

UNIFEOB  
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO OCTÁVIO  
BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR  
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA ESTUDO DE  
TECIDOS**

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 HISTOLÓGICAS PARA ESTUDO DE TECIDOS

### 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:

Gabriel **ROSALIN FELIPE**

Bianca Heloísa **DIAS RAMOS**

Isabela **VIGO CALIÓ**

Isabella **BUENO NÓBREGA**

Julia Beatriz **GONÇALVES DA SILVA**

Marina **MARCELO MACHADO**

Vinícius **DOS SANTOS DIOGO MORAES**

## **TÉCNICAS HISTOLÓGICAS PARA ESTUDO DE TECIDOS**

Bianca Heloísa **DIAS RAMOS**<sup>1</sup>; Gabriel **ROSALIN FELIPE**<sup>1</sup>; Isabella **BUENO NÓBREGA**<sup>1</sup>; Isabela **VIGO CALIÓ**<sup>1</sup>; Julia Beatriz **GONÇALVES DA SILVA**<sup>1</sup>; Marina **MARCELO MACHADO**<sup>1</sup>; Vinícius **DOS SANTOS DIOGO MORAES**<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  
Curso de Ciências Biológicas e Biomedicina Bacharelado

UNIFEOB

### **INTRODUÇÃO**

A histologia é baseada no estudo das células, carregando o objetivo essencial para estudo e pesquisa de conhecer os tipos de tecidos, entender as características, compreender as suas funções e identificar as especializações visualizadas no microscópio de luz ou óptico. Associada à química, biologia, fisiologia, imunologia e patologia, a histologia está diretamente relacionada a áreas de investigação de doenças e interações na saúde. É ideal conhecer as ferramentas necessárias, métodos de investigação e suas funções de maneira adequada para o uso prático da compreensão das estruturas, funcionamento das células, dos tecidos e dos órgãos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO,2017).

A preparação de cortes histológicos é o procedimento mais utilizado no estudo dos tecidos ao microscópio de luz. Nesse tipo de microscópio, a imagem é formada a partir de raios luminosos de um feixe de luz que atravessa uma estrutura. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). Porém, a grande espessura dos tecidos e órgãos não possibilita a passagem adequada de luz para uma imagem ser formada. Por isso, eles devem ser fatiados em secções, colocados sobre lâmina de vidro antes de serem examinados ao microscópio. Essas secções são obtidas através do micrótomo, mas para isso, os tecidos e órgãos precisam passar por vários tratamentos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Após a remoção do corpo, os tecidos e órgãos devem passar por um processo chamado de fixação, com os seguintes objetivos: evitar que as próprias enzimas presentes nas células ou bactérias digiram o tecido; endurecer os fragmentos; preservar amplamente a estrutura e a

composição molecular do tecido. A fixação pode ser realizada de duas maneiras: por métodos químicos ou por métodos físicos. Na fixação química, os tecidos são banhados em fixadores - soluções de agentes desnaturantes ou de agentes que estabilizem as moléculas. Como o fixador leva algum tempo para se difundir rapidamente no interior dos fragmentos, pedaços grandes devem ser cortados em pedaços menores antes da imersão no fixador. Deste modo, facilita-se a penetração do fixador no fragmento, garantindo a melhor preservação de sua estrutura. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Os fixadores mais usados para microscopia de luz são o formaldeído a 4% e o glutaraldeído. Devido à alta resolução fornecida pela microscopia eletrônica, é necessário mais cuidado durante a fixação para melhor preservar os detalhes ultraestruturais das células e da matriz. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Para obter cortes finos com o micrótomo, os fragmentos de tecidos e órgãos, após a fixação, devem ser infiltrados com substâncias que lhe proporcionem uma consistência rígida. As substâncias mais usadas são parafina e algumas resinas plásticas. A parafina é usada para microscopia de luz e às resinas para microscopia de luz e eletrônica. Geralmente, é feito em duas etapas: desidratação, onde a água contida nos tecidos é extraída pela passagem dos fragmentos por diversos banhos de soluções de concentrações crescentes de etanol (desde etanol 70% até etanol 100%). Após a desidratação, o etanol dos fragmentos deve ser substituído por uma substância intermediária (geralmente um solvente orgânico) que é miscível tanto em etanol, como no meio que foi escolhido para inclusão (parafina ou resina), como o xilol e o toluol. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Na segunda etapa, chamada clareamento, os fragmentos são embebidos no solvente, ficando transparentes ou translúcidos e em seguida são colocados em parafina derretida (56° a 60°C). O calor causa a evaporação do solvente orgânico, e os espaços existentes dentro dos tecidos são preenchidos com parafina. Depois de retirados da estufa a parafina solidifica, tornando rígidos. Por fim, são levados ao micrótomo, onde serão cortados por uma lâmina de aço ou vidro com espessura de 1 a 10 micrômetros e após isso os cortes são colocados para flutuar sobre uma superfície de água aquecida, e em sequência sobre lâminas de vidro, onde serão coradas. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A grande maioria dos tecidos são incolores, por conta disso, a coloração é essencial para tornar-se evidente os componentes dos tecidos. Muitos corantes se comportam como substâncias de caráter ácido ou básico. Os componentes de um tecido que se coram bem com

corantes básicos (Hematoxilina) são chamados de basófilos e os que se coram bem com corantes ácidos (Eosina) chamam-se acidófilos. Os principais componentes dos tecidos que têm caráter ácido e tem grande afinidade com corantes básicos são os ácidos nucleicos. Já os componentes básicos que tem grande afinidade com corantes ácidos são mitocôndrias, grânulos de secreção, proteínas citoplasmáticas e colágeno. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

A combinação de hematoxilina e a eosina (HE) é a mais usada. A hematoxilina cora em azul ou violeta o núcleo das células, rico em ácido desoxirribonucleico. Já a eosina, cora o citoplasma e o colágeno em cor-de-rosa. Outros corantes também são usados no lugar da HE, um dos exemplos são os tricrômicos (corantes de Mallory e o de Masson). A principal função dos tricrômicos é diferenciar o colágeno de um músculo liso. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O objetivo deste projeto é a produção de lâminas e materiais histológicos para estudo e pesquisa.

## DESENVOLVIMENTO

### MATERIAIS E MÉTODOS

Para realização do processo de técnicas histológicas foi necessária a utilização de formalina a 10%, água destilada, proveta, cassete histológico identificado, álcool (70%, 80%, 90% e 100%), xilol I e II, parafina, bisturi com lâmina 21, tesoura romba/romba (sem ponta), tesoura ponta fina, esquadro de Leuckart, micrótomo, navalhas e o material histológico que será analisado, que nesse caso foi um camundongo.



FIGURA 1. Materiais utilizados para fixação.

Primeiramente, para facilitar a organização dos procedimentos, separou-se os materiais em cima da bancada. Diante dos respectivos materiais, os métodos utilizados para a realização da lâmina foram em primeiro lugar, preparar uma solução de formalina a 10%, ou seja, utilizou-se nove partes de água destilada para uma parte de formol, com o objetivo de preservar o material histológico. Com os camundongos já fixados, com o auxílio do bisturi e da tesoura romba/romba, iniciou-se a clivagem com o objetivo de reduzir o tamanho do material e facilitar a fixação, portanto, fez-se o corte no camundongo em posição decúbito dorsal, retirando os órgãos que foram utilizados com a ajuda de navalhas para que nenhum outro órgão fosse comprometido. Por fim, separou-se em cassetes histológicos identificados, os órgãos que seriam utilizados para realização da próxima etapa.



FIGURA 2. Camundongos fixados e prontos para o corte com o auxílio do bisturi.



FIGURA 3. Camundongo após o corte com o bisturi, pronto para clivagem.



FIGURA 4. Órgãos retirados do camundongo para a escolha do material.



FIGURA 5. Cassetes histológicos.

Após esses procedimentos realizou-se o segundo passo, sendo assim, foi feito o processo de desidratação em álcool 70%, 80%, 90% e absoluto duas vezes (1 hora para cada banho de álcool), com o objetivo de retirar a água presente no tecido. Em seguida, ocorre o processo de diafanização, utilizando Xilol I e Xilol II para a remoção do álcool do tecido.

Depois desse processo, realizou-se a impregnação, que consiste na infiltração da parafina líquida, antes colocada na estufa a 60°C, no material biológico, para que o tecido adquira rigidez suficiente e seja possível a realização de cortes finos. Para isso, foi necessário o uso de uma pinça aquecida para inserção do material e também o uso do esquadro de Leuckart a fim de adquirir o formato de um bloco. 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, além de fazer a inclusão do tecido em parafina com a superfície (clivada) a ser cortada para baixo.

Após o resfriamento, ocorre a lapidação para que o excesso de parafina seja retirado e o tecido fique mais visível e assim, os blocos de parafina com o material incluído são obtidos e estão prontos para microtomia, precisando serem conservados em local gelado para que a parafina não derreta.



FIGURA 6. Parafina derretida para o emblocamento do tecido.



FIGURA 7. Tecido inserido na parafina com auxílio do esquadro de Leuckart.





FIGURA 8. Tecidos emblocados na parafina e lapidados.

Desse modo, os blocos resfriados serão submetidos ao micrótomo que realizará cortes sequenciais finos com espessura de 3 a 6 micrômetros com a ajuda de navalhas descartáveis, visto que proporcionam um corte sem tantas falhas, para que possa ocorrer a passagem de luz no microscópio. Os cortes obtidos devem ser levados com o auxílio de uma pinça ao banho histológico a uma temperatura entre 40 e 44°C, evitando-se a formação de dobras no tecido.



FIGURA 9. Bloco de parafina posicionado no micrótomo rotativo para corte microscópico.

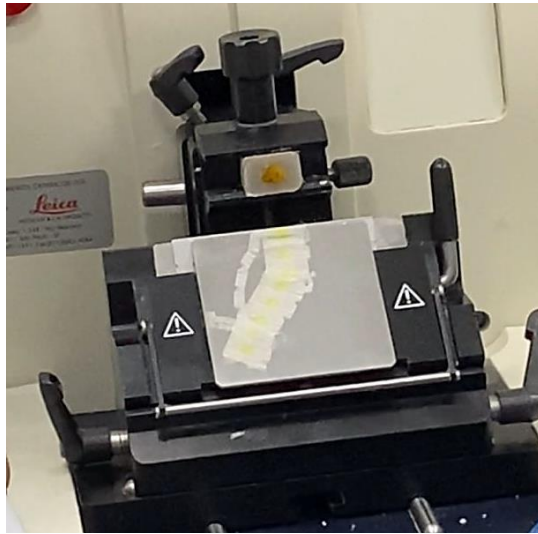


FIGURA 10. Início do corte do bloco de parafina.



FIGURA 11. Aparelho utilizado para realização do banho histológico.

Posteriormente, é feito o processo chamado de “pescagem”, que ocorre com lâminas previamente limpas e identificadas na parte fosca com o uso de um lápis, que serão encaminhadas à estufa a 60°C por no mínimo 2 horas para o derretimento da parafina. Depois desse processo, coloca-se as lâminas na cuba para não grudarem e serem utilizadas na última etapa.



FIGURA 12. Material em banho histológico para a “pescagem”.

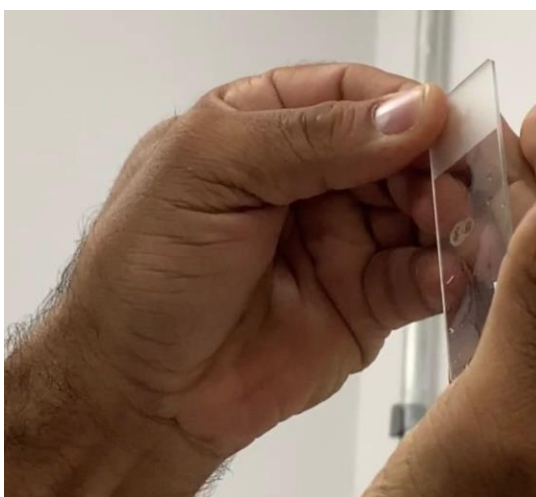


FIGURA 13. Material adicionado à lâmina pela “pescagem”.

Para finalização, a coloração é o processo indispensável da produção, visualização e interpretação dos componentes teciduais presentes nas lâminas histológicas. Existem diversos tipos de coloração, mas a mais indicada para esse tipo de análise é com hematoxilina e eosina (H.E). Como esse tipo de corante é hidrossolúvel foi necessário desparafinar-se com 2 banhos de Xilol de até 10 minutos cada e hidratar-se com concentrações decrescentes de álcool, lavando com água destilada durante 1 minuto, para receber o primeiro corante, a hematoxilina. O tecido ficou imerso no corante por 3 minutos e em seguida lava-se em água corrente podendo deixar até 10 minutos. Consecutivamente, cora-se com eosina deixando o tecido imerso por até 7 minutos. Concluímos desidratando com a bateria de soluções de álcool e clarificando com Xilol

I e Xilol II para realizar a montagem das lâminas. Esse processo é feito na mesma vidraria, chamada de cuba, mostrada na figura 14 abaixo.



FIGURA 14. Lâminas inseridas em cuba de vidro para banhos de álcool, xilol e coloração.



FIGURA 15. Baterias de solução de xilol 1 e xilol 2 para desparafinizar e clarificar, e álcool 100% e álcool 95% para hidratar.





FIGURA 16. Baterias de Eosina e Hematoxilina para coloração da lâmina.



FIGURA 17. Banho de Eosina para coloração das lâminas.



FIGURA 18. Baterias de soluções de álcool 100% para desidratar, e xilol 1 e xilol 2 para clarificação e montagem da lâmina.

Além da Hematoxilina e Eosina foi usado um outro tipo de coloração, chamado Tricômico de Masson. Nesse tipo de coloração, primeiramente, ocorreu a desparafinização com Xilol 1 e 2 e a hidratação com álcool 100%, 95% e 70%. Em seguida, lavou-se as lâminas com água destilada por 1 minuto e colocou em solução de Boiün por 1 hora na estufa a 60 graus. Novamente, lavou-se em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Boiün e depois em água destilada.



FIGURA 19. Sequência de soluções usadas para a coloração de Tricrômico de Masson.

Após isso, banhou-se a lâmina em Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos, em solução de Escarlata de Biebrich/Fucsina Ácida por 5 minutos, diferenciou-se pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 minutos, banhou-se em solução de Azul de Anilina durante 10 minutos e em solução de Ácido Acético 3% por 3 minutos. Entre cada solução de coloração, que são a Hematoxilina Férrica, a Fucsina Ácida e o Azul de Anilina, foi feito a lavagem em água destilada. Por fim, ocorreu a desidratação com a bateria de álcoois (95%, 100% e 100%), a clarificação com a bateria de Xilol 1, 2 e 3 manuseada na capela.



FIGURA 20. Solução de hematoxilina férrica, usada para corar os núcleos em preto.



FIGURA 21. Solução de fucsina ácida, usada para corar o citoplasma em vermelho.



FIGURA 22. Solução de fosfotúngstico-fosfomolíbídico, usado para preparar a lâmina para receber o azul de anilina.



FIGURA 23. Solução de azul de anilina, usada para corar o colágeno em azul.





FIGURA 24. Solução de ácido acético.



FIGURA 25. Baterias de soluções de álcool 95% e 100% para desidratação.



FIGURA 26. Bateria de soluções de xilol 1, xilol 2 e xilol 3 para clarificação.



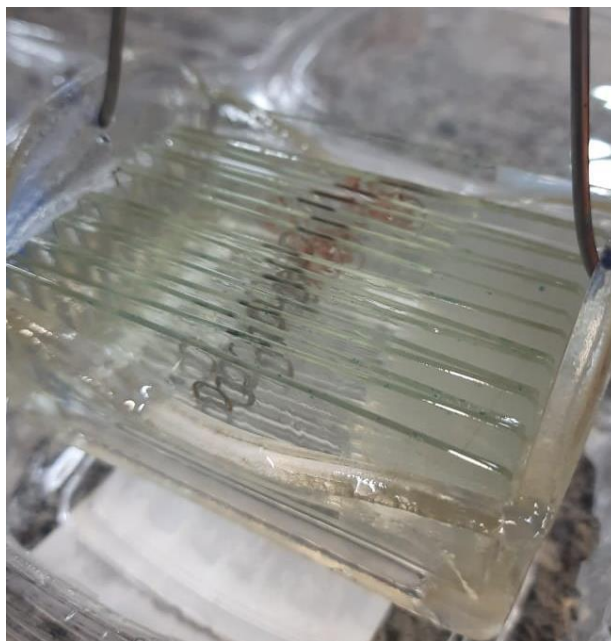


FIGURA 27. Lâminas na cuba prontas para montagem.

Por fim, como última etapa do processo de montagem, realiza-se a selagem da lâmina, com a finalidade de cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando um meio de montagem para fixar a lâmina à lamínula, que nesse caso foi a cola chamada Ethelan. Após colocada na lamínula adiciona-se uma gota de Xilol para dissolver a cola e não ocorrer a formação de bolhas. Assim, após um repouso de 24 horas a lâmina estava pronta para visualização no microscópio.

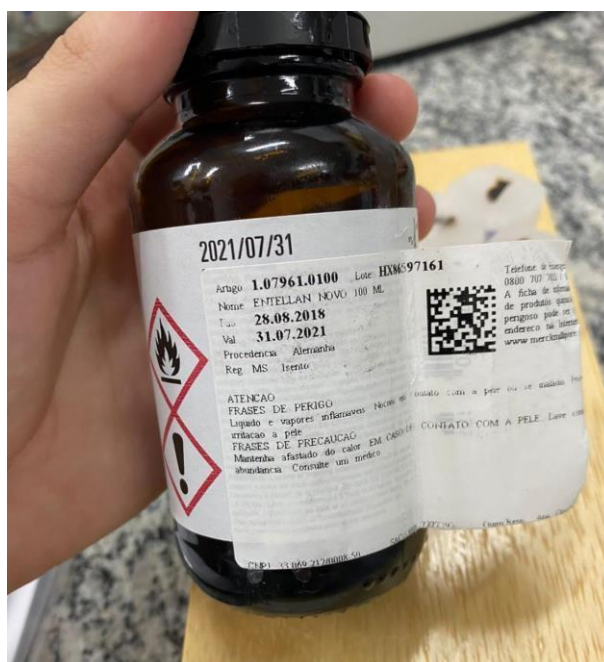


FIGURA 28. Cola utilizada para fixar lamínula na lâmina.



FIGURA 29. Lâmina de Traqueia e esôfago finalizada e pronta para visualização no microscópio.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a confecção das lâminas histológicas, inicia-se o processo de visualização dos resultados. A seguir, serão apresentadas imagens em diferentes aumentos oculares da lâmina confeccionada contendo a traqueia e o esôfago de um camundongo, com a finalidade de verificar a qualidade do material produzido e além disso, expor os pontos corretos e incorretos do processo de preparação.

A Hematoxilina e a Eosina é o tipo de coloração mais utilizado na confecção de lâminas histológicas para estudo, permitindo que se torne evidente os componentes dos tecidos. Nesse tipo de coloração a Hematoxilina corou em azul ou violeta o núcleo das células que é rico em ácidos nucleicos e a Eosina corou em cor-de-rosa o citoplasma e o colágeno, como mostrado nas imagens abaixo.



FIGURAS 30 E 31. Tecido de traqueia e esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 4x.

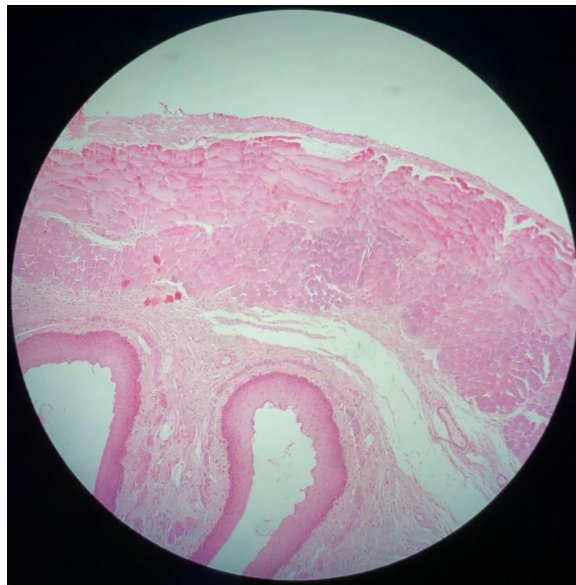


FIGURA 32. Tecido de traqueia e esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 10x.

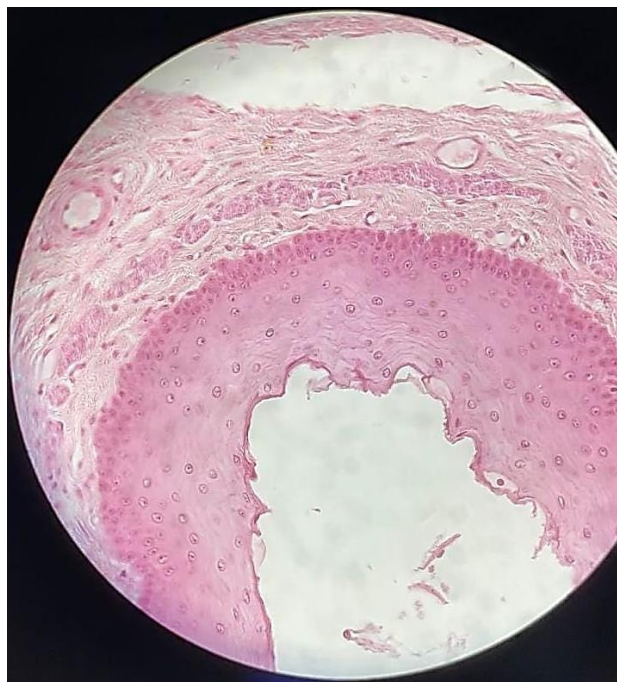


FIGURA 33. Tecido de traqueia e esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva 40x.

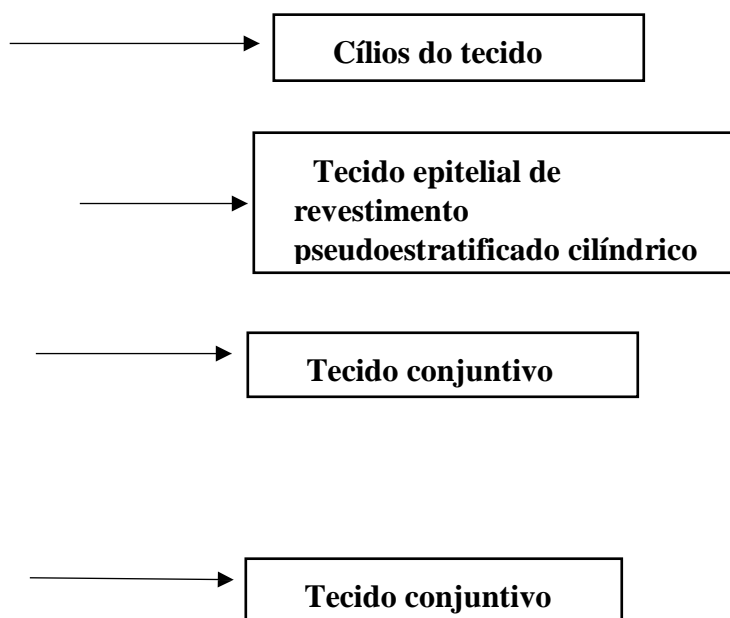


FIGURA 34. Tecido de traqueia corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 100x.

Verifica-se na figura 34 o tecido de traqueia, nele presente o tecido epitelial pseudoestratificado cilíndrico ciliado, onde os cílios têm a função de limpar as camadas de muco contendo partículas de poeira e células mortas em direção à boca. Abaixo dele, observamos a presença de tecido conjuntivo frouxo, constituído por muitas células e poucas fibras colágenas, nessa condição rico em fibras elásticas, e também o tecido conjuntivo denso que é formado pelos mesmos elementos encontrados no tecido conjuntivo frouxo, porém tem fibras mais espessas e mais numerosas, além de menor quantidade de células.

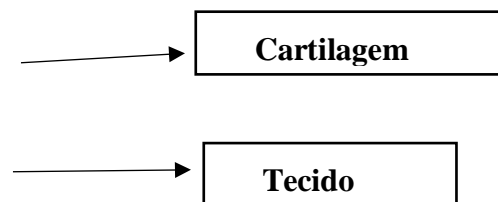


FIGURA 35. Tecido de traqueia corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 10x.

Na figura 35, visualiza-se o tecido adiposo vascularizado composto por adipócitos e sustentado por fibras reticulares. E também, cartilagem hialina com pericôndrio composta por fibras colágenas e responsável pela sustentação de tecidos moles.

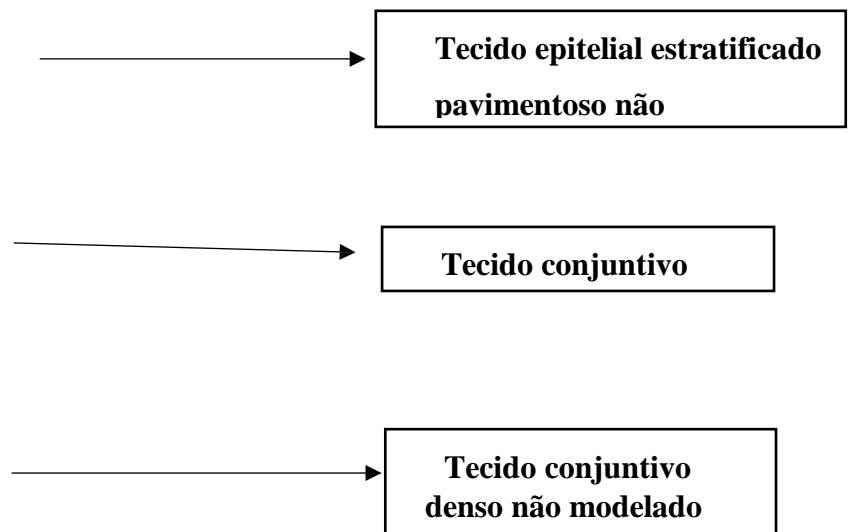


FIGURA 36. Tecido de esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 40x.

Na imagem acima (figura 36) podemos observar o epitélio de revestimento do esôfago, apresentando múltiplas camadas com células superficiais pavimentosas, visto que estas sofrem maior pressão quando ocorre a passagem do alimento. Além disso, podemos observar a presença do tecido conjuntivo frouxo, constituído por muitas células e poucas fibras colágenas e mais abaixo o tecido conjuntivo denso não modelado que possui abundantes fibras colágenas dispostas em diferentes direções.

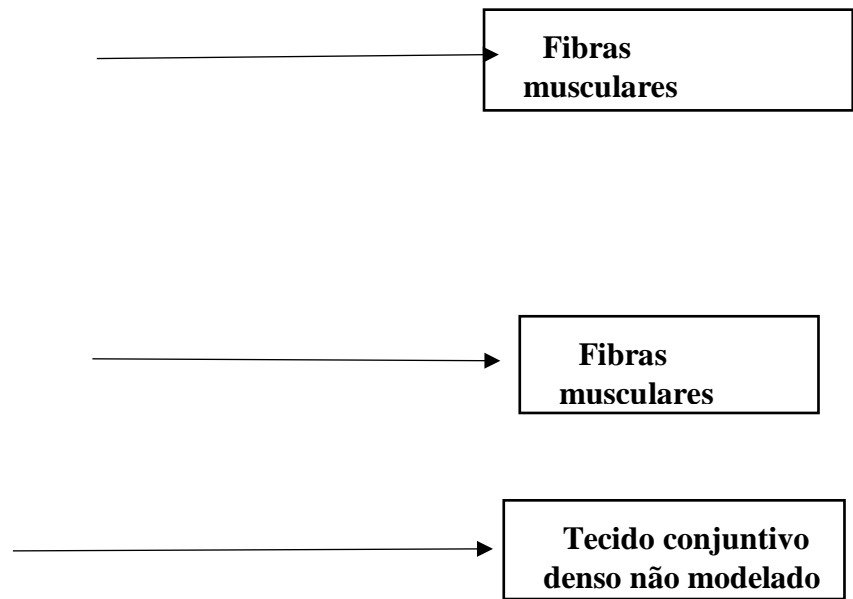


FIGURA 37. Tecido de esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 10x.

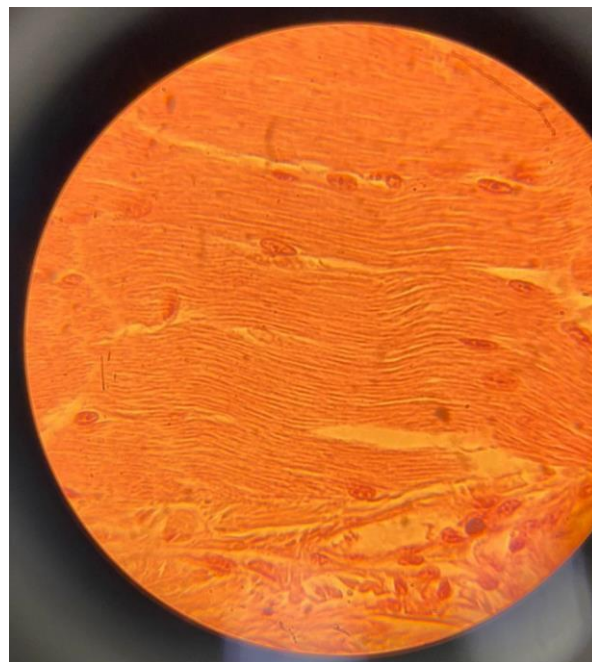


FIGURA 38. Tecido muscular liso do esôfago corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 100x.



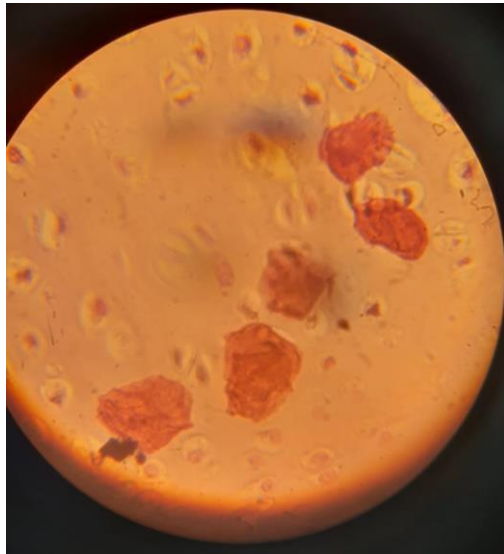


FIGURA 39. Artefatos presentes no tecido de traqueia, corado com hematoxilina e eosina, visualizado na objetiva de 100x.

Vale ressaltar que, nas figuras 35 e 39, há evidências dos denominados artefatos, ou seja, sujeiras ou dobras presentes na lâmina. Isto, é resultado de uma falha no processo de produção da lâmina histológica, que prejudicam a visualização na análise.

Já o Tricômico de Masson, consiste em um tipo de coloração da técnica de histoquímica que estuda a constituição química das células e tecidos. Essa coloração possibilita a visualização de diferentes estruturas do tecido conjuntivo a partir de cores diferenciadas, sendo os núcleos corados em preto, a queratina, as fibras e o citoplasma em vermelho e o colágeno e o muco em azul, como mostrado nas imagens abaixo.



FIGURAS 40. Tecido de traqueia e esôfago corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva 4x.



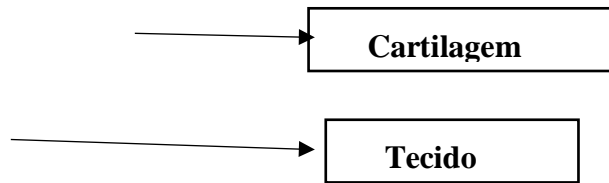


FIGURA 41. Tecido de traqueia corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva de 10x.

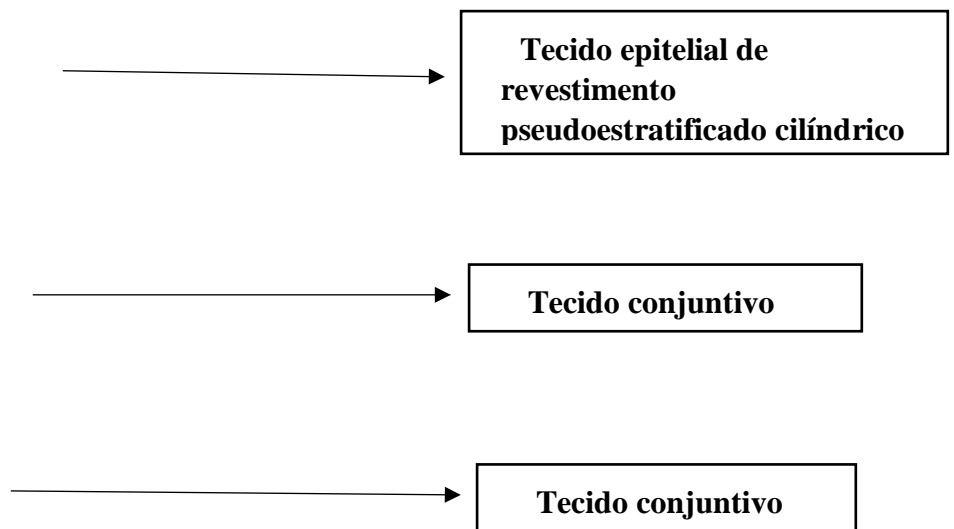


FIGURA 42. Tecido de traqueia corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva de 40x.



FIGURA 43. Tecido de esôfago corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva de 10x.

No estômago existem grupos de glândulas secretoras de muco, as glândulas esofágicas, cuja secreção facilita o transporte de alimento e protege a mucosa. Portanto, a coloração azul presente nessa porção do tecido, além corar o colágeno cora também o muco secretado, como observado nas imagens 43 e 44.

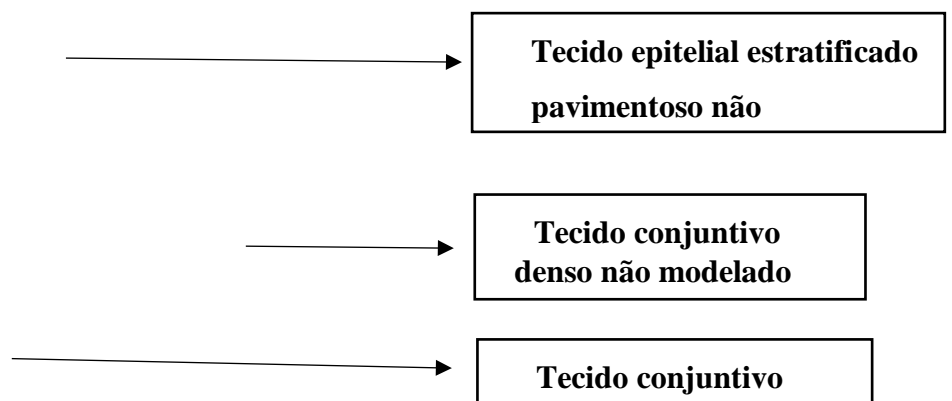


FIGURA 44. Tecido de esôfago corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva de 40x.

Nas imagens 42 e 44, pode-se observar a presença de fibras coradas em vermelho e entre elas o colágeno corado em azul como descrito na técnica de Tricrômico de Masson, representando a composição do tecido conjuntivo liso ou denso.



FIGURA 45. Tecido muscular estriado esquelético do esôfago corado com Tricômico de Masson, visualizado na objetiva de 100x.

Portanto, segundo os autores Junqueira e Carneiro, as técnicas histológicas possibilitam a investigação da função e do metabolismo de cada estrutura e isso foi possível observar nesses resultados.

## CONCLUSÃO

O objetivo de se produzir lâminas com materiais histológicos foi alcançado, uma vez que o estudo permitiu a observação dos componentes teciduais de cada órgão analisado, a partir das diferenças presentes entre as duas técnicas de colorações utilizadas no processo, entre elas a coloração de Hematoxilina e Eosina e a coloração de Tricômico de Masson.

Ao final, observou-se com base nos resultados, que a histotécnica se trata de um processo complexo no qual exige um alto nível de atenção em cada uma das etapas, visto que qualquer erro pode prejudicar o resultado final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 13ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 528p

ROSS, M. H.; Pawlina W.; Barnash, T. A. **Atlas de Histologia Descritiva**. 8ed. Guanabara Koogan, 2021. 1032p.

**Histologia Interativa: Esôfago**. 2022. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/histologiainterativa/esofago/>. Acesso em: 26 de abril de 2022.

ABRAHAMSOHN, Paulo; FREITAS, Vanessa. **Sistema Respiratório: Traqueia**. Disponível em: <https://mol.icb.usp.br/index.php/18-6-sistema-respiratorio/>. Acesso em: 28 de abril de 2022.

CAMARGO, Isabel Cristina Cherici. **Histologia Básica e Comparada no Ensino de Ciências Biológicas**. 2020. Disponível em: <https://www.assis.unesp.br/Home/pesquisa/publicacoes/roteiro-histologia-basica-e-comparada-no-ensino-de-ciencias.pdf>. Acesso em: 28 de abril de 2022.

SANTOS, Katharine Raquel Pereira. **Manual de técnica histológica de rotina e de colorações**. 2021. 32p. Graduação em Ciências Biológicas (projeto de extensão). Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2021.