

TÉCNICAS ADAPTADAS DE ELABORAÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS PARA USO DIDÁTICO

Gilson Tavares de Lima¹Jessica Martins Dos Santos², Gerson Conceição Da Silva Barros², Jorge Luís Sales Moura², Cynthia Raquel Barros Sousa²

¹Docente do Curso Técnico Subsequente em Análises Clínicas - IFTO. e-mail: gilsontavares@ifto.edu.br

²Alunos do Curso Técnico Subsequente em Análises Clínicas – IFTO. e-mail: jm09438@gmail.com

Resumo: Este trabalho descreve técnicas histológicas simples para produção de lâminas, fazendo uso de substâncias simples no intuito e facilitar a produção e utilização de lâminas histológica como objeto de estudo em aulas práticas de biologia celular ou molecular e também em histologia. A primeira tentativa deu-se por substituição de xilol por isopropanol como agente clarificador na produção de blocos de inclusão em parafina, a qualidade dos cortes dessa técnica não foi verificada devido ao insucesso de um protótipo mcrótomo e a falta de micrótomo convencional. As demais técnicas proposta foram: lavado de fígado bovino, prensagem de amostras de fígado bovino, lavado de cavidade oral centrifugado. Outra amostra utilizada além do fígado bovino foi o rim de galinha. Todas as amostras foram coradas com hematoxilina e eosina, as técnicas com melhores resultados foram prensagem da amostra e lavado de cavidade oral, por apresentarem conservação das características morfológicas indicando a possibilidade do uso em práticas de ensino.

Palavras-chave: aulas práticas, histologia, lâminas histológica

1. INTRODUÇÃO

Segundo (ENLOW E BROWN 1956, *apud* TIMM, 2005) a histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos animais e vegetais.

Todavia, a histologia não deve ser compreendida como o estudo da estrutura isolado da função, mas sim como uma ciência que enfoca a inter-relação e a integração de atividades moleculares e fisiológicas dentro do corpo com as estruturas anatômicas específicas, isso conseqüentemente, exige uma conceituação bastante visual. (UCB, 2008).

Os autores (CARNEIRO e JUNQUEIRA, 2008) em suas conclusões afirmam que o procedimento mais usado nos estudos de tecidos ao microscópio consiste na preparação de cortes histológicos. No entanto, na maioria dos casos os tecidos e órgãos são espessos e não permitem a passagem adequada da luz para formação de uma imagem; antes de serem examinados no microscópio eles devem ser fatiados em secções ou cortes histológicos muito delgados que são colocados sobre lâminas de vidro. Os cortes são obtidos por meio de instrumentos de grande precisão chamados micrótomos, mais antes estes tecidos e órgãos necessitam passar por uma série de tratamentos.

As técnicas utilizadas em histologia são muitas, variando de acordo o tipo de tecido a ser analisado. A técnica padrão de produção de lâminas histológicas envolve utilização de algumas substâncias nas fases do processo, que oferecem risco à saúde. As fases de produção de lâminas histológicas tradicionais são: Coleta, fixação, desidratação, clareamento, inclusão, microtomia, coloração e montagem (TIMM, 2005).

Uma substância que causa risco a saúde e é usada na produção de lâminas histológicas é o xilol que se trata de um composto orgânico volátil que pode provocar tosse, dores de cabeça, dificuldades respiratórias, perda de memória em curto prazo, depressão no sistema nervoso central, irritação ocular e dermatites (CALAZANS, 2007).

A coleta é a etapa inicial do processo de preparação de uma lâmina histológica, que começa com a obtenção da amostra. A fixação consiste na utilização de procedimentos físicos ou químicos para imobilizar as substâncias constituintes das células e dos tecidos, fornecendo maior resistência para suportar as demais etapas. A inclusão é o procedimento que consiste na impregnação do tecido com uma substância de consistência firme, normalmente parafina, que permita, posteriormente, seccioná-lo em camadas delgadas. A etapa seguinte é a microtomia, em



que se utiliza um micrótomo para obter cortes sucessivos, delgados e uniformes, a partir dos blocos de parafina. Na coloração normalmente são utilizados corantes hidrossolúveis. O processo finda na montagem das lâminas histológicas, em que as mesmas ficarão prontas para serem analisadas.

Segundo (COSTA, 2013) As principais funções das aulas práticas são: estimular a curiosidade científica de alunos, em diferentes cursos de graduação e pós-graduação, envolvê-los em investigações científicas, desenvolver a capacidade de resolver problemas, compreender conceitos básicos e desenvolver habilidades de modo a permitir que tenham contato direto com fenômenos, manipulando os materiais e equipamentos e observando organismos. Além disso, somente nas aulas práticas os alunos enfrentam os resultados não previstos, cuja interpretação desafia sua imaginação e raciocínio.

A importância da atividade prática é inquestionável no ensino devendo ter um lugar central na educação. A falta de aulas práticas de biologia é resultado da dificuldade de obtenção de materiais físicos. Apesar da importância das aulas práticas as mesmas são pouco utilizadas devido à falta de tempo para a preparação do material, insegurança dos professores para controlar a classe, disponibilidade dos materiais, estrutura e conhecimento para organizar experiências (ARAÚJO, 2011).

Ao desenvolver um experimento histológico haverá também uma contribuição para melhoria do ensino e aprendizado, seja ele de nível médio, técnico ou superior. Segundo (PRIGOL E GIANNOTTI, 2008) as aulas práticas são de vital importância para o aprendizado dos alunos, porque permitem que estes questionem a teoria e tirem as suas próprias conclusões, e que estes visualizem o que viram nos livros didáticos.

As aulas práticas podem ajudar no processo de interação e no desenvolvimento de conceitos científicos, além de permitir que os estudantes aprendam como abordar objetivamente o seu mundo e como desenvolver soluções para problemas complexos. (PRIGOL e GIANNOTTI, 2008)

Este trabalho teve como objetivo desenvolver lâminas histológicas substituindo alguns reagentes convencionais por outros de fácil acesso, bem como testar técnicas simples para confecção de lâminas; outra parte do trabalho é verificar possibilidade de uso destes materiais em aulas práticas no ensino de Biologia e em Saúde.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo caracteriza-se enquanto forma de abordagem, experimental, por ser uma pesquisa que se preocupa em determinar um objeto de estudo. Com base nesse conceito, desenvolveu-se técnicas para produção de lâminas histológicas visando melhorar e facilitar aulas práticas de ensino médio, técnico e superior substituindo materiais normalmente utilizados por outros de mais fácil acesso.

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de análises clínicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Tocantins em Araguaína. A técnica de histologia padrão tem substâncias altamente tóxicas como xilol e formol. O xilol é utilizado na etapa de clarificação da amostra e foi substituído por isopropanol. Para produção das lâminas foram utilizados dois tipos de amostras, fígado bovino comprado em açougue, e rim de galinha doado por feirantes.

No processo de fixação as amostras de fígado bovino e rim de ave foram introduzidos em formol à 30%, por um período de 24h. Para desidratação, as amostras foram transferidas do formol para recipientes com 60 mL de álcool a 92,8% por 30 minutos. Passado esse tempo as amostras foram transferidas para outro recipiente com álcool absoluto por mais 30 minutos. Para clarificação, as amostras tiveram dois banhos em álcool isopropílico de 30 minutos cada.

Na etapa da inclusão foi utilizada a parafina líquida a 60°C obtida de uma vela comercial. Ambas as amostras tiveram três banhos sucessivos de 30 minutos em parafina, após isso as amostras foram colocadas em moldes metálicos preenchidos com parafina líquida.

Foram testadas quatro técnicas possíveis para construção de lâminas histológicas, blocos de inclusão de parafina, lavado da amostra de fígado bovino em solução salina 0,9%, prensagem da amostra de fígado bovino e lavado da cavidade oral centrifugado.

O lavado da amostra de fígado bovino em solução salina 0,9% foi realizado com cortes finos de fígado bovino introduzido em tubo de ensaio juntamente com cerca de 10 mL de solução salina agitado por cerca de 30 segundos em vortex modelo VX-28, Warmnest. Foi extraído o primeiro sobrenadante e levado à centrifuga modelo 80-2B da EduTec por cerca de 3 minutos, extraiu-se o segundo sobrenadante deixando cerca de 1mL para resuspensão do concentrado. Foi retirada uma alíquota de 50 μ L que em seguida foi estendida sobre uma lâmina de vidro, aguardou-se a secagem do material estendido sobre a lâmina, partiu-se então para fixação e coloração em hematoxilina e eosina. Para visualização utilizou-se microscópio óptico em aumento de 400x.

A terceira foi a prensagem da amostra de fígado bovino, utilizou-se cortes finos de fígado bovino entre duas lamina de vidro, aplicando pressão manual sobre elas, ate a formação de um filme fino da amostra para a fixação e coloração em hematoxilina e eosina. A visualização foi feita através de um microscópio óptico aumento de 400x.

A quarta técnica é o lavadoda cavidade oral centrifugado, e para isso foram utilizados cerca de 30 mL de água. A amostra foi obtida por gargarejo recolhido em um becker e centrifugado por cerca de 3 minutos, o concentrado foi estendido sobre lâmina de vidro, aguardou-se a secagem para a fixação e coloração em hematoxilina e eosina. A visualização foi feita em microscópio óptico com aumento de 400x.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira técnica de confecção de lâminas histológicas foi a de inclusão do material em parafina. (Figura 1).



Figura 1 – Blocos de inclusão em parafina

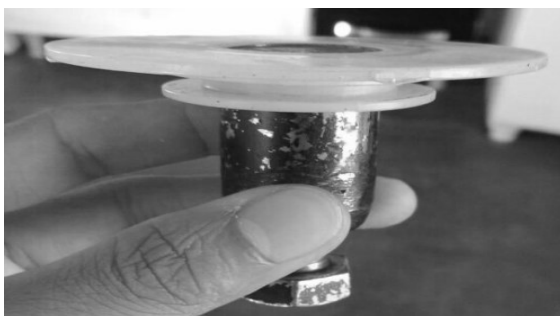


Figura 2 – Protótipo do Micrótomo

Apesar das etapas de fixação, clarificação, inclusão se mostraram aparentemente eficientes, durante a realização das tentativas dos cortes notou-se que a capacidade de aproveitamento dos cortes feitos manualmente foi baixa.

O protótipo desenvolvido foi feito utilizando um parafuso, uma porca comum, uma chapa de metal de formato tubular, suporte de plástico e um tubo de metal. Os blocos de parafina foram adicionados no centro do tubo plástico, deslocados para cima com a rotação do parafuso, depois deslizava-se uma lâmina de corte retirada de estilete comum, assim finas camadas dos blocos foram retiradas. O protótipo do micrótomo proposto (Figura 2) não se mostrou eficiente, isso pode ter acontecido pela imprecisão ou espessura dos cortes. A falta de um micrótomo

profissional, em face a ineficiência do protótipo prejudicou a avaliação da qualidade da técnica de inclusão de parafina.

A parafina foi derretida diretamente sobre o fogo o que dificultou controle da temperatura esta mesma dificuldade foi encontrada por (JUNIOR, 2010). Dessa forma pode haver alteração da morfologia do tecido. A obtenção de lâminas histológicas de blocos de parafina obtidas com o protótipo de micrótomo foi lenta e de muito baixo qualidade impossibilitando a avaliação da técnica proposta. Assim seria necessária a continuação da técnica com o micrótomo profissional para uma melhor avaliação do resultado da técnica.

A segunda técnica testada foi o lavado da amostra de fígado bovino em solução salina 0,9%. Nessa técnica o problema encontrado foi o rompimento do citoplasma celular deixando apenas o núcleo exposto (Figura 3), e isso pode ter ocorrido pela forte agitação do vortex, o que poderia ser evitado diminuindo-se a rotação ou o tempo de rotação, para talvez se obter um melhor resultado.

A técnica seguinte foi a prensagem da amostra de fígado bovino. Essa técnica mostrou um resultado melhor do que a da solução salina, pois é possível verificar na lâmina grupos celulares bem organizados e com núcleo e citoplasma bem evidentes. (Figura 4).

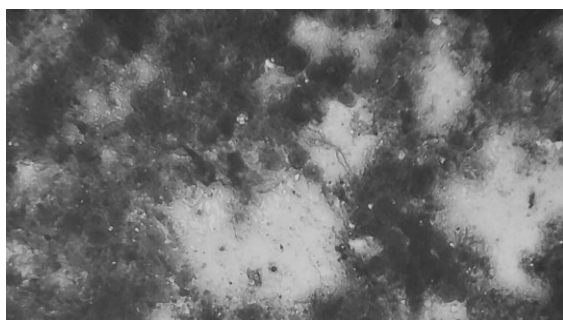


Figura 3 – Lavado da amostra de fígado bovino em solução salina com agitação em Vortex

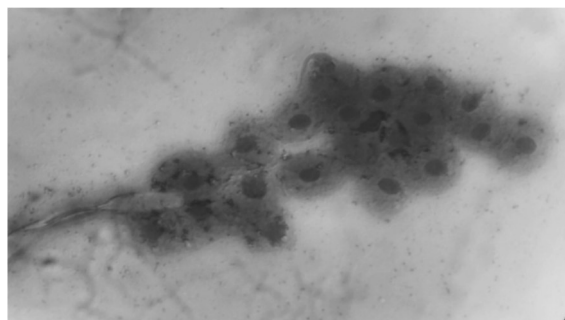


Figura 4 – Prensagem da amostra de fígado bovino

A última técnica realizada foi a do lavado da cavidade oral centrifugado, que mostrou resultado satisfatório, com células bem distribuídas formando uma fina camada de células claras, com boa coloração de células e citoplasma. (Figura 5).

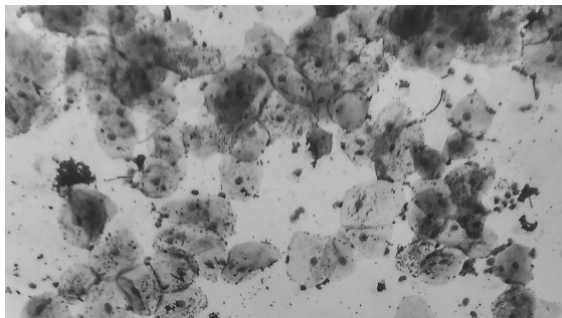


Figura 5 – Células escamosas de lavado de cavidade oral

6. CONCLUSÕES

A técnica tradicional de produção de lâminas histológicas por inclusão em blocos de parafina é uma técnica eficiente, porém com risco de intoxicação pelos reagentes utilizados, e a substituição do xilol por isopropanol, por si só, diminui a toxicidade do método. De acordo com a Ficha de Informação de Informações Toxicológicas (FIT) da Companhia Estadual de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2016) o xilol ou xileno é de venda controlada e altamente tóxico ao homem a inalação por curto prazo pode causar dispnéia, irritação dos olhos e garganta, vômito, desconforto gástrico, entre outros sinais e sintomas. O isopropanol é de venda livre e de baixo custo, sendo um facilitador da implantação deste método em pequenos laboratórios de ensino.

As técnicas que apresentaram o melhor resultado foram respectivamente prensagem da amostra e lavado da cavidade oral por apresentarem grupos celulares com características morfológicas facilmente observáveis como distinção entre núcleo, citoplasma e limites celulares. Sendo possível sua utilização como objeto de estudo em aulas prática de morfologia, histologia ou biologia celular.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, Dayane Holanda de Sousa. **A importância da experimentação no ensino de biologia**. 2011. ix, 15 f. Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade de Brasília, 2011. Disponível em :<http://bdm.bce.unb.br/bitstream/10483/1925/1/2011_DayaneHolandadeSouza.pdf>. Acesso em: 01 de set. de 2016.
- CALAZANS, Glícia Torres; DO NASCIMENTO, Márcia Silva. **Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia**. RBSO, v. 32, n. 116, p. 50-56, 2007.
- CETESB, **Ficha de Informações Toxicológicas**, [on line] Disponível em: <http://laboratorios.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/47/2013/11/xileno.pdf>, 2016.
- COSTA, Luciano da Silva. **Dificuldades no desenvolvimento de aulas práticas de laboratório: o que dizem os professores de biologia?**, 2013. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará – 2013
- JUNIOR, Jose Carlos de Sousa. **Controle De Qualidade Em Lâminas Histológicas: Importância Da Metodologia De H/E No Diagnóstico Médico**, 2010. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), Faculdades Integradas Fafibe – 2010
- JUNQUEIRA, L. C. U.;CARNEIRO, J. **Histologia e Seus Métodos de Estudo**. **Histologia básica** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.1-3.
- PRIGOL, Sintia; GIANNOTTI, Sandra Moraes. **A importância da utilização de práticas no processo de ensino-aprendizagem de ciências naturais enfocando a morfologia da flor**. 1º Simpósio Nacional de Educação–XX Semana de Pedagogia, Cascavel, 2008.



TIMM, Lílian de L. **Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas**. Caderno La Salle XI, v. 2, n. 1, p. 231-9, 2005.

UCB, VICE-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO, **HISTOLOGIA BÁSICA**. Universidade Castelo Branco. – Rio de Janeiro. 2008. – 60p