo 5 página 102, na figura 5.20 é semelhante a imagem 3 e no mesmo capítulo na página 112 figura 5.37 também vemos semelhança a imagem 4.



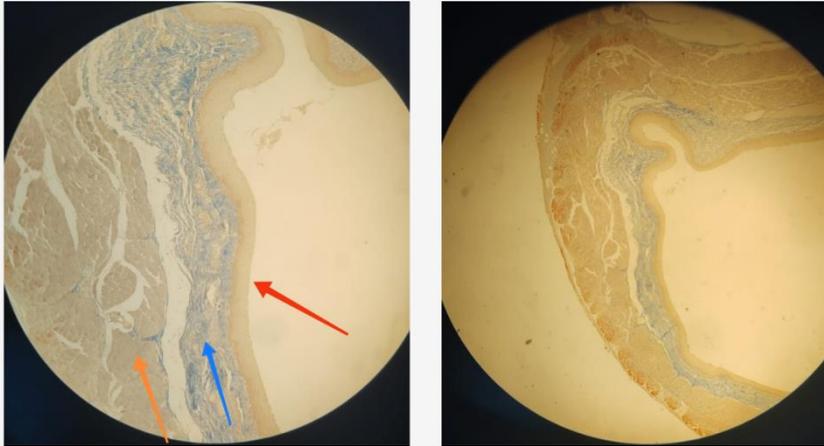
Na imagem 1 podemos ver na lente de 4x apontada pela seta vermelha a camada de queratina com folículos, e logo abaixo apontado pela seta azul podemos ver a camada de células que formam o epitélio. E vemos também as fibras que ficam abaixo do epitélio.

Na imagem 2 podemos ver na lente de 40x mais claramente a camada de queratina e as células abaixo dela vendo mais claramente uma característica delas, quanto mais perto da camada de queratina elas estão mais achatadas são e quanto mais afastadas são cubóides.

Na imagem 3 podemos ver na lente de 40x as fibras colágenas que ficam logo abaixo do epitélio mais de perto elas apresentam núcleos de fibroblastos que são os pontos roxos escuros.

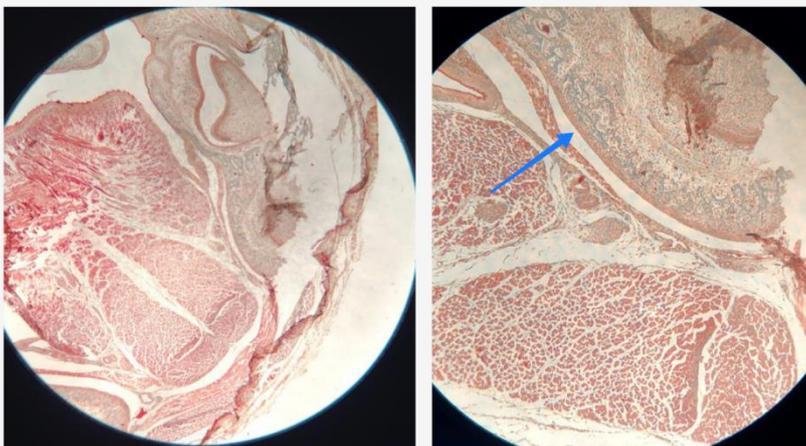
Na imagem 4 podemos ver na lente de 10x a divisão entre epiderme e derme, em azul sendo classificado o tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado (epiderme), e em vermelho o tecido conjuntivo denso não modelado (derme).

1° Lâmina



Nesta imagem da lâmina de esôfago podemos observar bem a coloração de Tricrômico de Masson, apontada pela seta vermelha vemos a mucosa, pela seta azul vemos a submucosa com fibras colágenas que foram coradas de azul e pela seta laranja vemos a camada muscular.

2° Lâmina



Nesta imagem da lâmina de crânio de rato a coloração de Tricrômico de Masson ficou pouco evidente pela falta de fibras, mas ainda é possível observar uma leve coloração azul onde a seta está indicando.

Foram feitas mais duas lâminas (crânio de rato e esôfago) com o mesmo método usado anteriormente mas desta vez usamos a coloração de Tricrômico de Masson (TM) que cora a queratina em vermelho, fibras musculares, colágeno e osso em azul, citoplasma em vermelho claro ou rosa e núcleos de células de marrom escura ou preto. Obtivemos um resultado satisfatório foi possível observar no microscópio a coloração correta das fibras e colágeno, na lâmina de esôfago o resultado é semelhante a figura 17.25 do capítulo 17 do livro de Histologia de Paulo Abrahamsohn e a coloração azul das fibras ficou mais evidente, na lâmina de crânio de rato vemos uma pequena semelhança com a figura 10.10, capítulo 10 do livro Histologia Essencial de Beatriz Julião Aarestrup, nesta lâmina a coloração das fibras ficou pouco evidente.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAHAMSOHN, P. **Histologia**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/>>

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica** – texto e atlas. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan, 2017. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/>>

AARESTRUP, B. J. **Histologia: essencial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 457p

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.

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

SUVARNA; LAYTON; BANCROFT, 2013; SOUZA JUNIOR, 2010. **Princípios do processamento histológico de rotina** pag:37

Disponível em: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/11/964830/2884-8890-1-sm.pdf>

Acesso em 25 Maio de 2022

TORRÃO, Ana Cristina M. Vieira. **Preparações temporárias – corantes e algumas técnicas de montagem.** Além das aulas, [s.d]. Disponível em:

<https://alemdasaulas.wordpress.com/2015/10/11/preparacoes-temporarias-corantes-e-algumas-tecnicas-de-montagem/>> Acesso em: 18 de março de 2022.

TIMM, LÍlian de L. Preliminary data on the pachyostosis in rib of the Trichechus inunguis Natterer, 1883 (Mammalia: Sirenia). In: Sessão da Academia Brasileira de Ciências, 1996a, **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** Porto Alegre: UFRGS/ILEA, 1996a. p.

296. Disponível em:

[http://docente.ifsc.edu.br/leandro.parussolo/MaterialDidatico/C%C3%A2mpus%20Lages/T%C3%A9cnico%20em%20An%C3%A1lises%20Qu%C3%ADmicas/Histofisiologia%20Animal/t%C3%A9cnicas%20histol%C3%B3gicas\(2\).pdf](http://docente.ifsc.edu.br/leandro.parussolo/MaterialDidatico/C%C3%A2mpus%20Lages/T%C3%A9cnico%20em%20An%C3%A1lises%20Qu%C3%ADmicas/Histofisiologia%20Animal/t%C3%A9cnicas%20histol%C3%B3gicas(2).pdf)>