

Técnicas histológicas adaptadas para tecidos de ratos

Histological processing: adapted techniques for rat tissues

José Carlos do Nascimento^{†,‡,||,O*}, Igor Luiz Souza da Cruz^{‡,§,□,•}, Paula Pitta de Resende Côrtes^{||}, Marise Maleck^{‡,§,||,□}

Como citar esse artigo. do Nascimento, J.C.; Cruz, I.L.S.; Côrtes, P.P.R.; Maleck, M. Técnicas histológicas adaptadas para tecidos de ratos. Revista de Saúde. 2020 Jan./Jun.; 11 (1): 25-28.

Resumo

Histologia é o ramo da anatomia que estuda os tecidos animais e vegetais. Para a análise das microestruturas anatômicas dos tecidos de ratos sob microscopia óptica é necessária a confecção de lâminas histológicas. O objetivo deste trabalho foi demonstrar as adaptações realizadas dentro de cada etapa do processamento histológico comumente utilizado, para os tecidos de ratos da linhagem *Wistar*, a fim de melhor preparo e conseqüentemente melhor visualização das estruturas dos tecidos moles, nas aulas práticas de histologia, dos Cursos da Saúde, da Universidade de Vassouras. Neste estudo, as adaptações realizadas nas técnicas histológicas mostram-se mais eficientes e específicas, no reconhecimento das características morfológicas dos tecidos moles de ratos, o que favorece um melhor diagnóstico histológico para este modelo de estudo.

Palavras-chave: Técnicas histológicas, *Rattus norvegicus*, Microscopia óptica.

Abstract

Histology is a branch of microscopic anatomy that studies animal and plant tissues. To analyze the anatomical microstructures of the rat tissues under an optical microscopy it is necessary to produce histological slides. The aim of this study was to demonstrate the adaptations within each stage of the commonly used histological processing, for the tissues of Wistar rats, in order to better prepare and consequently achieve a clear view of the soft tissue structures, used in practical histology classes, from Health Courses, at the University of Vassouras. In this study, those histological techniques adaptations were more efficient and specific in recognizing morphological characteristics of the soft tissues of rats, therefore it is beneficial to a better histological diagnosis for this study model.

Keywords: Histological techniques, *Rattus norvegicus*, Optical microscopy.

Introdução

Estudos histológicos são de extrema importância no reconhecimento de estruturas e características morfológicas de tecidos animais e vegetais, uma vez que se organizam e se relacionam para compor diferentes organismos¹.

A separação dos tecidos em estruturas distintas com fins acadêmico-didático é utilizada na melhor compreensão de suas características principais. Com este estudo das características individuais pode-se entender e avaliar a histologia nos diferentes órgãos e como os diferentes tecidos se inter-relacionam de maneira

dinâmica. Vários são os procedimentos de preparados histológicos de órgãos retirados de um organismo que incluem: coleta do material, clivagem, fixação, desidratação, diafanização, inclusão, microtomia, coloração e montagem da lâmina. Assim como os protocolos desses procedimentos variam de acordo o tipo do espécime biológico, o tipo de tecido, etc.¹

Na técnica de processamento histológico, os reagentes, como o formol, álcool, xilol e parafina, são essenciais para os procedimentos de fixação, desidratação, diafanização e impregnação². Nestas etapas de processamento são incluídas adaptações que podem variar como o tempo de exposição a um determinado produto químico, a retirada de um determinado produto

Afiliação dos autores: [†] Laboratório de Técnicas Histológicas/Patologia, Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

[‡] Mestrado Profissional em Ciências Ambientais, Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

[§] Laboratório de Insetos Vetores, Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

^{||} Pró-Reitoria de Ciências Médicas, Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

^O Pró-Reitoria de Ciências da Saúde, Universidade de Vassouras, Vassouras, Rio de Janeiro, Brasil.

[□] Laboratório de Entomologia Médica e Forense, IOC - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

[•] Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

* Email de correspondência: josecarlosdonascimento28@gmail.com

Recebido em: 04/10/19. Aceito em: 04/05/20.

ou o acréscimo de mais produtos, bem como a diluição de produtos para cada tipo de material, estas adaptações podem variar de acordo com o material em estudo e são acrescidas através de testes visando a preservação e a qualidade do material. Os protocolos utilizados na rotina de diagnóstico de um laboratório de patologia, geralmente são baseados na técnica de coloração em hematoxilina e eosina (H&E), e sofrem adequações de acordo com o material estudado^{3,4}. Uma das adaptações, que influencia diretamente na visualização das demais estruturas durante a leitura da lâmina, é o tempo de exposição do fragmento de tecido a cada uma dessas soluções químicas⁵.

O *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), nativo de regiões da Ásia Central, seguiu o homem em sua passagem pelos continentes, sendo encontrado em praticamente todas as localidades. Possivelmente, esse animal foi a primeira espécie de mamífero domesticada para fins científicos, já que é descrito desde o início do século XX em pesquisas nutricionais⁶. Atualmente pode-se dizer que 80% dos animais experimentais são roedores, como os camundongos, ratos e cobaias⁷.

Diferentes procedimentos são abordados na literatura sobre as técnicas histológicas, e este estudo buscou mostrar adaptações nas etapas do processo de preparo de lâminas na proposta de facilitar didaticamente o diagnóstico histológico em tecidos moles de ratos.

Material e Métodos

Neste estudo foi utilizado como modelo, roedores da linhagem *outbred Wistar* (espécie *Rattus norvegicus*), do Biotério Central da Universidade de Vassouras. Para os procedimentos histológicos foi selecionado como órgão em estudo a língua de *R. norvegicus*. Os animais foram anestesiados e eutanasiados, de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA (nº 014/2016). Posteriormente foi realizada uma incisão longitudinal na região abdominal, torácica e craniana dos animais, e o órgão de interesse coletado com um tempo máximo de 10 minutos, afim de evitar a perda de oxigenação e assim diminuir a possibilidade de danos ao material. Após a coleta, o órgão foi identificado e registrado, de acordo com as normas de rotina do Laboratório de Técnicas Histológicas/Patologia da Universidade de Vassouras.

Este material foi imediatamente fixado, em uma primeira etapa, em formaldeído a 4%, para retirar o excesso de sangue e avaliado macroscopicamente, para os devidos planos de cortes. A clivagem do material foi realizada e estes fragmentos acondicionados em cassete histológico contendo formaldeído a 4% durante 48h, em temperatura ambiente.

O material fixado foi encaminhado ao processo de segmentação, que comporta as fases de desidratação,

diafanização e impregnação em parafina. Inicialmente o mesmo foi acondicionado em recipiente contendo água destilada por 10 minutos, para retirada do excesso do fixador. Após esta etapa iniciou-se o processo de desidratação, conforme metodologia de Junqueira⁸ adaptada e modificada, em cinco fases, com a utilização de álcool etílico em diferentes concentrações, a 50%, 70%, 92,8%. Para concluir a etapa de desidratação dos fragmentos foram utilizadas 2 sequências de álcool etílico absoluto (P.A).

Antes da etapa de diafanização dos fragmentos usou-se um xilol/álcool (álcool etílico absoluto P.A 50% e xilol P.A. 50%), na proporção de 1:1, em recipiente de âmbar, por 30 minutos, a fim de evitar a retração e possíveis danos ao material, como o rompimento de estruturas.

Em seguida, seguiu-se ao processo de diafanização, com a utilização de xilol P.A., 2X/1h cada separadamente.

Na etapa de inclusão do material usou-se três parafinas líquidas acrescidas de 10% de cera de abelhas em estufa a 60 °C por 2h. Os fragmentos foram submetidos a imersão na seguinte ordem: a parafina 1/ 20 min., a parafina 2/ 40 min. e parafina 3/ 1h. Após este período de 2h de tratamento em parafina histológica, realizou-se a completa retirada do xilol e a sua substituição pela parafina.

Em sequência, os fragmentos foram posicionados em moldes de inclusão e armazenados sobre uma placa refrigeradora a -10 °C/ 20 min., para a solidificação da parafina. Os blocos, já solidificados, são retirados do molde e novamente levados a -10 °C.

A microtomia foi realizada em Micrótomo (SPENCER®, modelo 820) ajustado para 3µ, com adaptador de navalha. Os cortes selecionados foram retirados e colocados em banho-maria, em fundo preto, com água destilada a 38 ± 2 °C.

Todo o material foi fixado em lâminas de ponta fosca, identificados e armazenados em temperatura ambiente, durante 24 h, seguida de estufa a 60 °C/1h, para completa secagem e fixação do material.

Na etapa de coloração, o material foi inicialmente desparafinado utilizando-se 3 fases de xilol (3 min./ cada). Seguiu-se um processo de hidratação com uma sequência decrescente de álcool etílico (3 min./cada), 99,8%, 92,8%, 70%, 50% e por fim água destilada por 5 min. A coloração foi realizada por Hematoxilina: Eosina⁷, com hematoxilina/3 min., seguida de lavagem com água destilada/5 min.; mergulho em ácido acético P. A. /1 seg., e em água destilada/ 5 min. Este material foi submetido a álcool etílico absoluto P.A./3 min., como preparo para a coloração com eosina/3 min. Em sequência desidratou-se com álcool etílico em concentrações crescentes (3 min./cada), a 50%, 70%, 92,8% e 99,8%. Novamente foi realizado o processo de diafanização com a utilização de 3 fases de xilol/3 min.,

para clarificação e remoção do álcool.

A montagem do material foi realizada de acordo com as técnicas descritas por Junqueira⁸, e utilizou-se como fixador da lâmina-lâminula o Bálsamo do Canadá, extraído da *Abies balsamea* (Pinaceae), devido a sua qualidade de fixação, e durabilidade indicada para lâminas permanentes.

Resultados

As adaptações realizadas neste estudo sobre as técnicas histológicas para ratos começou na descrição da primeira etapa, com a fixação do material, a partir da utilização de formol (4%) a temperatura ambiente. Seguiu-se da técnica de adição de uma fase de álcool etílico (99,8%) e de sua exposição por 1h, na etapa de desidratação do material.

Importante adaptação na técnica foi a inserção de uma fase intermediária entre as etapas de desidratação e diafanização. Na etapa de diafanização, propriamente dita utilizou-se duas passagens de xilol/1h.

A etapa de impregnação do material em parafina foi acrescida em 1h, para total retirada do xilol e sua substituição por parafina. Neste estudo, também foram realizadas adaptações no tempo de secagem da lâmina para 24h, a temperatura ambiente, e 1h em estufa a 60

°C, antes do processo de coloração.

As maiores alterações realizadas nas técnicas histológicas, ocorreram na coloração das lâminas. Neste processo, incluiu-se um aumento do tempo de exposição do material ao xilol (3 min/cada) na retirada da parafina; do álcool etílico (3 min./cada) na fase de desidratação; a utilização de água destilada/5 min. para completa reidratação do material. O uso de ácido acético/1s para a diferenciação; o uso de álcool etílico absoluto antes da eosina. E aumento da exposição do material a uma sequência crescente de álcool para a desidratação. Na diafanização acresceu-se 2 min. para completa clarificação e remoção do álcool.

O processamento histológico conforme as técnicas normalmente utilizadas e descritas na literatura, apresenta uma lâmina com um menor grau de refinamento nas estruturas do órgão em estudo (Figura 1A). As adaptações realizadas, nas mesmas técnicas, no preparo do material (língua), demonstrou uma qualidade superior as anteriormente utilizadas, com definições de detalhes o que permitiu evidenciar com mais nitidez as suas características, com uma coloração mais apurada e principalmente com menor perda estrutural no arranjo final, o que favoreceu o diagnóstico histológico (Figura 1B).

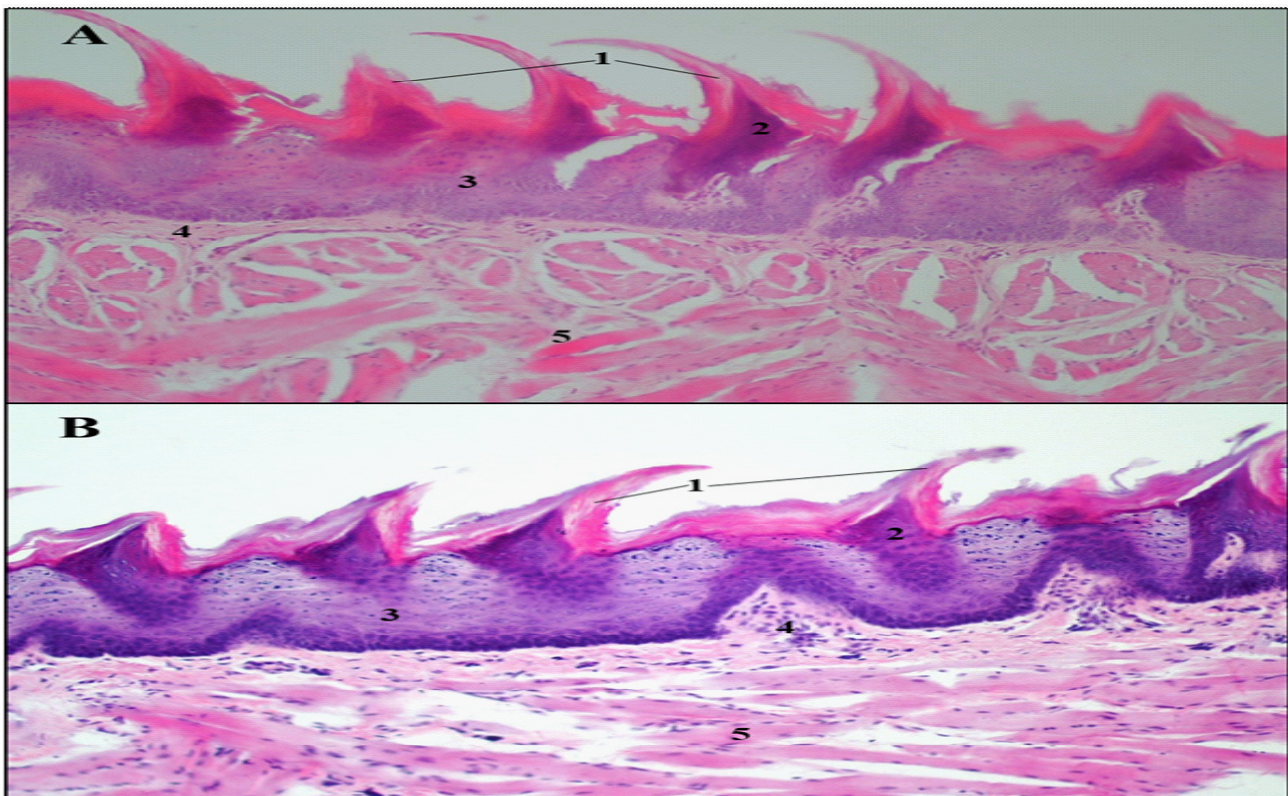


Figura 1: Face dorsal papilas filiformes, técnica sem adaptações (A) e técnica com adaptações (B). 1- Queratina; 2- Papila filiforme; 3- Tecido epitelial de revestimento; 4- Lâmina própria; 5- Tecido muscular estriado esquelético.

Discussão

As adaptações realizadas na técnica histológica, neste estudo, mostraram resultados mais eficientes na visualização das estruturas histológicas dos órgãos dos ratos, quando comparadas as demonstradas pelas técnicas já descritas⁸.

Observou-se que a fixação realizada com formol a 4%/temperatura ambiente demonstrou uma fixação mais lenta, o que possibilitou uma melhor preservação das estruturas do material. Quanto ao processo de desidratação este demonstrou melhor desempenho na retirada da água e sua substituição pelo álcool. Na etapa de diafanização observou-se uma melhor clarificação e remoção do álcool. A utilização de 2h de exposição do material em estufa a 60 °C possibilitou total remoção do xilol, fase de extrema importância no preparo do bloco.

Seguindo para a coloração que obteve o maior número de adaptações em comparação as técnicas já descritas⁸ observou-se que as lâminas preparadas apresentaram um melhor resultado, com riqueza de detalhes, cortes bem definidos, colorações com nitidez e contraste de hematoxilina e eosina quando comparados com a técnica de Timm⁹.

Estas modificações de resultados ocorrem de acordo com o tipo de material estudado. Para o material humano existem técnicas rotineiras eficientes⁸, porém de acordo com o espécime biológico, adaptações precisam ser realizadas. Neste estudo, se fez necessário criar adaptações em cada etapa do processamento histológico para refinar a qualidade do produto. Com os métodos já descritos na literatura⁸, observava-se, no material em estudo, perda de estruturas, deficiência de detalhes e desequilíbrio de nitidez. Com as modificações propostas neste estudo quanto ao processamento histológico em tecido de rato, as alterações realizadas mostraram resultados bastante favoráveis para o entendimento das estruturas analisadas em todas as amplitudes.

Considerações Finais

As modificações realizadas no processamento histológico, mostrou-se mais eficiente no reconhecimento das estruturas histológicas, rica em detalhes e melhor definidas, no modelo em estudo, órgão (língua) de *R. norvegicus*, o que possibilitou evidenciar com clareza e nitidez as suas características morfológicas e deste modo prover, para fins didáticos, um favorável diagnóstico histológico. Neste estudo observou-se que pequenas alterações nas etapas da técnica de preparação histológica, como a inserção de produtos ou adaptação nos tempos destes produtos podem modificar todo o preparo e conseqüentemente a qualidade do material.

Agradecimentos

O presente estudo foi realizado com apoio da Fundação Educacional Severino Sombra (FUSVE) e com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Comitê de Ética

Conforme Protocolo para Registro de Projetos e Afins recebidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais nº 014/2016.

Referências

1. Souza DS, Medrado L, Gitirana LB. Histologia. In: Molinário E, Caputo, LFG, Amendoeira MRR, organizadores. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC; 2010. p 43-88.
2. Metgud R, Astekar MS, Soni A, Naik S, Vanishree M. Conventional xylene and xylene-free methods for routine histopathological preparation of tissue sections. *Biotech Histochem* 2013;88(5):235-41.
3. Falkeholm L, Grant CA, Magnusson A, Möller E. Xylene-Free Method for Histological Preparation: A Multicentre Evaluation. *Lab Invest* 2001;81(9):1213-221.
4. Ankle MR, Joshi PS. A study to evaluate the efficacy of xylene-free hematoxylin and eosin staining procedure as compared to the conventional hematoxylin and eosin staining: An experimental study. *J Oral Maxillofac Pathol* 2011;15(2):161-67.
5. Alves AC. Histologia da medula óssea. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2009;31(3):183-88.
6. Ankeny RA, Leonelli S, Nelson NC, Ramsden E. Making Organisms Model Human Behavior: Situated Models in North American Alcohol Research, since 1950. *Sci Context* 2014;27(3):485-509.
7. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação? *ABCD: Arq Bras Cir Dig* 2012;25(1):49-51.
8. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica: texto e atlas*. 12ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2013.
9. Timm LL. Técnicas Rotineiras de Preparação e Análise de Lâminas Histológicas. *Cad Salle XI* 2005;2 (1):231-39.