

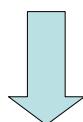
# Técnicas histológicas

Profa Simone Marcuzzo

## Histologia

- Estudo da estrutura e inter-relação dos constituintes teciduais de um organismo
- Células e material extracelular
- Tecidos

## Macroscopia e microscopia



Anatomia



Histologia

*Mikro* = pequeno

*Skopein* = examinar

## Histologia

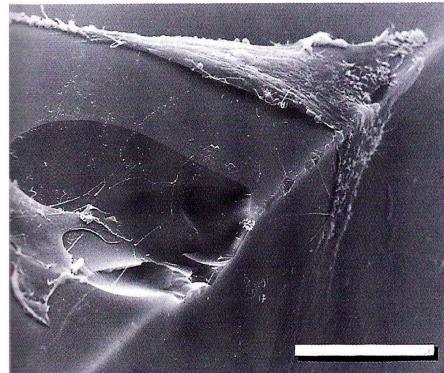
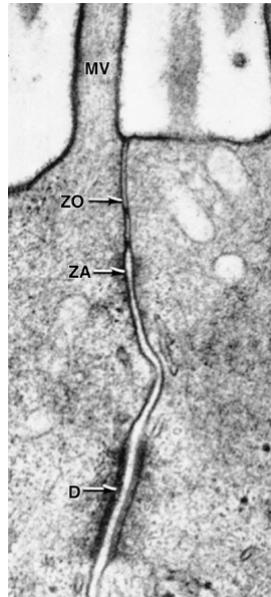
- Problemas
  - Dimensão
  - Transparência
- Soluções
  - Microscópios
  - Colorações

## Microscopia óptica (resolução 0,2 $\mu\text{m}$ ; aumento 1000-1500 x)

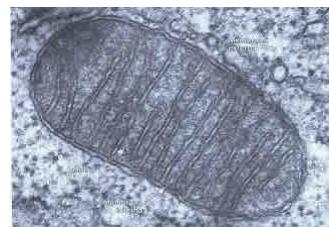
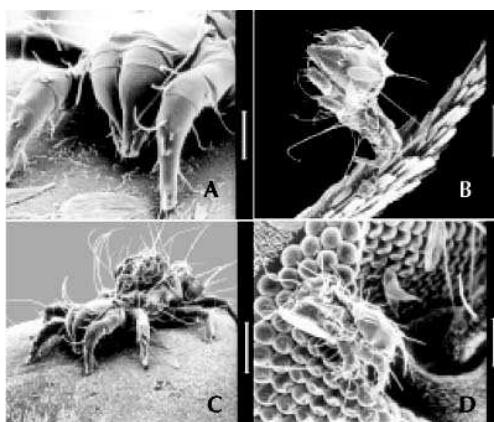
- Microscopia de luz
- Microscopia confocal
- Microscopia de fluorescência

## Microscopia eletrônica (resolução 0,1 nm; aumento 120000 x)

- Microscopia eletrônica de transmissão
- Microscopia eletrônica de varredura



**Figura 9.3** A flexibilidade do citoesqueleto é aparente neste fibroblasto de camundongo que está migrando em um ângulo de 90° em uma lamínula. Barra, 30 µm. (DE GUENTER ALBRECHT-BUEHLER, INT. REV. CYTOL. 120:211, 1990.)



**Figura** – *Tyrophagus putrescentiae* (Acaria: Astigmata) predando *Aedes* sp. (Diptera: Culicidae). A: ácaro no abdome de *Ae. aegypti*, barra 25 µm, aumento 800 X. B: ácaro na perna de *Ae. albopictus*, barra 70 µm, aumento 300 X. C: ácaro sobre o escudo de *Ae. albopictus*, barra 70 µm, aumento 300 X. D: ácaro no olho de *Ae. albopictus*, barra 40 µm, aumento 500 X.

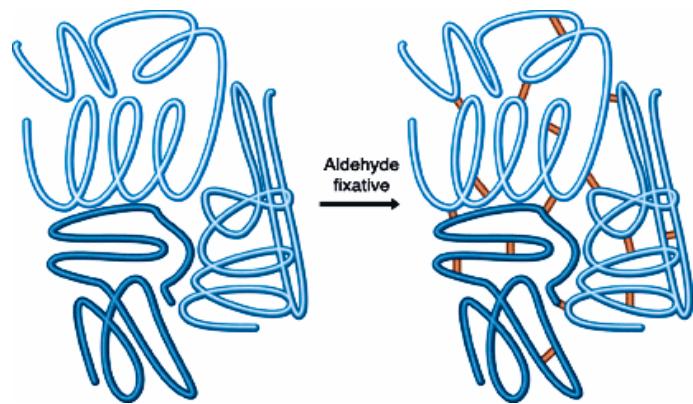
## Preparo das lâminas

### 1. Fixação

- prevenção de autólise e ataque bacteriano
- preservar a estrutura e composição das moléculas dos tecidos
- permite uma coloração adequada
- endurecimento do material

## Fixadores

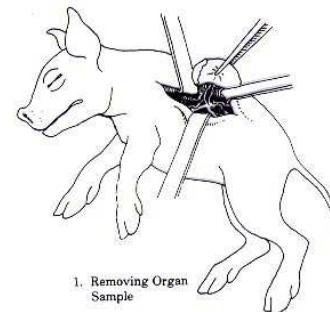
- Reação principal: estabilização das ptns
  - Ligação cruzada entre as ptns (ptns solúveis fixadas às ptns estruturais – gel) – relações se mantêm.
- Aditivos
  - Aditivos se incorporam aos tecidos. A [ ] diminui, pois vai sendo irreversivelmente incorporado ao tecido



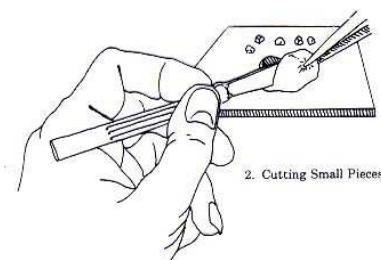
## Fixadores

- Imersão
- Perfusão

## Imersão

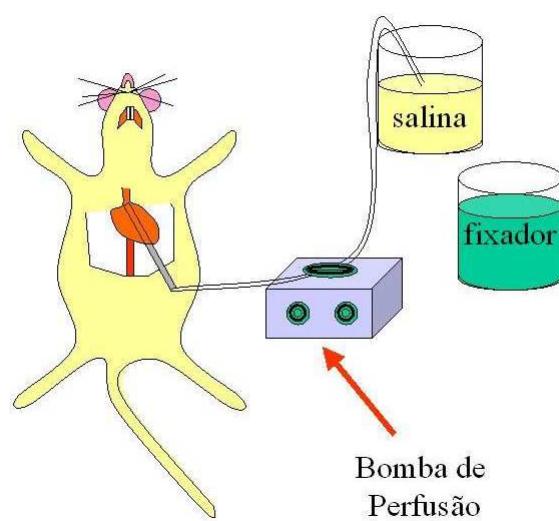


1. Removing Organ Sample



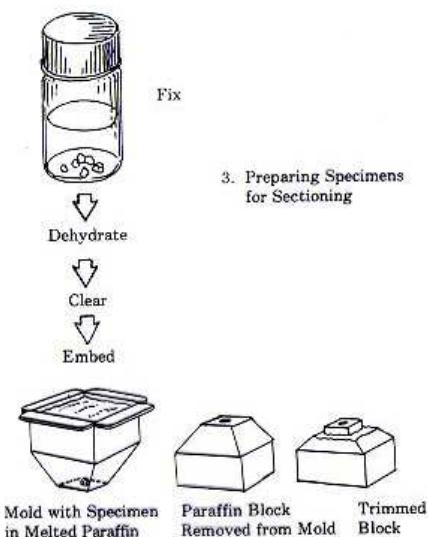
2. Cutting Small Pieces

## Perfusão

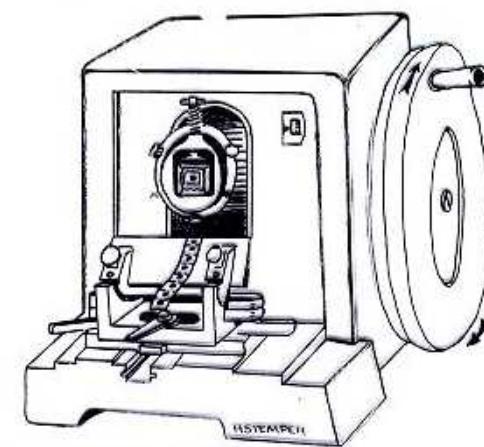


## 2. Processamento

- Processamento (desidratação, diafanização ou clarificação e emblocamento em parafina)



## 3. Microtomia



4. Sectioning with Microtome



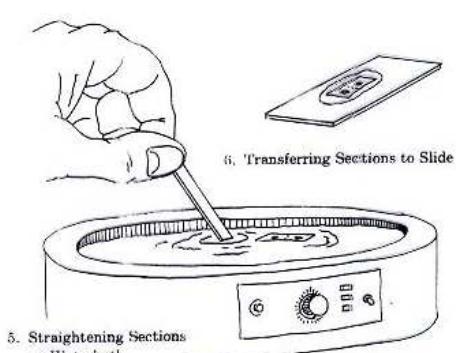
Drive wheel

Block holder

Paraffin block

Tissue

Steel knife



Montagem dos cortes

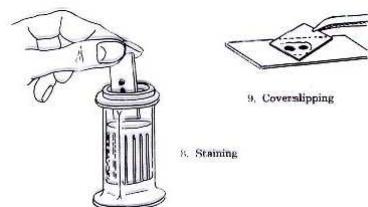


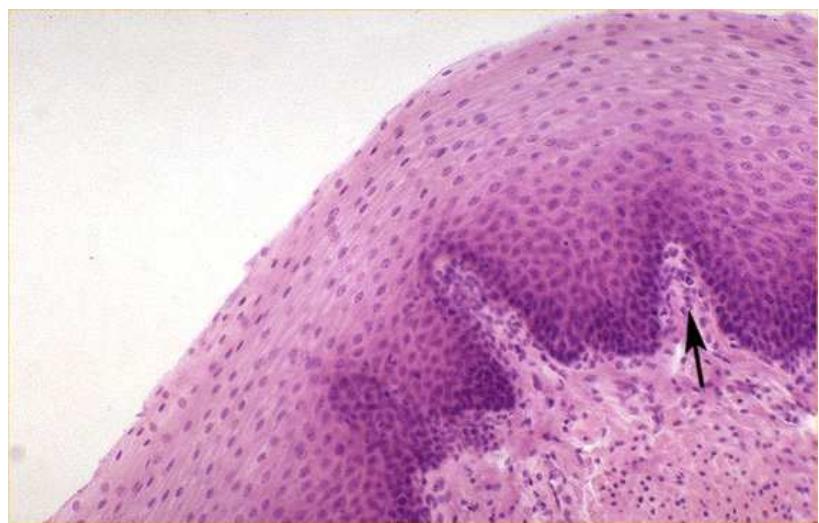
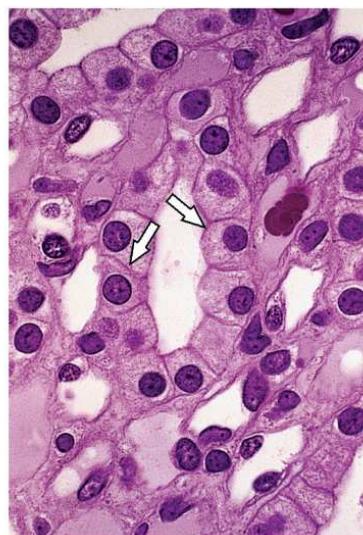
Secagem dos cortes

## 4. Coloração

### Hematoxilina e eosina (HE)

- hidratar os cortes
- hematoxilina de Mayer 8 min
- deixar os corte em água da torneira por 20 min
- eosina 0,5% 30 seg
- desidratar em sol de álcoois crescentes
- diafanizar xilog
- cobrir com bálsamo e lamínulas

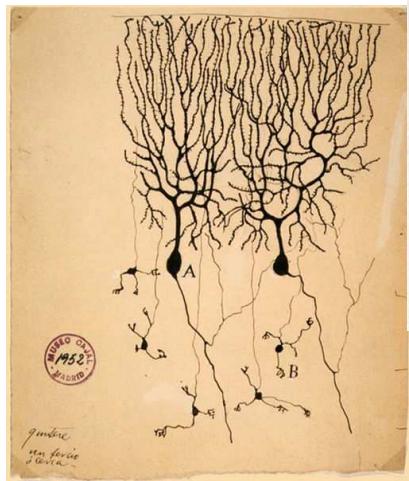




## Hematoxilina e eosina (HE)

Hematoxilina	roxo	Corante catiônico ou básico (+)	Cora estruturas ácidas (basófilas)	Núcleo (grupos fosfatos dos ácidos nucléicos)
Eosina	rosa	Corante aniónico ou ácido (-)	Cora estruturas básicas (acidófilas ou eosinófilas)	Citoplasma (radicais amino das proteínas)

## Técnica de Golgi



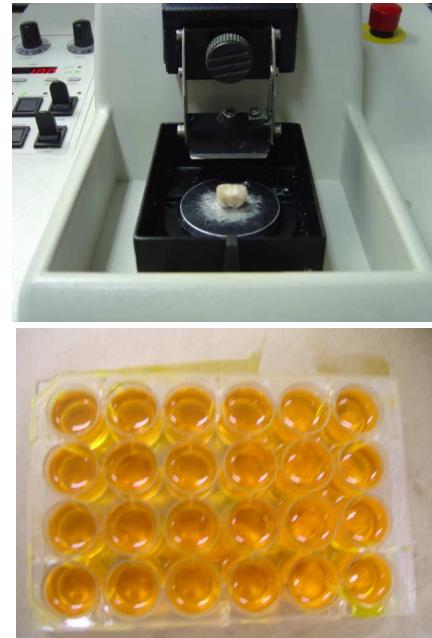
CAJAL, 1892



Nobel de Fisiologia e Medicina em 1906

## Cortes

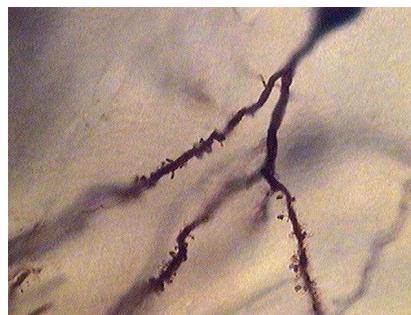
- Perfusion
- Vibratomo (cortes coronais de 200  $\mu$ m);
- Dicromato de potássio 3% por 24h;



- Lavados em água destilada, colocados em lamínulas – “sanduíches”;
- Nitrato de prata (1,5%);



- Lavados em água destilada;
- Montados em lâminas, cobertos com bálsamo do Canadá e lamínulas.

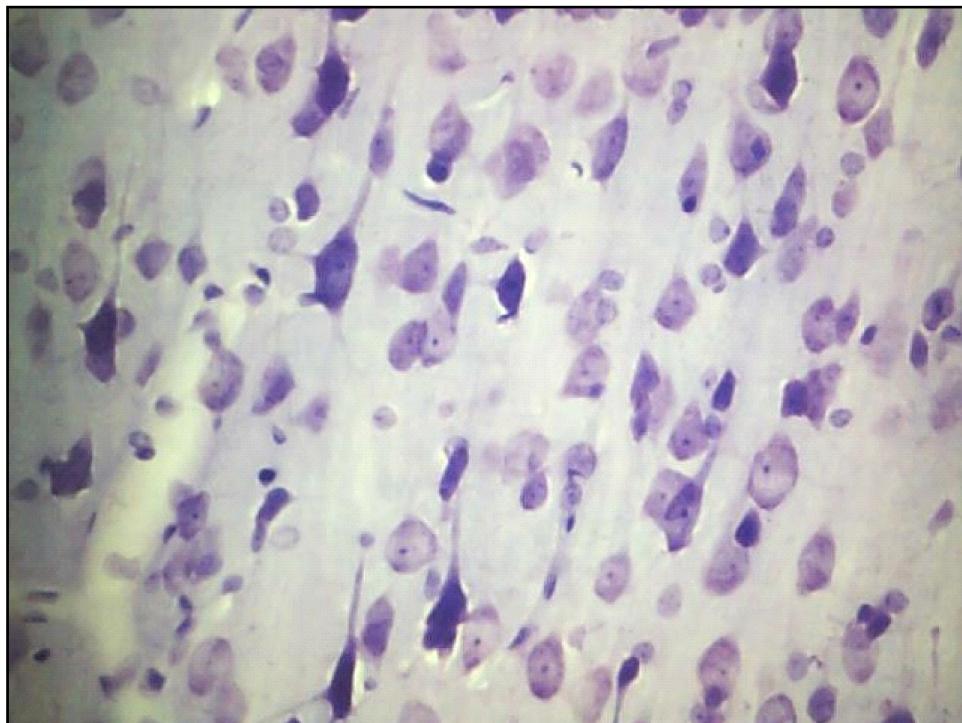


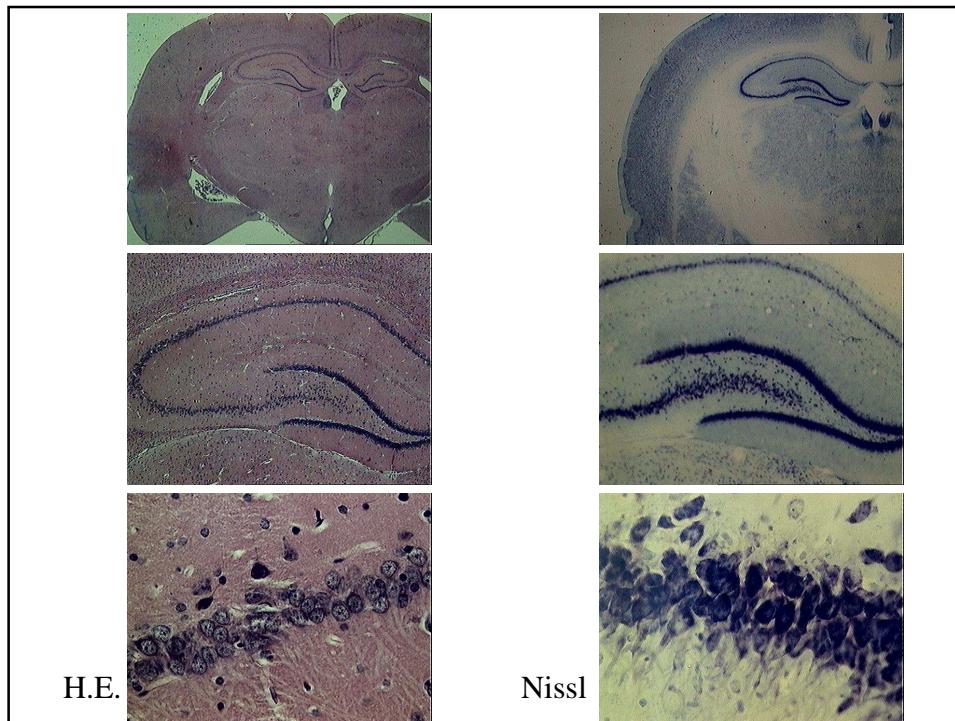
## Nissl

- Os **corpúsculos de Nissl** ou **grânulos de Nissl** ou também denominada **substância cromófila**, são acumulações basófilas, que se encontram no citoplasma de células nervosas. Recebem este nome devido a Franz Nissl, neurólogo alemão (1860-1919).
- Estes grânulos são retículo endoplasmático rugoso (com ribossomas) e são locais de síntese de proteínas

# Nissl

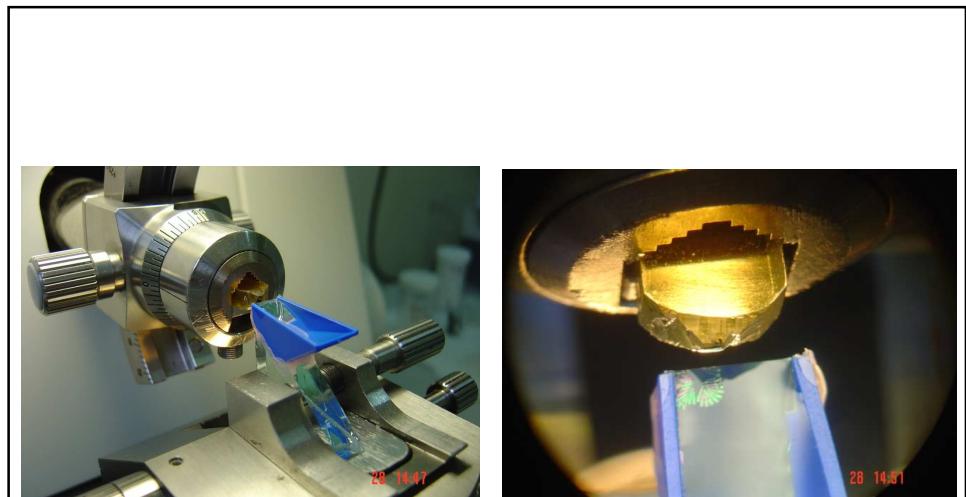
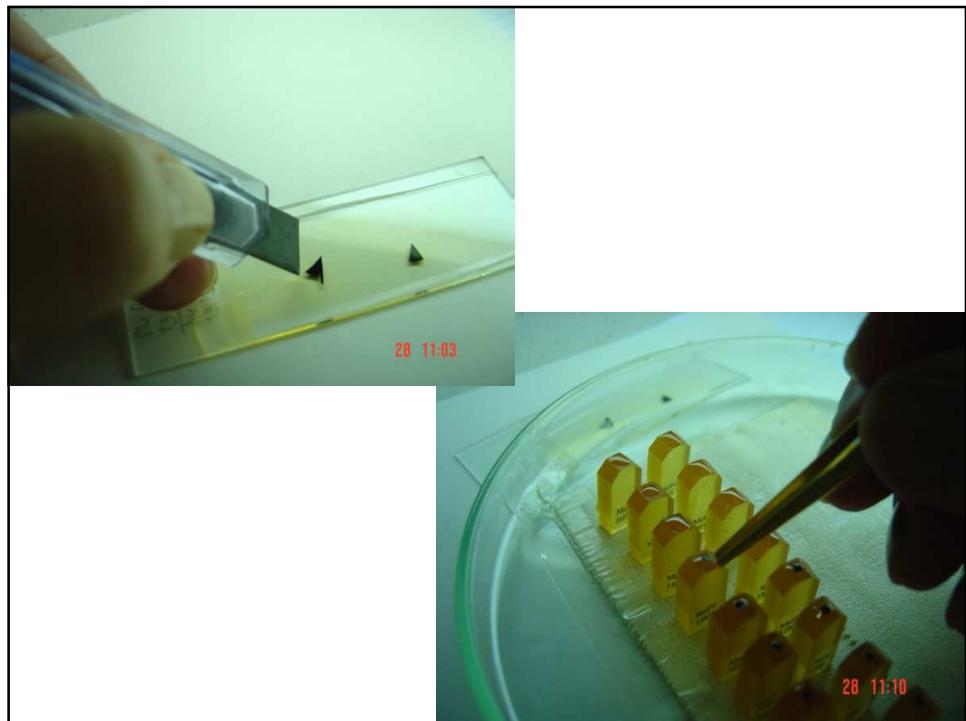
- **Coloração de Nissl – Cresil Violeta**
- Cresil violeta pó ..... 0,1g
- Água deionizada ..... 100ml
- Misturar bem e filtrar. Adicionar 15 gotas de ácido acético a 10%.
- **Procedimento:**
- Desparafinar os cortes, ou hidratá-los se forem cortes em vibratomo.
- Aquecer o cresil violeta em estufa a 60°C por 10 m inutos, na cuba onde serão colocadas as lâminas.
- Colocar poucas lâminas de cada vez (5 no máximo) no corante e levar novamente à estufa por 5 a 10 minutos (ficam fortemente corados).
- **Para diferenciação e montagem:**
- Álcool 96% com 6 gotas de ácido acético: colocar as lâminas para diferenciação da cor, 5 a 10 segundos ou até alcançar a cor adequada. Olhar em microscópio. Este processo deve ser rápido para não ressecar os cortes. Não descorar demais nesta etapa porque haverá descoloração nas próximas.
- Álcool 96% puro: deixar as lâminas por alguns segundos observando sempre a coloração.
- Álcool 96%: mesmo procedimento.
- Álcool 100%: para desidratar. Mesmo cuidado que antes.
- Álcool 100%: idem.
- Os próximos passos devem ser realizados na capela:
- Levar a última cuba de álcool 100% para capela para montagem da lâmina.
- Secar bem a lâmina com papel absorvente, sem esfregar e colocar na cuba com toluol. Deixar poucos segundos para não desidratar demais. Passar sempre uma lâmina de cada vez para o toluol, as demais deixar no álcool. Usar resina Damar diluída (bem líquida) em toluol. Pingar de 2 a 3 gotas sobre a lâmina e montar com lamination. Deixar secar por 2 a 3 dias.



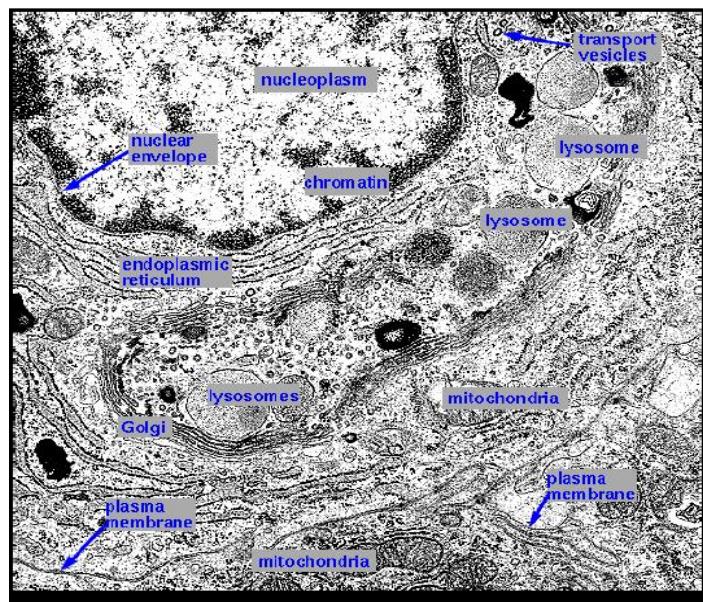


## Microscopia eletrônica

- Perfusion: paraformaldeído 4% e **glutaraldeído 1,5%**, diluídos em tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4)
- Lavagem PBS **30 min (3X)**
- Pós-fixação em OsO<sub>4</sub> 1% **1 hora**
- Lavagem PBS **15 min (3X)**
- Desidratação:
  - Álcool 50% **5 min (2X)**
  - Álcool 70% **10 min (2X)**
  - Álcool 96% **20 min (2X)**
  - Álcool 100% **20 min (2X)**
- Imersão em óxido de propileno **5 min**
  - Imersão em óxido de propileno + DURCUPAN **10 min**
  - DURCUPAN **24 hs** (vácuo)
- Polimerização em lâminas cobertas com DURCUPAN em estufa 60°C **48 hs**



- Cortes semifinos, montados em lâminas
- Corados com azul de toluidina 1% diluído em tetraborato de sódio 1%
- Analisados no microscópio óptico



## Imunoistoquímica

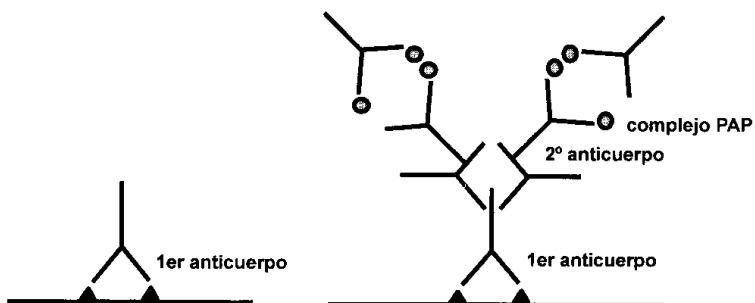


Fig. 5.- Peroxidasa-antiperoxidasa. Unión de las tres capas: anticuerpo primario, secundario y complejo PAP.

M. A. Peinado; J. A. Pedrosa; J. Rodrigo (Eds.)

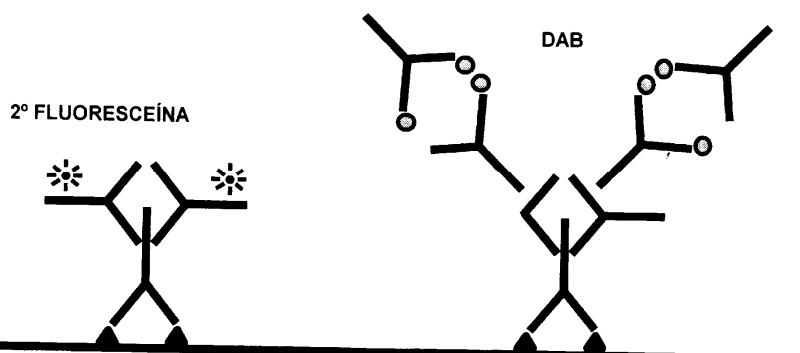
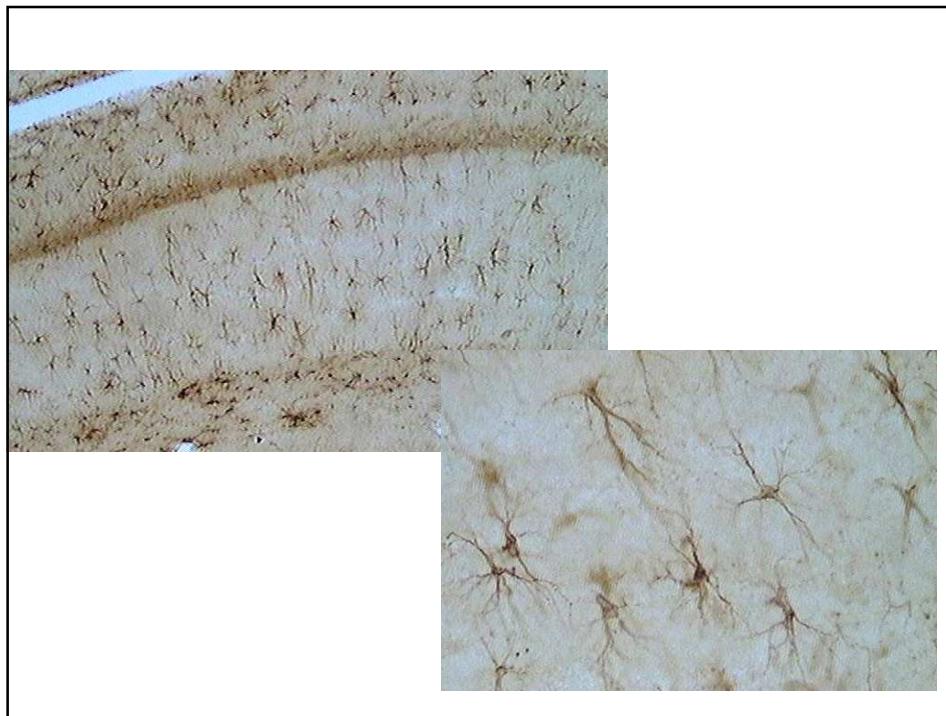
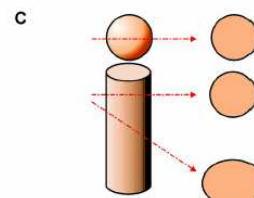
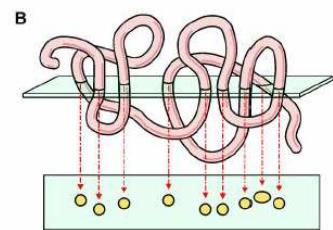
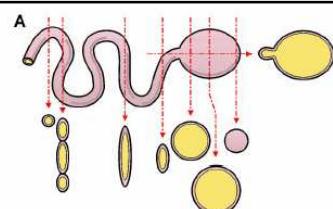


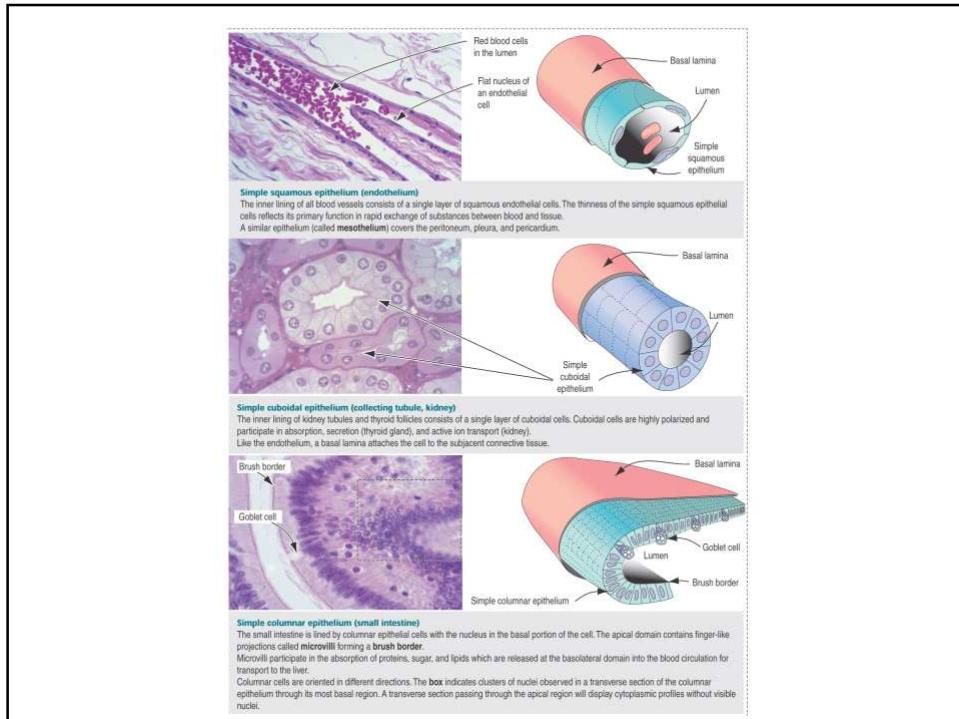
Fig. 8.- Doble marcaje usando inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa.

- 3) Incubar en la segunda capa conjugada a fluoresceína, correspondiente a uno de los anticuerpos primarios usados como primera capa.
- 4) Lavar en TFS.
- 5) Montar en glicerina/TFS y fotografiar las zonas de interés.



## Interpretação





## Morfología celular

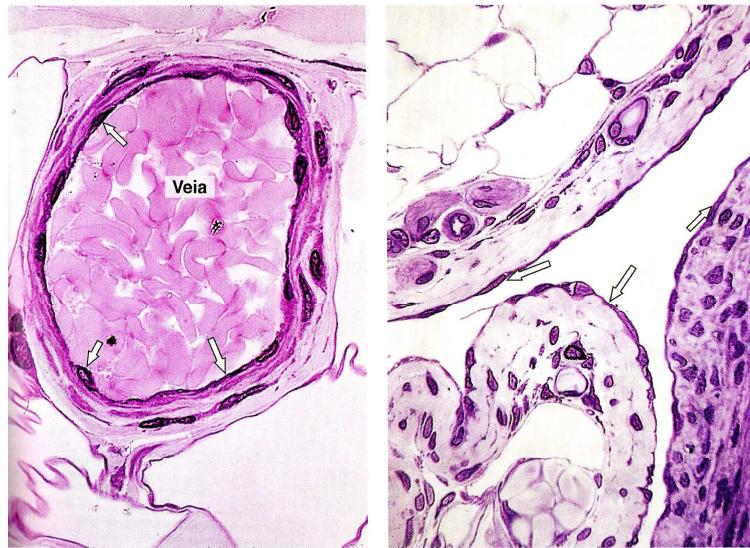
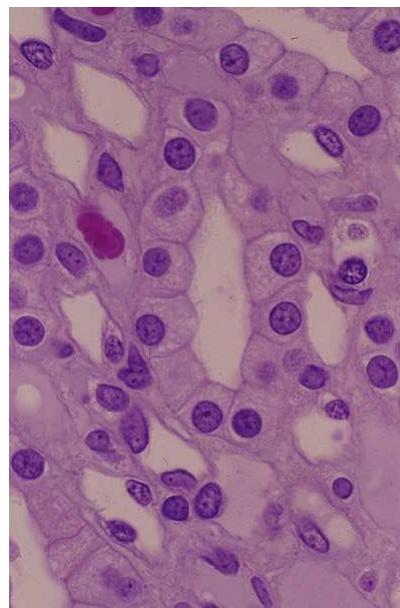


Fig. 4.13 Secção de uma veia. Todos os vasos sanguíneos são revestidos por um epitélio simples pavimentoso chamado endotélio (setas). Pararrosanilina-toluidina. Aumento médio.

Fig. 4.14 O epitélio simples pavimentoso que reveste as grandes cavidades do corpo (pleura, peritônio, pericárdio) é chamado mesotélio (setas). Pararrosanilina-toluidina. Aumento médio.



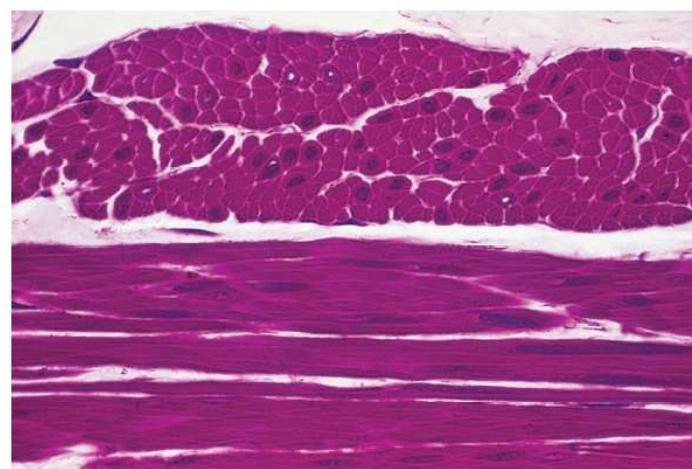
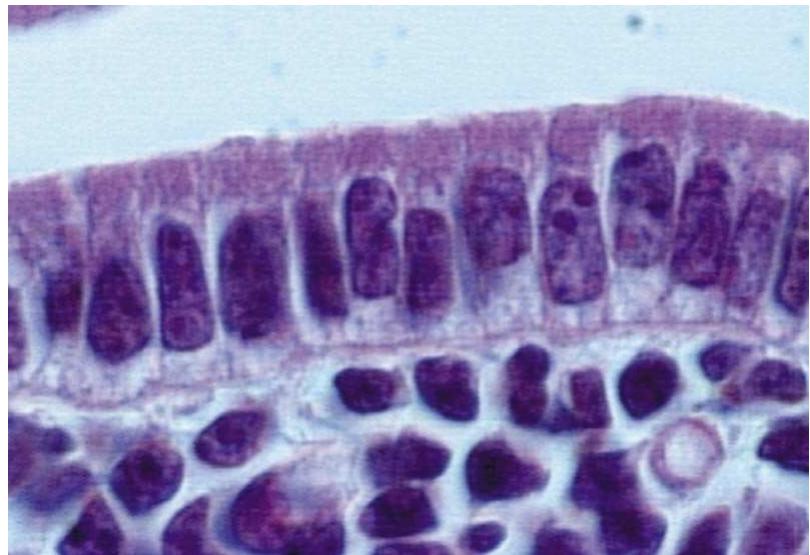


Fig. 10.29 Fotomicrografia de células musculares lisas em corte transversal (acima) e em corte longitudinal (embaixo). Notar que os núcleos se localizam no centro das células. Os núcleos de muitas células não foram incluídos no corte. Coloração pela pararrosanilina e azul-de-toluidina. Aumento médio.

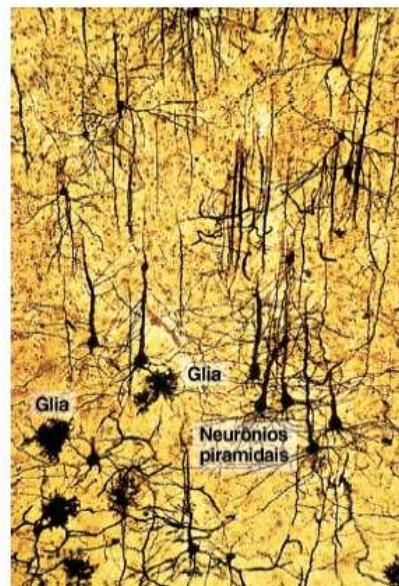


Fig. 9.18 Corte do córtex cerebral impregnado pela prata, mostrando muitos neurônios de forma piramidal, seus prolongamentos e algumas células da neuroglia. Aumento médio.

**Tabela 4.1** Características principais dos quatro tipos básicos de tecidos

Tecido	Células	Matriz Extracelular	Funções Principais
Nervoso	Longos prolongamentos	Nenhuma	Transmissão de impulsos nervosos
Epitelial	Células poliédricas justapostas	Pequena quantidade	Revestimento da superfície ou de cavidades do corpo, secreção
Muscular	Células alongadas contráteis	Quantidade moderada	Movimento
Conjuntivo	Vários tipos de células fixas e migratórias	Abundante	Apoio e proteção

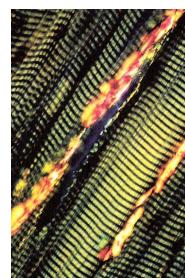
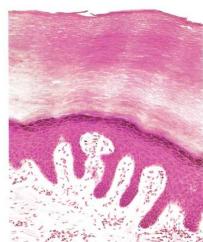
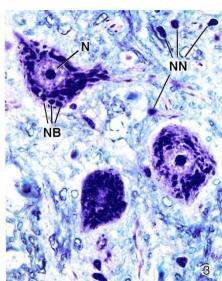


Fig. 14.2 Micrografia óptica de pele espessa (132X). Observar a epiderme e a derme, assim como as cristas dérmicas entrechegadas com as cristas epidérmicas.