

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INTRODUÇÃO À HISTOLOGIA E HISTOTÉCNICAS

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

UNIFEOB
CENTRO UNIVERSITÁRIO DA FUNDAÇÃO DE ENSINO
OCTÁVIO BASTOS

ESCOLA DO BEM-ESTAR
BIOMEDICINA E CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

INTRODUÇÃO À HISTOLOGIA E 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:

Bárbara **LONGUINI**

Cassio **GAMA**

Diego Relvas **MARTINS**

Matheus Donizetti **GONÇALVES**

Nadson Harã **MANCO**

Rafael **PASSOS**

Victório Jordão **VITOR**

SÃO JOÃO DA BOA VISTA, SP

2022

INTRODUÇÃO À HISTOLOGIA E HISTOTÉCNICAS

Bárbara **LONGUINI**¹; Cassio **GAMA**¹; Diego Relvas **MARTINS**¹; Matheus Donizetti **GONÇALVES**¹; Nadson Harã **MANCO**¹; Rafael **PASSOS**¹; Victório Jordão **VITOR**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

UNIFEOB

1 INTRODUÇÃO

O estudo das células e dos tecidos e a forma em que essas estruturas se organizam é chamado de Histologia. Todo esse estudo é feito com a ajuda de microscópios devido ao pequeno tamanho dessas células.

Em face do cenário atual podemos dizer que o estudo da histologia tem recebido cada vez mais importância, visto que com os avanços da tecnologia e da medicina temos a possibilidade de criarmos inúmeras possibilidades e respostas. Diariamente, diversos diagnósticos médicos são confirmados por meio de biopsia fazendo com que nós possamos estudar a causa da morte e, por meio deste estudo, talvez, conseguir avanços possibilitando que aquela causa de morte, talvez, possa ser retardada ou até mesmo curada.

Microscopia

Segundo Junqueira e Carneiro (2000), devido as células e os componentes da matriz extracelular contida entre elas serem muito pequenos, faz com que a histologia dependa do uso de microscópios.

Para que o estudo de tecidos ao microscópio seja eficiente, é necessário a preparação correta dos cortes histológicos, mas que segundo Junqueira e Carneiro precisam antes passar por uma série de tratamentos, que são os seguintes: fixação, inclusão, fixação física por congelamento, e coloração.

Microscopia de luz: Base da microscopia que consiste em três sistemas de lente:

Condensador, que concentra a luz de uma lâmpada e projeta um feixe luminoso sobre o espécime; Objetiva, que recebe luz que atravessa o espécime e projeta uma imagem aumentada em direção ocular; Ocular, que amplia a imagem e projeta na retina, por uma tela, câmera fotográfica ou detector eletrônico.

Junqueira e Carneiro (2000, p. 4) afirmam que: “Alguns sistemas ópticos possibilitam a observação de células e cortes não corados”. Junqueira e Carneiro (2000) em sua obra diz que esses sistemas são através do microscópio de contraste de fase que produz imagens visíveis de objetos quase transparentes, usando um sistema de lentes. E através do microscópio de contraste diferencial, que produz uma imagem aparentemente tridimensional, e que são sempre vistas em preto, branco e tons de cinza.

Na microscopia confocal o preparado é iluminado por um delgado feixe de raios laser que varre o corte, iluminando ponto por ponto um determinado plano da célula, realizando assim, um “corte óptico”. As células são tratadas por compostos fluorescentes, e a luz emitida é captada e tratada num computador que fornece os sinais para um monitor de vídeo. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004)

Algumas substâncias absorvem energia e emitem luz de maior comprimento de onda. Essas substâncias são ditas fluorescentes. A microscopia de fluorescência é muito usada para localizar sondas fluorescentes, que são substâncias diversas capazes de reagir especificamente com quantidade mínima de determinadas moléculas intracelulares ou do meio extracelulares. (JUNQUEIRA, LUIZ C.)

Ao contrário da microscopia óptica, a eletrônica não usa feixes de luz e sim, de elétrons que interagem com a composição dos tecidos. Dentro da microscopia eletrônica, podemos utilizar os microscópios de transmissão e de varredura.

Microscópios de transmissão, na prática possuem uma resolução altíssima podendo ser cerca de 0,2 nm, ou seja, mais de mil vezes maior que a de microscópios ópticos. Essa grande resolução impede a visualização de tecidos delgados, permitindo que apenas partículas ou moléculas isoladas sejam identificadas.

Microscópios eletrônicos de varredura possuem um mecanismo relativamente parecido com o de transmissão, porém com grandes diferenças. Nestes microscópios, os elétrons não atravessam o tecido, são refletidos pela presença de uma fina camada de metal que é preparada junto com o espécime, o que gera um aspecto tridimensional. Em seguida, os elétrons refletidos são interpretados por um detector e representados em um monitor, ou mesmo, gravados e fotografados.

Radioautografia em secções de tecido

Algumas medidas podem ser aproveitadas para o estudo funcional de processos biológicos em corte de tecido, isso através do uso de alguns tipos de emissões radioativas que sensibilizem emulsões fotográficas. A escolha de substância depende muito do que se quer observar e estudar. Dependendo da localização da radiação no tecido pode-se obter informações diferentes.

Cultura de células e tecidos

Para preparar uma cultura de célula e tecido é necessário o isolamento mecânico ou enzimático da área a ser estudada, depois pode ser feito o cultivo delas em suspensão ou em placas de Petri, sendo assim temos o meio de Cultura já pronto para ser estudado, desde análises de moléculas naturais ou fármacos até mesmo em análises diretas de comportamento de células vivas por meio do auxílio do microscópio.

Fracionamento celular

São organelas, outros componentes das células e tecidos que podem ser purificados e isolados pela técnica de fracionamento celular. É um processo físico que usa a força centrífuga para a separação das organelas e componentes celulares em função do coeficiente de sedimentação que depende do seu tamanho e sua forma. Com as frações obtidas no fracionamento pode ser analisada sua pureza no microscópio eletrônico.

Histoquímica e Citoquímica

São termos utilizados para indicar os métodos para a identificação de células ou matriz celular a partir de reações químicas ou interações com alta afinidade com as moléculas gerando substâncias insolúveis coloridas ou elétron-densas para as

microscopias de luz e eletrônica. Quais identificam Íons, os Ácidos Nucleicos, as proteínas comuns e os polissacarídeos e oligossacarídeos.

Imunocitoquímica

A imunocitoquímica é um dos processos de interação específica dado pela interação de uma molécula e um anticorpo que a reconhece (modelo utilizado para a identificação de proteínas específicas).

Distorções na visualização microscópica

Quando o espécime é observado na microscopia, é importante se atentar ao fato de que o tecido ou estrutura que está sendo observado é resultado de vários processos de preparação, esses, considerados delicados e que podem divergir-se da realidade. Espaços artificiais e distorções na visualização são conhecidos como artefatos de técnica. Exemplos de artefatos podem ser a ausência de preservação de certas moléculas no processo de fixação como o glicogênio e lipídeos.

O processo de identificação individual de cada estrutura de um tecido é extremamente difícil, onde no caso, para o estudo de certas secções específicas é necessária a observação de outros espécimes corados de outra forma. Outra distorção na visualização é o processo de identificação tridimensional ou bidimensional onde é importante conhecer o corte histológico usado para a preparação do espécime.

Com a introdução do assunto estudado o projeto visa a aplicação, desenvolvimento, compreensão e produção de materiais histológicos e do estudo da histologia.

2 Metodologia

Extração e fixação do material:

A extração do material para análise é a parte fundamental para que a lâmina seja feita, por isso deve ser feita de forma minuciosa.

Primeiramente deve ser retirado o material desejado e a remoção pode ser feita para uma análise de necropsia no caso do organismo já morto ou autopsia com o

organismo ainda vivo, principalmente durante cirurgias, a coleta desse material deve ser feita com muita atenção, pois devemos pegar aquilo que queremos analisar, por exemplo se queremos ver qual o problema que está afetando um órgão devemos extrair a parte na qual está com o problema não a parte sadia.

Depois que o material é extraído ele é cortado de forma a ficar mais fácil para o emblocamento e deixando uma maior superfície de contato aparente para que durante a microtomia haja pouca perda de material. Utilizamos para a extração dos materiais, utensílios de cirurgia como pinça e bisturi, isso pois os materiais coletados não podem ser muito grandes.

Após feito o corte no tecido o qual será analisado, fizemos a parte de fixação do tecido com um banho de álcool 100% durante um período de 1 hora, a fim de evitar autólise celular, proliferação de microrganismos e preservar o tecido era a próxima a ser seguida, porém como o animal cujo tecido foi tirado já estava em estado de preservação no formol, fomos direto para a fase da fixação.

Para a desidratação utilizamos os álcoois 70, 80, 90 e 100% durante o processo, em cada parte do processo utilizamos um banho e 1 hora em cada um dos álcoois para desidratarmos o tecido.

O processo de emblocamento surge após a etapa de inclusão. Após o processo de desidratação e clareamento, o tecido então é inserido em parafina em estado líquido, que, foi anteriormente aquecida em uma estufa com temperaturas próximas a 58 e 60°C. Por conta da grande temperatura presente no processo, o solvente utilizado no clareamento passa por uma evaporação sendo então substituído por parafina, que preenche os espaços presentes no interior do tecido. A parafina então é inserida no tecido em um processo de derramamento geralmente utilizando um béquer.

O líquido então é inserido em um molde específico para essa etapa, que se enquadra com o tamanho do tecido. Dessa forma o tecido é solidificado juntamente com a parafina formando um bloco.

É importante sempre se atentar a posição do tecido durante esse processo pois em seguida, o bloco preparado irá ser seccionado pelo micrótomo e deve estar em uma posição adequada para a montagem da lâmina.

Em alguns casos, se usa resina plástica no lugar da parafina, tornando o processo diferente do habitual. Nos casos utilizando resina, os solventes são diferentes, propriamente específicos para o conteúdo plástico.

A Microtomia consiste basicamente em obter cortes finos (de 3 a 6 micrômetros) sucessivos dos blocos de parafina contendo fragmentos de órgãos (tecidos) para observação ao microscópio. O Micrótomo é o aparelho que faz cortes microscópicos, variando geralmente de 1 a 10 μm de espessura, em pequenas amostras de material biológico emblocadas, o mais utilizado é tipo Minot (rotatório), e as navalhas mais logradas são as descartáveis, que tem um custo benefício melhor em relação a de aço.

Para a execução da microtomia, o bloco a ser utilizado precisa estar fixado e resfriado para a obtenção de uma camada fina do material, e levado a um banho-maria a temperatura de 40 a 50 graus, para que as fitas de parafina se distendam sobre a água, evitando assim dobras no tecido. Em seguida, os cortes são pescados com lâminas limpas e com identificação que segue para a estufa a 60 graus por um período mínimo de 2 horas e para evitar que os cortes se desprendam utilizam-se adesivos.

A coloração a ser utilizada para as lâminas histológicas deve seguir o objetivo da análise. Para uma observação geral dos componentes teciduais, a técnica mais indicada é a de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (H.E.). Já, para a análise de elementos específicos do tecido, é recomendável a utilização de técnicas histoquímicas. Antes da utilização dos corantes é necessário a remoção da parafina e a reidratação do corte, pois os corantes utilizados para ambas as técnicas de coloração histológica (rotina e histoquímica), geralmente são hidrossolúveis.

Para conseguir uma coloração HE eficiente, é necessário seguir algumas etapas:

1ª Etapa: desparafinar e hidratar.

2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto, para assim receber o primeiro corante, a hematoxilina. As lâminas ficam imersas no corante por 3 minutos (depende do tempo de preparo e uso do corante).

3ª Etapa: lavar as lâminas com água corrente por 10 minutos e corar com eosina por 7 minutos (depende do tempo de preparo e uso do corante).

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

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

Tricrômio de Masson

A técnica do tricrômio consiste na aplicação de três tipos de corantes para colorir o tecido, utilizado frequentemente na área das patologias já que cora músculos lisos e queratina em vermelho colágeno em azul ou verde e fibras elásticas em preto.

Seu domínio requer muito cuidado já que as etapas que ele passa são cruciais para um bom resultado no final, tendo no procedimento de preparo da coloração diversas correções de PH e preparação para que os corantes não conflitem entre si, além dos banhos de álcool, água destilada e xilol comuns no processo da preparação de corantes e materiais histológicos.

O processo de preparação do corante se inicia com a passagem das lâminas pela Hematoxilina férrica (Hematoxilina diluída em álcool 95 e cloreto de ferro (FeCl)), depois a passagem na água destilada por 3 minutos (tempo pode alterar de laboratório para laboratório) para retirar o excesso do corante, para que o processo seja mais rápido e prático se faz um movimento de pêndulo bem sutil com as lâminas, após isso é passada na fucsina ácida por 3 minutos e mais 3 minutos na água destilada.

Realizados os processos anteriores é feito o processo do azul de anilina que para que não haja conflito entre os corantes é feita a passagem nas lâminas no fosfotungstíco por 10 minutos, e quando preparado 10 minutos no azul de anilina.

A regulação do PH primordial no processo se torna mais necessária no tricrômio por causa da Hematoxilina férrica com a adição da fucsina ácida corante ácido que conflitaria com o azul de anilina sem o banho no fosfotungstíco.

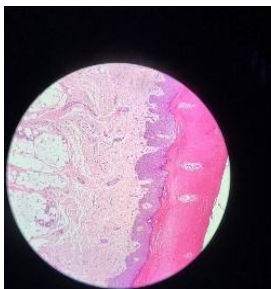
Com a preparação dos corantes começa a etapa de melhora e finalização das lâminas que antes da montagem passam pelo ácido acético a 3% para melhorar a

visualização (muda um pouco as cores) e seguem para os banhos de álcool para a limpeza completa do tecido e xilol para retirar a água e o álcool do tecido.

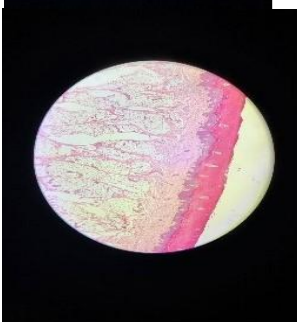
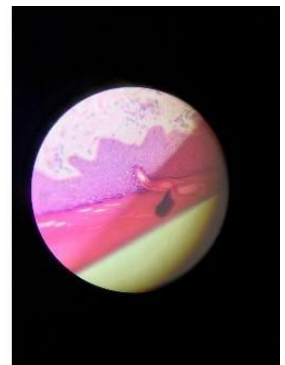
Na montagem as lâminas são colocadas em um suporte de madeira e depois com uma pipeta de pasteur(pode ser usado outro utensílio) é gotejado sobre a lamínula uma cola específica para vidro no caso foi usado Entellan, a quantidade da cola deve ser mínima, a cola é corada e uma gota de xilol é inserida na lamínula e na lâmina, o xilol por sua vez diminuí a concentração da cola, por fim as lâminas estão concluídas .

3 Resultados:

Observação dos tecidos:

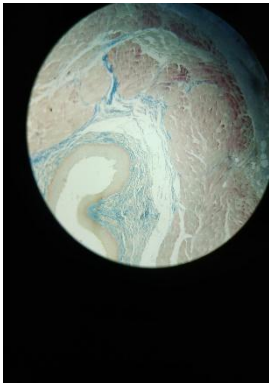
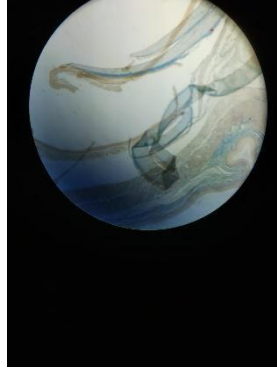
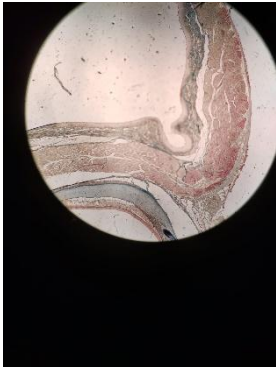


Tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado e Tecido conjuntivo propriamente dito denso não-modelado



Tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado e Tecido conjuntivo propriamente dito denso não-modelado





4 REFERÊNCIAS

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 487p.