

PRINCÍPIOS DO PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE ROTINA

PRINCIPLES OF HISTOLOGICAL PROCESSING

Clarissa de Souza Nunes*, Laetitia Alves Cinsa*

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo realizar um breve histórico do desenvolvimento das técnicas de preparo de tecido para observação em microscopia óptica e descrever as fases do processamento histológico de rotina em laboratórios de anatomia patológica e compilar as principais variações em cada etapa, bem como observar as principais causas de falhas técnicas nestes procedimentos.

PALAVRAS-CHAVE

Histologia. Processamento histológico. Microscopia óptica. Técnicas histológicas.

ABSTRACT

This study aimed to carry out a brief history of the development of tissue preparation techniques for observation with optical microscopy and describe the stages of histological processing in pathology laboratories and compile the main changes in each step and observe the main causes of technical flaws in these procedures.

KEYWORDS

Histology. Histological processing. Optical microscopy. Histological techniques.

1 HISTÓRICO

Ainda no século XVII, em 1665, com o intuito de observar o que estava muito distante, como os planetas, e trabalhando no aperfeiçoamento dos equipamentos ópticos para que tal observação fosse possível, Robert Hooke teve a ideia de inverter as lentes e percebeu que era possível visualizar estruturas tão pequenas que eram invisíveis a olho nu. Ao examinar um pedaço de cortiça nesse aparato, pôde observar vários compartimentos vazios, aos quais denominou *cellulas*, que em latim significa “pequenos compartimentos fechados”. Dessa forma deu-se origem ao precedente do microscópio óptico que conhecemos hoje e ao termo “célula” (AARESTRUP, 2012).

Quatro anos depois da descoberta de Hooke, o médico e filósofo italiano Marcello Malpighi publicou descrições microscópicas de órgãos humanos, como o baço, rins e pele, e até hoje tem seu nome associado a estruturas como o corpúsculo renal (corpúsculo de Malpighi) e a camada média da epiderme (camada malpighiana). Enquanto isso, na Holanda, com a habilidade de criar curvaturas em

vidro – a princípio para avaliar a qualidade dos produtos com os quais trabalhava em uma loja atacadista – Anton Van Leewenhoek foi o primeiro a observar e descrever uma bactéria, em 1674. Após anos dedicados a identificar e descrever microscopicamente amostras vegetais e animais, em 1700 Leewenhoek consagrou-se “o pai da histologia” (AARESTRUP, 2012).

Já no século XVIII, o interesse pelo mundo microscópico se tornou tão significativo, que microscópios começaram a ser produzidos industrialmente e comercializados por toda a Europa, especialmente na Alemanha, onde foi difundido seu uso no meio acadêmico, proporcionando um grande salto na área histológica.

Em meados do século, Rudolf Virchow, médico e antropologista, observou que as estruturas teciduais se modificavam quando havia doença, e tornou a análise histopatológica ferramenta essencial para elaborar as bases da patologia celular (AARESTRUP, 2012; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

No século XIX, a histologia já era uma disciplina acadêmica eminente. Em 1848 foi elaborado o primeiro micrótomo adequado para o seccionamento de tecidos animais infiltrados por parafina e para torná-los mais firmes para o corte. A fim de destacar as diferentes estruturas biológicas nos tecidos, uma diversidade de corantes histológicos começaram a ser testados. Eis que foi usada

Correspondence author: Clarissa de Souza Nunes. clarissa_snunes@hotmail.com

* Bióloga. Bacharel em Ciências Biológicas.

Received: 06/2016

Accepted: 06/2016

pela primeira vez em 1863 por Wilhelm von Waldeyer a técnica de coloração (com modificações posteriores) hematoxilina e eosina, frequentemente chamada por sua abreviação, HE, que destaca os núcleos das células em azul-arroxeadado e o citoplasma em vermelho-róseo, considerada até hoje fundamental na coloração histológica de rotina (MUSUMECI, 2014; TITFORD, 2009).

Ao longo dos anos, estudos realizados em diversos laboratórios identificaram diferentes substâncias que poderiam ser usadas como agentes fixadores. Foram utilizados álcool, ácido acético, trióxido de crômio, dicromato de potássio e outros produtos químicos comuns de laboratório para preservar as estruturas biológicas o mais semelhantes possível do que era quando em vida, e deixá-los mais rígidos para facilitar os cortes posteriores. Surgiram então as associações de agentes químicos para tal fim, como os fluidos de Müller em 1860; de Carnoy em 1887, e de Zenker em 1894. Em 1893, a formalina foi usada pela primeira vez com esse fim, sendo utilizada até os dias atuais (MUSUMECI, 2014).

O século seguinte ainda foi um período bastante produtivo para a elaboração de novas técnicas de coloração histológica e histopatológica. Inclusive em 1906, quando o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina foi destinado aos histologistas Camilo Golgi e Santiago Ramon y Cajal, que divergiam em interpretações da mesma imagem de estruturas neurais do cérebro. Cajal foi reconhecido por sua correta interpretação, e Golgi pela técnica de coloração que desenvolveu (MUSUMECI, 2014).

A partir de meados do século XX, o complexo processo da técnica histológica já podia ser realizado de forma automática (através de máquinas) e aprimorada (TITFORD, 2006). Tal trajetória fez com que a histologia se tornasse um campo fundamental nas áreas biológica e médica, já que abrange conhecimentos de bioquímica, biologia celular e fisiologia propriamente ditos, bem como os processos patológicos e seus efeitos (SOUZA JUNIOR, 2010).

2 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os tecidos sujeitos ao processamento histológico podem ser obtidos a partir de organismo vivo ou morto, e independente do meio de obtenção, as amostras serão processadas para confecção de lâminas, que são preparados permanentes para a observação em microscópio óptico (SOUZA JUNIOR, 2010). A técnica histológica de rotina consiste em uma série de etapas com o objetivo

de preparar determinado tecido a fim de ser analisado microscopicamente, seja por interesse de pesquisa científica ou de diagnóstico patológico (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Entre os procedimentos realizados, estão a coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia e coloração. Para tecidos calcificados, além das etapas citadas, faz-se a descalcificação após a fixação da peça.

2.1 COLETA DO MATERIAL

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). Em se tratando de seres humanos vivos, deve-se observar Resolução nº 2.074/2014 do Conselho Federal de Medicina, Art. 1º:

São considerados exames anatomopatológicos os procedimentos em Patologia para diagnóstico de doenças em material de biópsias, peças cirúrgicas, autópsias ou imunoistoquímica. Parágrafo único. Os procedimentos auxiliares para a execução do exame anatomopatológico podem ser atos profissionais compartilhados com outros profissionais da área da saúde e incluem macroscopia de biópsias e peças cirúrgicas simples, processamentos técnicos, colorações e montagem de lâminas e evisceração de cadáveres.

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).

2.1.1 REGRAS PARA UMA COLETA DE QUALIDADE

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).

2.2 FIXAÇÃO

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).

2.2.1 TIPOS DE FIXAÇÃO QUÍMICA E FIXADORES

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.

2.2.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA QUALIDADE DA FIXAÇÃO

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).

2.3 CLIVAGEM

Após o processo de fixação, é necessário que seja feita a clivagem do material, ou seja, reduzir o tamanho das peças com o intuito de facilitar a penetração da substância fixadora em menor tempo, evitando assim, o processo de autólise (MICHALANY, 1990). Por padrão, os fragmentos teciduais devem ter cerca de 3 mm de espessura, mas em

alguns casos o fragmento pode chegar a 5 mm (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

A orientação do corte das peças é essencial, pois determina como os tecidos serão incluídos no bloco para corte e, posteriormente, ter influência na análise microscópica de acordo com suas incidências longitudinal, transversal e oblíqua (AARESTRUP, 2012). No caso de peças sólidas, o corte deverá acompanhar o maior diâmetro, e suas faces devem ser planas e paralelas. Órgãos ocos – estômago, intestino, bexiga – e de superfície – pele e mucosas – devem ser seccionados de forma perpendicular à superfície, enquanto os de tecido muscular devem acompanhar paralelamente a orientação das fibras. (MICHALANY, 1990).

Os cuidados com o instrumental e manuseio das peças é o mesmo já descrito anteriormente nesta seção “Coleta do material”. As seções das peças são realizadas com lâmina de aço cortante afiada, sendo comum a utilização de bisturi cirúrgico ou de gilete; o corte deve ser feito em um só golpe e com o movimento se iniciando a partir do cabo para a ponta da lâmina – no caso da utilização do bisturi, para que se obtenham fragmentos planos e paralelos (CAPUTO; 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 (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.4. DESCALCIFICAÇÃO

Alguns tecidos sofrem deposição de sais de cálcio, seja por sua conformação original – como ossos e dentes – ou em determinadas doenças. Nestes casos, a consistência dos tecidos se torna rígida, impossibilitando a realização posterior de cortes finos (microtomia), provocando artefatos que prejudicam a análise microscópica do tecido, além de danificar o material de corte, com a formação de “dentes”. Sendo assim, é necessário que estes sais sejam dissolvidos, fazendo com que os tecidos fiquem mais maleáveis para serem cortados (MICHALANY, 1990).

A descalcificação deve ocorrer com o tecido já fixado e lavado para retirar o excesso de fixador (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Existem os métodos químico e físico de descalcificação. O primeiro ocorre através de soluções descalcificadoras ácidas, soluções quelantes ou por troca iônica, enquanto o segundo, associado ao processo químico, conta com a

dissociação eletrolítica, o ultrassom e as micro-ondas, que fazem do processo de descalcificação mais rápido (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Não existe um método de descalcificação ideal no qual a solução descalcificadora tenha grande afinidade pelos sais de cálcio, que os dissolva rapidamente numa concentração mínima e que conserve perfeitamente a estrutura dos tecidos (MICHALANY, 1990). Porém, há uma alta gama de agentes descalcificadores com vantagens e desvantagens a serem analisadas de acordo com o objetivo de estudo.

2.4.1 DESCALCIFICAÇÃO POR ÁCIDOS

Os sais presentes na matriz inorgânica dos órgãos mineralizados normalmente são pouco solúveis em água. Desta forma, os descalcificadores ácidos removem o cálcio dos sais de carbonato ou fosfato presentes, promovendo uma troca iônica que resulta na formação de um sal de cálcio solúvel.

Dentre as opções de descalcificadores ácidos, há os ácidos fortes (ácido nítrico e ácido clorídrico) e os ácidos fracos (ácido fórmico, ácido acético e ácido pícrico). Os primeiros possuem alto poder descalcificante e causam muito dano ao tecido, como hidrólise nuclear, prejudicando posteriormente a coloração dessa organela. Os ácidos fracos são mais amplamente utilizados, pois também possuem ação fixadora. Ao mesmo tempo em que fixam, iniciam o processo de descalcificação (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.4.2 DESCALCIFICAÇÃO POR AGENTES QUELANTES

Os agentes quelantes são compostos orgânicos que se ligam aos íons de cálcio, formando um metal quelado. O principal agente quelante utilizado é o EDTA, que inativa a fosfatase alcalina. É um método lento, porém sem promover artefatos de coloração, ao contrário da descalcificação por ácidos, que produz danos quase irreversíveis nos tecidos (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.4.3 VERIFICAÇÃO DO NÍVEL DE DESCALCIFICAÇÃO DA AMOSTRA

Há diferentes métodos que apontam quando o processo de descalcificação foi finalizado. É uma etapa importante, pois a exposição prolongada do tecido aos agentes

descalcificadores podem causar danos estruturais e interferir nas colorações (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Podem ser feitos testes físicos – dobrando-se a peça ou inserindo algum objeto pontiagudo para verificar o grau de mineralização – ou químicos, com o oxalato de amônia, que detecta a presença de cálcio no líquido descalcificador (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.5 PROCESSAMENTO

O processamento técnico propriamente dito consiste em uma preparação para que as peças sejam, posteriormente, emblocadas em parafina (ou produtos similares) e cortadas em fatias muito finas, a fim de que possam ser observadas as estruturas teciduais em microscópio óptico (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Alguns autores enumeram separadamente como etapas de desidratação a clarificação ou diafanização e a impregnação ou infiltração em parafina, porém, didaticamente e na prática, tais etapas, pela própria definição do processamento, serão aqui abrangidas em um único tópico. Essas fases envolvem difusão de reagentes que possibilite a saída de líquido dos tecidos – pois mesmo depois da fixação, os tecidos ainda retêm cerca de 85% de água (MICHALANY, 1990) – e a entrada de outros que sejam afins com a parafina que será impregnada mais adiante (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Para tal, seguem-se os passos do processamento:

2.5.1 DESIDRATAÇÃO

O material biológico, mesmo após a fixação, ainda retém cerca de 85% de água em seu interior (MICHALANY, 1990) e, como se sabe, a parafina é um produto derivado do petróleo, portanto, insolúvel em água. Desta forma, para que ela consiga penetrar no tecido processado, é necessário que a água presente seja retirada. Diversas substâncias desidratantes são eficazes, variando apenas o tempo de desidratação. Entre elas, pode-se citar os álcoois butílico, isopropílico e metílico, a acetona, o éter, o clorofórmio e o óxido propileno (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Porém, rotineiramente, é o álcool etílico o produto mais utilizado para esse fim. Durante o processo, pode-se observar que a peça recupera sua cor natural e diminui de tamanho, visto que, no espaço onde havia água, agora não há mais. Aconselha-se que a desidratação do tecido seja feita de forma progressiva

quanto à graduação alcoólica, e não diretamente com o álcool absoluto. Isto porque uma desidratação muito rápida provoca maior retração do tecido, podendo ocasionar artefatos posteriores. Mas, segundo Masson (apud MICHALANY, 1990), uma desidratação a partir do álcool absoluto produz excelentes resultados.

Já que a finalidade do álcool é retirar água dos tecidos, essa água que sai é também responsável pela diluição do agente desidratante em questão. Tem-se por base que o volume necessário de álcool deva ser 20 vezes maior que o volume da peça (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010), e, para que a desidratação seja adequada, há uma série de recomendações.

Aconselha-se que o recipiente em que o processo esteja sendo realizado seja agitado constantemente para permitir a mistura da água depositada no fundo com o álcool. É necessário também que o álcool seja renovado várias vezes, para que a água liberada também seja desprezada. A utilização de recipientes com o fundo largo favorece que o volume de água depositado no fundo seja menor e tenha menor contato com a peça a ser desidratada. Não se deve aquecer o álcool durante a desidratação, pois, sendo ele mais volátil que a água, pode ocorrer a hidratação do meio (MICHALANY, 1990; CAPUTO, GITIRANA; MANSO, 2010).

2.5.2 DIAFANIZAÇÃO OU CLARIFICAÇÃO

Como dito anteriormente, a parafina é insolúvel em água, e muito pouco em álcool. Desta maneira, faz-se necessário que o álcool presente nas peças após o processo de desidratação seja substituído por um produto com o qual a parafina tenha afinidade (MICHALANY, 1990). Dentre os produtos diafanizadores conhecidos estão o xilol, toluol, benzeno, óleo de cedro e os solventes universais acetato butílico, dióxido dietileno e benzoato metílico (SOUZA JUNIOR, 2010). No processamento histológico de rotina, o xilol é o mais utilizado, e, conforme vai penetrando na peça, em substituição ao álcool, a peça vai se tornando mais clara, motivo pelo qual a etapa pode também ser chamada de clarificação (MICHALANY, 1990).

O xilol é um solvente orgânico derivado do petróleo, trata-se de um líquido incolor, volátil inflamável e com potencial tóxico significante, havendo relatos de ação narcótica, fadiga, náuseas, dano hepático, edema pulmonar, entre outros efeitos nocivos. Suas propriedades também

possibilitam a degradação da borracha, neoprene e PVC. Sendo assim, o produto deve ser manipulado de acordo com as exigências de biossegurança, com a utilização adequada dos Equipamentos de Proteção Individual (EPI), em capela de exaustão e luvas de polivinil, além de não poder ser descartado em rede de esgoto sem tratamento prévio (COSTA et al., 2007).

Os diafanizadores são insolúveis em água e solúveis em álcool, portanto, têm densidade maior que a do álcool. Antigamente recomendava-se que o recipiente utilizado nessa etapa não fosse agitado, para que o diafanizador ficasse separado do álcool que sai da peça (MICHALANY, 1990), mas atualmente recomenda-se o contrário para melhorar a difusão no meio, ou seja, promover a saída do álcool e a entrada do xilol (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Aconselha-se, também, a troca do diafanizador pelo menos duas vezes e não deixar a peça por muito tempo mergulhada para evitar ressecamento e prejudicar sua qualidade. Pode ocorrer de aparecer uma nata branca na superfície do recipiente, indicando que a peça em contato com o diafanizador não foi bem desidratada (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.5.3 IMPREGNAÇÃO

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), porém as mais utilizadas no processamento histológico de rotina são a parafina e a resina. Seja qual for a substância utilizada, é necessário que ela tenha afinidade com o diafanizador utilizado anteriormente e que se solidifique de maneira controlada, sendo fluida o suficiente para penetrar nos espaços internos do tecido e depois endurecer para formar o bloco (AARESTRUP, 2012).

Para que os tecidos sejam infiltrados pela parafina, é preciso que se atinja seu ponto de fusão (aproximadamente 60°C) em estufa histológica, pois ela se mantém sólida à temperatura ambiente. a) Fatores que influenciam na qualidade da impregnação: Temperaturas muito elevadas podem causar danos ao tecido, tornando as peças muito retraídas e com rigidez exagerada, dificultando sua seção.

Por outro lado, se a temperatura estiver abaixo do ponto de fusão da parafina, não se torna possível a impregnação da peça. (MICHALANY, 1990; CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

É comum que, após a impregnação, a parafina volte ao recipiente original para ser reutilizada em outras impregnações. Sendo assim, é importante que, antes de cada processo, a parafina seja filtrada, evitando o carregamento de impurezas para o material que mais tarde serão vistos como artefatos nas lâminas (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010; USP, 2002).

2.6 INCLUSÃO

Enquanto na etapa anterior a parafina penetra nos tecidos, ocupando os espaços anteriormente preenchidos por água e gordura, na inclusão a parafina envolve o exterior da peça e, após esfriar e endurecer, forma um bloco que será submetido posteriormente à microtomia (AARESTRUP, 2012).

As peças impregnadas são colocadas com a superfície a ser seccionada voltada para baixo em um molde, normalmente metálico, preenchido com parafina líquida. Com o molde preenchido, acopla-se o anel histológico (uma peça de plástico que será fixada no micrótomo para realizar o corte do bloco devidamente identificado e que poderá conter mais um volume de parafina (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Feito isso, o molde é colocado em placa fria da máquina inclusora para promover o endurecimento do bloco.

É importante estar atento à posição em que as peças serão colocadas no molde, visto que isso determinará a incidência de corte que será realizada. Órgãos tubulares, por exemplo, deverão ser incluídos no plano transversal, enquanto fragmentos de tecidos longos serão dispostos longitudinalmente. Tais orientações podem variar de acordo com o objetivo da pesquisa e o que se desejará observar posteriormente (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.6.1 FATORES QUE INFLUENCIAM NA QUALIDADE DA INCLUSÃO

Áreas opacas ou esbranquiçadas podem ser observadas no material caso as etapas anteriores a esta (desidratação, diafanização e infiltração) não tenham sido realizadas de forma adequada. Caso isso ocorra, o processo deve retroceder, removendo-se a parafina com xilol, que, por sua

vez, deverá ser removido por álcool ou água, promover a desidratação e diafanizar para que possa ser impregnado e incluído novamente (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Deve-se submeter as peças à inclusão imediatamente após a infiltração e à temperatura de fusão da parafina, sem deixar resfriá-la, para evitar que o material se torne retraído e quebradiço com a variação de temperatura. O posicionamento das peças no molde deverão ser realizados com o auxílio de uma pinça, com delicadeza e sem a formação de bolhar de ar, que posteriormente serão observadas como artefatos nas lâminas (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.7 MICROTOMIA

Para que seja possível analisar um tecido em microscópio óptico, é necessário que esteja disposta na 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 evidenciação 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 congelamento, o ultramicrótomo, o do tipo serra e o vibratório. Porém, os mais utilizados na técnica histológica de rotina são o micrótomo rotatório (tipo Minot – Figura 6) – 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 seccionado 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 60° (fig. 8) (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 dermográfico 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).

2.7.1 FATORES QUE INFLUENCIAM A QUALIDADE 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; houve exposição excessiva ao clarificador; a infiltração foi

insuficiente; ou foi utilizada parafina muito quente durante a impregnação ou inclusão (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

2.8 COLORAÇÃO E MONTAGEM

Após os procedimentos realizados, as células se encontram incolores, transparentes. Portanto, para que seja possível sua visualização em microscópio óptico, é necessário que os tecidos sejam corados. Há diversos tipos de corantes utilizados, naturais ou artificiais, que podem se ligar a estruturas celulares específicas, de acordo com sua afinidade química (MICHALANY, 1990; SOUZA JUNIOR, 2010). A coloração dos tecidos pode ser feita através de corantes, de reações químicas especiais (histoquímica) ou de deposições metálicas (MICHALANY, 1990).

Os corantes coram os componentes teciduais (célula e matriz extracelular) de forma seletiva. São compostos orgânicos aromáticos, ionizáveis e, a princípio, incolores; e para que haja cor, é preciso que seja adicionado um cromóforo, formando um complexo chamado cromógeno. Para que esse cromógeno se ligue seletivamente aos componentes tissulares, é necessário que se ligue ao auxocromo, que determina o caráter ácido ou básico do corante (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Esses compostos ácidos ou básicos formam ligações eletrostáticas com os radicais ionizados dos tecidos, conferindo-lhes a cor (SOUZA JUNIOR, 2010). Desta forma, os corantes ácidos possuem auxocromo aniônico e se ligam aos componentes básicos dos tecidos (chamados acidófilos, como o citoplasma e a matriz extracelular); e os corantes básicos, com auxocromo catiônico, se ligam aos componentes tissulares ácidos (chamados basófilos, como o núcleo) (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010).

Os corantes também podem ser classificados de acordo com sua ação, tempo e cromatização. Os corantes de ação direta penetram ativamente no tecido, e os de ação indireta necessitam de um mordente, que é um elemento metálico que facilita a ligação do corante ao tecido por uma ligação covalente. Quanto ao tempo, a coloração pode ser progressiva, quando realizada gradualmente sem necessidade de remoção de excesso do corante (processo que se denomina diferenciação), ou regressiva, quando se hipercora o tecido e se procede a diferenciação para melhor visualização dos elementos teciduais (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). E em relação à cromatização, determinada pela quantidade de corantes utilizados durante a técnica, pode ser

monocrômica (uma cor), bicrômica (duas cores), tricrômica (três cores) ou policrômica (mais de três cores) (SOUZA JUNIOR, 2010).

2.8.1 HEMATOXILINA E EOSINA

A combinação bicrômica considerada coloração universal em histologia e histopatologia é a hematoxilina e eosina (HE) (AARESTRUP, 2012; SOUZA JUNIOR, 2010).

A hematoxilina, corante natural oriundo de fonte vegetal, tem propriedade de corar os núcleos das células (ricos em substâncias ácidas, os ácidos nucleicos) de roxo-azulado devido ao seu caráter básico. Por si só, a hematoxilina não é um corante, e para se tornar um, necessita ser oxidada em hemateína. Ainda assim, o corante formado pela associação com a hemateína não possui afinidade com os tecidos, sendo necessária a utilização de um mordente, normalmente alumínio ou ferro. A eosina, atraída pelos elementos básicos das proteínas citoplasmáticas, confere uma coloração rósea-avermelhada ao citoplasma, sendo um corante acidófilo (SOUZA JUNIOR, 2010).

É importante lembrar que, após a microtomia, cortes dos tecidos nas lâminas estão envoltos em parafina, e a maioria dos corantes são solúveis em água. Portanto, antes da coloração, é necessária a desparafinização das lâminas, utilizando-se o xilol. Após desparafinadas, as lâminas são submetidas à hidratação em álcool em sequência decrescente de graduação, para que o meio esteja apto a receber os corantes solúveis em água e, a partir daí, ficam prontas para serem expostas ao corante. O processo tem continuidade com a desidratação em série alcoólica crescente, a clarificação em xilol e, por fim, com a selagem ou montagem da lâmina, que consiste em cobrir o tecido corado com uma lamínula de vidro (CAPUTO; GITIRANA; MANSO, 2010). Para fixar a lamínula na lâmina, podem ser utilizadas resinas naturais – Bálsamo do Canadá, por exemplo – ou meios sintéticos, como o Entellan (SOUZA JUNIOR, 2010).

2.8.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA QUALIDADE DA COLORAÇÃO E MONTAGEM DAS LÂMINAS

Pode ocorrer que, durante a colocação da lamínula sobre o tecido, haja formação de bolhas, que podem ser facilmente removidas com a pressão de uma pinça sobre a lamínula até que a bolha seja expulsa do campo (SOUZA

JUNIOR, 2010). A espessura da lamínula, bem como sua distância do tecido (devido à qualidade e quantidade de resina colocada) é de real importância para a análise microscópica, já que as objetivas dos microscópios estão adaptadas à correção de distância focal (MICHALANY, 1990). Além disso, é imprescindível que as lamínulas sejam limpas (normalmente em solução alcoólica) até ficarem translúcidas antes de serem colocadas sobre o tecido, pois isso evita que, posteriormente, sejam observadas manchas e sombras ao microscópio. O tempo de imersão das lâminas em cada corante também deve ser respeitado, bem como a remoção de excesso de corante para melhor nitidez e contraste dos elementos teciduais durante a visualização em microscópio.

3 CONCLUSÃO

O processamento histológico é um conjunto de procedimentos técnicos executados em fases sequenciais que requerem, ao mesmo tempo, observação dos protocolos e capacidade de adaptação dos mesmos diante da necessidade de cada amostra, que é única. Apenas o conhecimento dos princípios físicos e químicos de suas diversas etapas, aliado à experiência laboratorial, possibilitam que o corte histológico tenha a qualidade ideal e esperada.

4 REFERÊNCIAS

- 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.
- COSTA, K. N. S. da; 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.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto/atlas**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. 2. ed. São Paulo: Michalany, 1990. 277p.
- MUSUMECI, G. Past, present and future: overview on histology and histopathology. **J. Histol Histopathol**, v. 1, n. 5, 2014.
- PINTO, I. C. N. V. B. **Avaliação de novos fixadores em anatomia patológica**. 2010. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular)—Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, 2010.
- SOUZA JUNIOR, J. C. de. **Controle de qualidade em lâminas histológicas: importância da metodologia de H/E no diagnóstico médico**. 2010.34 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)—Faculdades Integradas FAFIBE, Bebedouro, São Paulo, 2010.
- SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. **Bancroft's theory and practice of histological techniques**. 7. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2013. 637p.
- TITFORD, M. A short history of histopathology technique. **The Journal of Histotechnology**, Alabama, v. 29, n. 2, p. 99-110, jun. 2006.
- TITFORD, M. Progress in the development of microscopical techniques for diagnostic pathology. **The Journal of Histotechnology**, Alabama, v. 32, n. 1, p.9-19, mar. 2009.
- USP (Universidade de São Paulo). **Manual de técnicas em histologia e biologia celular do laboratório de biologia celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: consolidação dos procedimentos**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 154p.