

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

AValiação DE MÉTODOS DE COLORAÇÃO EM TÉCNICA DE HISTORESINA PARA TECIDO PULMONAR DE CAMUNDONGOS¹

Jaqueline Siede², Laura Mensch Pereira³, Pauline Brendler Goettens Fiorin⁴, Mara L. Tissot Squalli⁵.

¹ Projeto de pesquisa desenvolvido durante estágio curricular do curso de Ciências Biológicas - UNIJUÍ

² Aluna do curso de Ciências Biológicas - UNIJUÍ

³ Bacharel em Ciências Biológicas - UNIJUÍ

⁴ Professora do Departamento de Ciências da Vida - UNIJUÍ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia - GPeF, Doutoranda em Ciências da Saúde - UFCSPA

⁵ Professora do Departamento de Ciências da Vida - DCVida, tutora PET (MEC/SESU, Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Ambiente – AMBIO, UNIJUÍ.

Introdução

A histologia estuda os tecidos do organismo, que são constituídos por células e pelo material extracelular sintetizado e secretado pelas células, chamado de matriz extracelular (MORISCOT; CARNEIRO; ABRAHAMSOHN, 2004).

Para a realização do estudo histológico são necessárias técnicas específicas através das quais se obtêm cortes delgados, com espessura apropriada para observação do material biológico ao microscópio de luz ou eletrônico. Como os componentes celulares e da matriz extracelular são transparentes, emprega-se técnicas histoquímicas para obtenção de colorações tornando possível a identificação dos diferentes elementos celulares e teciduais. Esse método tem por base reações químicas específicas entre o corante utilizado e os componentes biológicos, interações enzimáticas, ou interações macromoleculares de alta afinidade, que resultam na produção de compostos insolúveis corados (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Novas técnicas mais avançadas e aprimoradas vêm surgindo, de modo a qualificar o processo e principalmente a análise desses materiais. Entre estes está a utilização da resina, que visa substituir o uso de parafina, pois esta durante a inclusão necessita de substâncias de transição como o xilol para tratar os tecidos, o que torna o processo mais longo e trabalhoso.

Este estudo objetivou a aplicação da técnica histológica com historesina em tecido animal, pulmonar de camundongos, e a avaliação de diferentes protocolos histoquímicos a fim de encontrar a coloração ideal para este tipo de tecido.

Material e métodos

O estudo foi realizado em tecido pulmonar de origem animal provenientes do projeto “Avaliação da exposição crônica ao material particulado fino (MP_{2,5}) nas variáveis de estresse oxidativo e na razão extra/intracelular de HSP70 em camundongos B6129SF2/J submetidos à dieta hiperlipídica” (CEUA Unijuí, 009/2013).

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

O método histológico realizado por resina é composto por várias etapas, entre elas: fixação, infiltração, emblocamento, corte em micrótomo e coloração. Neste estudo foi utilizada a Historesina (Leica®), segundo as orientações do fabricante.

A primeira etapa, que corresponde ao processo de fixação dos tecidos, deve ser realizada logo após a coleta e o fracionamento do material visando interromper os processos metabólicos e celulares que estão ocorrendo nos tecidos até o momento. Esse processo evita as alterações comuns que acontecem nos tecidos no período pós- morte, tanto pela autólise, que é a destruição das células pelas suas próprias enzimas, quanto pela ação de microrganismos como, por exemplo, as bactérias. Nesta etapa, o tecido pulmonar passou por três fases de fixação: 1) Metacan: no qual o material permanece imerso por 4 horas; 2) Álcool etílico 70%, por 1 hora; e 3) Álcool etílico 99,5%, no qual o material permanece imerso até a próxima etapa do processamento. Durante esta passagem pela sequência etanólica, ocorre a extração da água presente nos tecidos através da desidratação.

Após a fixação e desidratação, o material passa pela pré- infiltração para que todo o tecido seja infiltrado pela resina. Utilizou-se 10mL da solução de resina que contém resina básica e ativador da historesina (Leica®), e 10mL de álcool etílico absoluto. Nesta etapa o material deve permanecer imerso por 24 horas.

O próximo passo é a infiltração, na qual é feita a troca da solução que contém etanol por resina pura. A resina tem a função de dar sustentação para as células, mantendo a forma e as estruturas das células que passaram pelo processo de desidratação. Os tecidos ficam imersos por 24 horas em resina até passarem para o emblocamento.

O emblocamento consiste em formar blocos com a solução de resina solidificada contendo o fragmento do tecido em seu interior, a fim de proteger o tecido durante a confecção dos cortes no micrótomo. Nessa etapa foi utilizado 1mL de resina junto a 0,66mL da solução de Hardener (endurecedor), responsável por catalisar a polimerização da resina e assim solidificar o material. Para dar formato aos blocos utilizou-se um molde de teflon chamado de cassete, onde é adicionada a solução e feita a orientação das peças de tecido.

Os blocos com o material foram cortados em micrótomo, na espessura de 5 micrômetros. Após a obtenção dos cortes, os mesmos foram dispostos em lâminas histológicas, para secagem e posterior coloração.

Para a realização da coloração dos tecidos foram testados diferentes protocolos, entre eles: Hematoxilina e Eosina de Harris (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010), Hematoxilina e Eosina de Gill, Hematoxilina de Heidenhain e Eosina 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997), Safranina com Eosina 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997), e Azul de Toluidina (KRAUS; ARDUIN, 1997). Todos os protocolos foram testados em diferentes tempos, a fim de encontrar a melhor coloração para a espessura dos cortes e características do material biológico. Depois da coloração, foi realizada a montagem da lâmina permanente, utilizando duas gotas de Entellan® para a colagem da lamínula sobre o corte.

As lâminas com suas respectivas colorações foram analisadas em microscópio óptico Leica.

Resultados e discussões

A coloração utilizando os corantes de hematoxilina (H) e eosina (E) é a mais utilizada para a coloração de tecidos de origem animal. Esta coloração permite uma visão de todo o tecido,

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico

Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

possibilitando uma identificação geral de todos os elementos teciduais. Nessa coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados na cor rosa (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O primeiro teste de coloração realizado durante o estudo seguiu o protocolo da Hematoxilina e Eosina de Harris (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010), que contem o corante, etanol absoluto, alúmen de potássio ou amônio, óxido de mercúrio, e água destilada. Foram realizados três testes com tempos diferentes para os dois corantes: 1) 2 min H e 5 min E, 2) 2 min H e 2 min E, 3) 4 min H e 2 min E. Todos os testes resultaram em uma boa coloração dos elementos teciduais, porém, os cortes ficaram enrugados, devido à perda da aderência do corte com a lâmina (Figura 1A).

Com o protocolo da Hematoxilina de Gill também foram realizados 3 testes: 1) 10 min H, 3 min E; 2) 20 min H, 8 min E; 3) 20 min H, 5 min E. Este protocolo, considerado próprio para coloração em historesina, apresenta em sua composição iodeto de sódio, sulfato de alumínio, água destilada, etileno glicol e ácido acético; a eosina possui, além do corante, álcool 96% e ácido acético. No entanto, esta formulação também interferiu na aderência do corte com a lâmina, causando o enrugamento dos tecidos.

O protocolo com Hematoxilina de Heidenhain e Eosina 1% (KRAUS; ARDUIN, 1997) também foram testados primeiramente em dois tempos diferentes: 1) 4 min H e 2 min E e 2) 10 min H e 5 min E. No entanto, por não apresentarem nenhuma coloração aos tecidos foi preparado um mordente para a Hematoxilina composto principalmente por elementos férricos, responsáveis por fixar a coloração. A coloração foi testada novamente com o uso do mordente antes da Hematoxilina nos tempos de: 1) 30 min mordente, 30 min H e 15 min E (KRAUS; ARDUIN, 1997), 2) 15 min mordente, 5 min H e 15 min E, 3) 5 min mordente, 5 min H, 20 min E, e 4) 2 min mordente, 2 min H, 2 min mordente novamente e 10 min E. A utilização do mordente antes da Hematoxilina e em meio aos dois corantes permitiu apenas a coloração da hematoxilina, tornando inviável sua utilização já que não houve diferenciação dos elementos teciduais.

A coloração que utilizou o corante Safranina (KRAUS; ARDUIN, 1997), responsável por corar os núcleos celulares em vermelho, juntamente com a Eosina 1%, que cora os espaços intracelulares e o citoplasma em rosa, não resultou na coloração dos tecidos, somente da resina.

Após a realização dos diversos testes, sem alcançar resultados que viabilizem a análise qualificada do tecido pulmonar, os tecidos foram corados com o Azul de toluidina (KRAUS; ARDUIN, 1997), muito utilizado na coloração de tecidos vegetais. O Azul de toluidina é um reagente metacromático, responsável por corar os núcleos fortemente em azul, enquanto o citoplasma e os espaços intracelulares são corados em azul claro. O corante evidenciou bons resultados, mesmo em tecido animal, sendo que o tempo determinado para essa coloração foi de 4 minutos, garantindo a fácil observação dos elementos de interesse, conforme observado na Figura 1B.

Foram observados problemas no uso de corantes que apresentam em sua composição solventes apolares como xilol e até mesmo o etanol, que embora sendo polar, dissolve com facilidade muitas substâncias apolares. Os protocolos com hematoxilina e eosina contendo etanol na sua formulação não resultaram na correta coloração e interferiram na aderência do corte na lâmina, prejudicando a observação e análises dos resultados do projeto no tecido pulmonar. Trabalhos desenvolvidos com

Modalidade do trabalho: Relatório técnico-científico
Evento: XXIV Seminário de Iniciação Científica

historesina em material vegetal também já citaram que o uso de álcool e xilol podem interferir tanto na coloração quanto na aderência do corte com a lâmina (MEIRA; MARTINS, 2003).

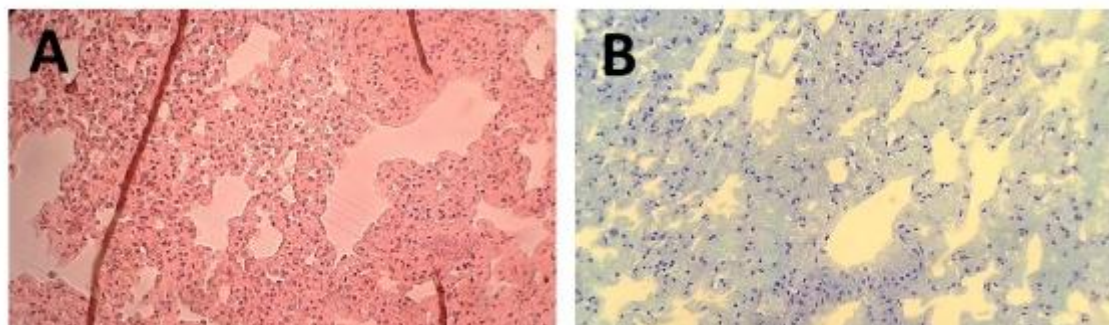


Figura 1: Cortes de tecido pulmonar de camundongos. A) corado com Hematoxilina e Eosina de Harris e B) corado com Azul de Toluidina. Aumento ao microscópio óptico 10X20

Conclusões

Através do estudo e aplicação da técnica histológica apresentada, foram obtidos bons resultados com os cortes incluídos em historesina, no entanto, a técnica apresenta restrições a alguns tipos de corantes utilizados na coloração de tecido animal.

Conclui-se que, para utilização da técnica histológica para tecidos animal em resina, deve-se procurar o uso de protocolos alternativos para a coloração que possibilitem uma boa visualização e análise dos elementos desejados. A técnica de coloração metacromática com Azul de toluidina mostrou-se satisfatória para este fim.

Palavras-chave: Histotécnica; Azul de toluidina; Hematoxilina; Eosina.

Referências

- MORISCOT, A. S.; CARNEIRO, J.; ABRAHAMSOHN, P. A. Histologia para Fisioterapia e Outras Áreas da reabilitação. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica. 9ª. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1999.
- MEIRA, Renata. M.S.A., MARTINS, Fabiano. M., Inclusão de Material Herborizado em Metacrilato para Estudos de Anatomia Vegetal, 2003.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. Manual básico de métodos em Morfologia Vegetal. Editora EDUR- Universidade Rural: Rio de Janeiro – RJ, 1997.
- MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. V.2.- Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.