

**FACULDADES INTEGRADAS FAFIBE**  
**CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**  
**JOSÉ CARLOS DE SOUZA JUNIOR**

**CONTROLE DE QUALIDADE EM LÂMINAS HISTOLÓGICAS:  
IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA DE H/E NO  
DIAGNÓSTICO MÉDICO**

**BEBEDOURO**

**2010**

**FACULDADES INTEGRADAS FAFIBE**

**JOSÉ CARLOS DE SOUZA JUNIOR**

**CONTROLE DE QUALIDADE EM LÂMINAS HISTOLÓGICAS:  
IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA DE H/E NO  
DIAGNÓSTICO MÉDICO.**

Trabalho apresentado ao Curso de Ciências Biológicas, das Faculdades Integradas Fafibe, sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Dellalibera-Joviliano, para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

**BEBEDOURO**

**2010**

**JOSÉ CARLOS DE SOUZA JUNIOR**

**CONTROLE DE QUALIDADE EM LÂMINAS HISTOLÓGICAS:  
IMPORTÂNCIA DA METODOLOGIA DE H/E NO  
DIAGNÓSTICO MÉDICO.**

**Banca Examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Renata Dellalibera –Joviliano**

---

**Prof<sup>a</sup>. Ms. Joaquim O. M. Souza Pinto**

---

**Prof<sup>a</sup>. Ms. Wellington Marcelo Queixas Moreira**

**Bebedouro, 24 de Novembro de 2010**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus!

Que me deu forças e iluminou meu caminho...

Aos meus familiares que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e comigo compartilham o término de mais uma etapa.

Aos meus amigos de sala de aula, presentes nesta caminhada de quatro anos, que por vez não foi fácil! Sempre levarei as melhores lembranças.

Aos professores que muito me ajudaram a concluir mais esta etapa da minha vida...

À minha orientadora: Profa. Dra. Renata Dellalibera-Joviliano que muito me ensinou

Ao coordenador Prof. Ms. Evaldo Guimarães e a banca examinadora Prof. Ms. Joaquim O. M. de Souza Pinto e Prof. Ms. Wellington Marcelo Queixas Moreira, fica aqui o meu MUITO OBRIGADO.

**“*EDUCAI* as crianças e *NÃO* será preciso *PUNIR* os homens”**

**(Aristóteles).**

## **RESUMO**

Existem vários métodos de estudos dos tecidos histológicos, desde análises denominadas *in vivo* até as que utilizam tecidos mortos. O método mais comum usado em histologia permite a obtenção de preparados permanentes (lâminas) para estudo ao microscópio óptico. É desejável avaliar ao microscópio um preparo no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição química que possuíam quando vivos. Para tanto, torna-se necessário um conjunto de etapas pelas quais os materiais de estudo precisam ser submetidos. Como objetivo proposto tais etapas foram revisadas no presente trabalho, sendo demonstrado que a padronização de procedimentos histológicos nos últimos anos garante a qualidade de lâminas coradas pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Houve uma adequação da infra-estrutura física dos laboratórios, o pessoal técnico esta sendo melhor selecionado e treinado. Os processos de coleta e conservação das amostras estão de acordo com metodologias implementadas por órgãos competentes e são obedecidos: tempo (máximo) de coleta após procedimento cirúrgico ou biópsia, acometimento da amostra em recipiente próprio contendo fixador em temperatura adequada, sendo o recipiente devidamente identificado. Há dispensadores automatizados para as etapas de desidratação, diafanização e infiltração em parafina, sendo sistemáticos os períodos de permanência das amostras em cada reagente. Os micrótomos são automatizados e garantem uma maior precisão na espessura dos cortes histológicos. Os reagentes químicos utilizados na coloração HE são padronizados, ou seja, têm qualidade comprovada. O sistema de limpeza de vidraria e manutenção dos equipamentos deste tipo de rotina laboratorial são realizados adequadamente, com visitas agendadas das empresas responsáveis. Presença de um manual de qualidade com documentação completa atualizada está disponível para todos os funcionários. Esses procedimentos garantem a produção de lâminas histológicas de boa qualidade que representam adequadamente as características do órgão em análise, propiciando um melhor diagnóstico em laboratórios de Patologia.

**Palavras-chave:** controle de qualidade, coloração histológica, Hematoxilina-Eosina

## **ABSTRACT**

There are several methods of histological studies of the biological tissues from the tests denominate *in vivo* to those using dead tissue. The most common method used in histology allows obtaining permanent preparations (slides) to study in optical microscope. It is desirable to observe in the microscope a preparation in which the tissues are well preserved, showing the same chemical composition and structure they had when alive. For this, it is necessary that the biological samples under study are subjected to a series of steps. Such steps are reviewed in this study and it was demonstrated that, in recent years, the standardization of histological procedures guarantees the quality of slides stained by hematoxylin-eosin (HE). There was an adaptation of the physical infrastructure of laboratories, the technicians are being better selected and trained. The processes of collection and preservation of samples are in accordance with methodologies implemented by competent institutions and are obeyed: time (maximum) of collection after surgery or biopsy, involvement of the samples in recipient containing fixative at the appropriate temperature and properly identified. There are automated dispensers for the dehydration, clearing and paraffin infiltration stages, being predetermined the time period in each reagent. The microtome is automated and ensures greater accuracy in the thickness of histological sections. The chemical reagents used in HE staining are standardized, ie, have proven quality. The system for cleaning glassware and maintenance of equipment in this routine laboratory type are performed properly, with scheduled visits of the responsible companies. Presence of a quality manual with complete documentation update is available to the technicians. These procedures ensure the production of histological slides of good quality that adequately represent the characteristics of the organ in question, providing a better diagnostic in pathology laboratories.

**Keywords:** quality control, histological staining, hematoxylin-eosin

## **LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 01:</b> Remoção de fragmento de fígado para realização de biópsia .....	10
<b>Figura 02:</b> Níveis de dissecação de materiais biológicos e respectivos procedimentos.....	14
<b>Figura 03:</b> (A1): Ilustração de um micrótomo rotativo manual onde são identificados seus principais componentes e de um banho histológico.....	15-16
<b>Figura 04:</b> Ilustração de método de coloração rápida com espalhamento de material líquido em lâmina feito manualmente.....	19
<b>Figura 05:</b> Análise de lâminas histológicas coradas pelo H/E no microscópio de luz.....	21
<b>Figura 06:</b> Imagens de lâminas coradas pelo H/E evidenciando núcleo e citoplasma celulares.....	21
<b>Figura 07:</b> Resumo das etapas necessárias para obtenção de lâminas histológicas.....	22

## SUMÁRIO

RESUMO .....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
I. INTRODUÇÃO .....	7
1. COLETA DA AMOSTRA.....	9
2. FIXAÇÃO E FIXADORES .....	10
3. DESIDRATAÇÃO .....	12
4. DIAFANIZAÇÃO .....	12
5. INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO.....	12
6. MICROTOMIA.....	15
7. DISTENSÃO DOS CORTES E TRANSFERÊNCIAS PARA AS LÂMINAS .....	16
8. COLORAÇÕES E REAÇÕES CITOQUÍMICAS .....	17
9. MEIOS DE MONTAGEM DE LÂMINAS .....	20
II. JUSTIFICATIVA .....	23
III. OBJETIVOS .....	24
IV. TÉCNICAS DE PREPARO .....	25
IV.1 EQUIPAMENTOS E OBJETOS GERAIS A SEREM UTILIZADOS NA PREPARAÇÃO DE DIVERSOS MÉTODOS HISTOLÓGICOS.....	25
IV.2 COLETA DO MATERIAL – ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	25
IV.3 MICROTOMIA – ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	27
IV.4 COLORAÇÃO POR HEMATOXILINA-EOSINA – ESTABELECIMENTO DE MÉTODO DE CONTROLE DE QUALIDADE.....	28
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	29
VI. REFERÊNCIAS .....	32



## **I. INTRODUÇÃO**

Histologia é o estudo da estrutura dos tecidos e de como eles se organizam para constituir órgãos. São reconhecidos quatro tecidos fundamentais: tecido epitelial, tecido conjuntivo, tecido muscular e tecido nervoso. Estes são constituídos por células e matriz extracelular, os quais antigamente eram considerados separadamente. Cada um dos tecidos fundamentais é formado por vários tipos celulares e geralmente por combinações específicas de células e matriz extracelular. Estas combinações são geralmente muito características e facilitam o reconhecimento dos muitos subtipos de tecidos. A maioria dos órgãos (exceto o sistema nervoso central, que é formado quase só de tecido nervoso) são formados por uma combinação organizada de vários tecidos. A combinação precisa destes tecidos permite o funcionamento de cada órgão e do organismo como um todo. O pequeno tamanho das células torna a histologia dependente do uso de microscópios (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

No final do século XIX, microscopistas desenvolveram um método singular para a análise da fina estrutura de amostras biológicas: inclusão em parafina e coloração com hematoxilina e eosina. Esta tecnologia antiga está aqui para ficar para o futuro próximo, porque ela auxilia a revelar a verdade sobre os processos biológicos. Mesmo nestes dias de modificação genética, proteômica e rastreamentos em larga escala, patologistas continuam utilizar corantes extraídos na América Central, mais precisamente no México antes da invasão espanhola em 1520 (FINCH, 2005).

A coloração é a operação pela qual os tecidos são submetidos à ação de substâncias capazes de corar os seus componentes (MICHALANY, 1980). Os corantes são especialmente úteis e a informação obtida é maximizada quando os mecanismos que governam as suas propriedades corantes são compreendidos. Os componentes celulares básicos reagem com os corantes ácidos, através da reação de neutralização, como ocorre com a eosina (corante ácido) que cora de róseo ou vermelho o citoplasma celular (componente básico). Da mesma forma ocorre com a hematoxilina (corante básico), que confere a cor púrpura-azulada (roxo) à cromatina nuclear (componente ácido) (BANKS, 1992). Em um tecido típico, os núcleos são corados de azul, enquanto o citoplasma e a matriz extracelular têm graus variados

de coloração rosa. As células, quando bem fixadas, apresentam detalhes intranucleares consideráveis após a coloração. A forma nuclear difere entre os tipos celulares e padrões específicos de câncer apresentam condensação da heterocromatina típica (coloração por hematoxilina), que são muito importantes para diagnóstico. A zona de Golgi pode ser identificada pela ausência de coloração em uma região próxima ao núcleo. Assim, a coloração divulga informações estruturais, com implicações funcionais específicas (FISHER et al., 2006).

A coloração por H/E tem sido utilizada por pelo menos há um século e ainda é essencial para o reconhecimento de diversos tipos de tecidos e as alterações morfológicas que formam a base do diagnóstico contemporâneo de câncer. A técnica foi inalterada por muitos anos porque responde bem a uma variedade de fixadores e revela aspectos do citoplasma e núcleo celular e, também, da matriz extracelular (FISHER et al., 2006).

A histologia é fundamental para as ciências biológicas e médicas, uma vez que se situa na intersecção entre a bioquímica, a biologia molecular e a fisiologia, de um lado, e os processos patológicos e seus efeitos, de outro (STEVENS e LOWE, 2001).

Vários são os métodos de estudos dos tecidos, variando de análises denominadas *in vivo* até as que utilizam tecidos mortos. O método mais comum usado em histologia permite a obtenção de preparados permanentes (lâminas) para estudo ao microscópio óptico. Nesse instrumento os objetos são examinados por transparência e, como órgãos muito delgados são raros, a maioria precisa ser reduzida a cortes finos, suficientemente transparentes para serem examinados ao microscópio. Estes cortes são feitos com um equipamento denominado micrótomo, mas antes de serem cortados os tecidos devem passar por uma série de tratamentos (KIERNAN, 1989; TOLOSA et al., 2005).

A fim de evitar a destruição das células por suas próprias enzimas, ou por bactérias, os tecidos removidos devem ser adequadamente processados imediatamente após a sua retirada. Esse tratamento é denominado fixação e pode ser feito por substâncias químicas, ou menos frequentemente, por métodos físicos. A principal função dos fixadores é tornar insolúveis as proteínas dos tecidos. Obviamente, o que se deseja avaliar ao microscópio é um preparo no qual os tecidos estejam perfeitamente preservados, apresentando a mesma estrutura e composição

química que possuíam quando vivos (VALLE, 2001; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Para isso, torna-se necessário um conjunto de etapas pelas quais os materiais de estudo precisam passar.

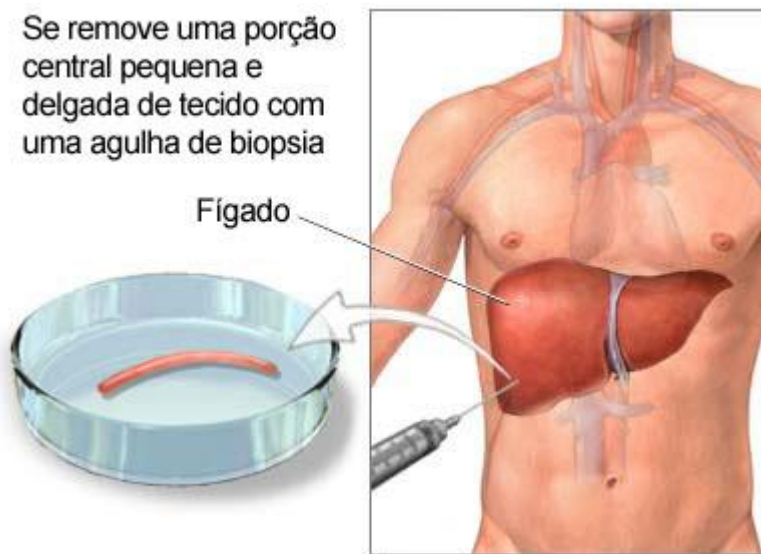
Seqüencialmente, tais etapas correspondem a:

### **1. Coleta da Amostra**

A primeira etapa de todo o processo de preparação de uma lâmina histológica consiste em coletar a amostra, ou seja, obtê-la e isto pode ser feito de cinco diferentes maneiras:

- a) Biópsia cirúrgica – obtenção da amostra de tecido ou órgão através de uma incisão cirúrgica;
- b) Biópsia endoscópica – usada para órgãos ocos (estômago, intestino, etc) através de endoscopia;
- c) Biópsia por agulha – a amostra (cilindro) é obtida pela punção do órgão (fígado, pulmão), sem precisar abrir a cavidade natural;
- d) Cirurgias amplas (radicais) – a amostra corresponde a peças grandes (ex. tumores) ou órgãos (ex. mama, útero);
- e) Necrópsia – procedimento utilizado para estudo anatômico de todos os órgãos ou tecidos, no organismo morto (HENRY, 1999).

A retirada dos órgãos de animal após o óbito ou peças cirúrgicas humanas deve ser feita rapidamente para evitar a autólise dos tecidos, e o fragmento deve ser colocado em uma solução fixadora. As peças cirúrgicas grandes ou de autópsia devem ser clivadas previamente para reduzir sua espessura permitindo a penetração fácil do fixador (Figura 1).



**Figura 01:** Demonstração de remoção de fragmento de fígado para realização de biópsia (fonte: <http://www.iged.com.br/imagens/servicos/figado-Biopsia01.jpg>).

## 2. Fixação e Fixadores

A fixação é um processo que impede a autólise do tecido e evita que ele se deteriore pela ação bacteriana, podendo ser física (utilizando-se o calor ou o frio) ou química. Na fixação química os tecidos são geralmente imersos em soluções de agentes denaturantes ou de agentes que estabilizam as moléculas formando pontes com moléculas vizinhas. Os tecidos devem ser cortados em fragmentos pequenos antes de serem imersos no fixador para que ocorra uma melhor difusão deste pelo tecido, garantindo a preservação das estruturas. Alternativamente, pode ser utilizada a perfusão intravascular do fixador, que deste modo alcança a intimidade dos tecidos rapidamente pelos vasos sanguíneos, sendo a fixação melhor (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O processo de fixação tem por objetivo facilitar os processos posteriores de coloração, pois muitos corantes apresentam maior afinidade pelo substrato fixado, além de promover um enrijecimento dos órgãos e tecidos (SILVEIRA, 2006).

Os fixadores reagem com diferentes componentes celulares promovendo a estabilização molecular de proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos entre outros. Eles atuam coagulando essas moléculas ou tornando-as insolúveis e assim precipitando-as nos tecidos de origem (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Há vários tipos de fixadores que podem ser empregados nas técnicas histológicas, como acetona, álcool etílico, metílico e terc-butílico, aldeídos (formaldeído, glutaraldeído, paraformaldeído), tetróxido de ósmio, ácido pícrico, ácido crômico e bicloreto de mercúrio. Os reagentes utilizados na precipitação de proteínas são o cloreto de mercúrio e o ácido pícrico. Já os que coagulam estas macromoléculas são: o formaldeído (o mais utilizado, conhecido como fixador universal), tetróxido de ósmio e o glutaraldeído. No entanto, é importante ressaltar que essas soluções podem ter seu poder de fixação potencializado se associadas umas as outras constituindo as “misturas fixadoras”. Os fixadores aditivados fixam em tempos reduzidos que variam de 1 a 5 horas devido à mistura de agentes químicos. O formol é um fixador lento, variando de 1 a 24 horas, seu custo é considerado baixo, sendo muito utilizado em patologia cirúrgica (SILVEIRA, 2006).

O tempo de fixação depende do fixador e da temperatura em que ele se encontra. A temperatura aumenta a velocidade de fixação, tornando mais rápida a entrada do fixador através do tecido. Entretanto certos tecidos necessitam de uma penetração lenta para a melhor preservação estrutural, neste caso, recomenda-se seu resfriamento entre 0° C e 6° C. É importante observar o pH dos fixadores, pois estes podem ocasionar uma retração maior do tecido, como também alteração nas colorações. O valor ótimo de pH dos fixadores é de 6,0 a 7,0. Frequentemente tais soluções são constituídas de um agente fixador principal associado a outros, sendo que bons fixadores são constituídos de duas ou mais substâncias fixadoras, corrigindo uma as limitações da outra. De modo geral, no entanto, por melhor que seja o fixador sempre ocorrem contração e diminuição do volume tecidual (entre 20 e 40%) (SILVEIRA, 2006).

Para que se possa examinar o tecido ósseo ou tecido com áreas de calcificação, deve-se antes de processá-lo (inclusão e corte) proceder à descalcificação que consiste na remoção dos sais de cálcio que se encontram depositados nos tecidos orgânicos sem alteração da sua estrutura celular (GENESER, 2003).

Geralmente são empregados como agentes descalcificadores os seguintes ácidos: nítrico, fórmico, tricloacético, clorídrico, pícrico, EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) é, sulfossalicílico. Não existe uma solução descalcificadora ideal. A única diferença entre as várias soluções é que umas agem mais rapidamente do que

as outras. O ácido usado deve ser completamente removido do tecido depois de terminada a descalcificação. Isto é feito pela lavagem abundante e cuidadosa em água corrente ou álcool, conforme o descalcificador empregado (GARTNER e HIATT, 1999).

### **3. Desidratação**

A desidratação consiste na substituição da água presente nos tecidos vivos por um agente desidratante visando à conservação do material. O agente desidratante mais utilizado é o etanol, porém há outros que podem ser empregados para essa finalidade. Este procedimento consiste na imersão do fragmento em solução alcoólica de concentrações crescentes (70%, 80%, 95%) até a total remoção da água do tecido por banho em álcool absoluto. Tecidos mais delicados exigem concentrações alcoólicas mais baixas e um menor tempo de exposição. Outras substâncias utilizadas como agentes de desidratação são: alcoóis butílico, metílico e isopropílico, a acetona, o éter, o clorofórmio e o óxido propileno (MICHALANT, 1988; GENESER, 2003).

A impregnação do tecido com meio de inclusão é impossível nesse estágio porque as substâncias semelhantes à parafina usadas para a inclusão não se misturam com o álcool. O tecido deve, portanto, ser imerso em um produto químico e que o álcool e a parafina sejam solúveis (GENESER, 2003).

### **4. Diafanização**

Este processo consiste na substituição do álcool usado na desidratação do tecido por solventes específicos para parafina. Estes solventes são miscíveis tanto em parafina como no álcool e tem ação clarificante sendo chamados diafanizadores. São eles; Xilol, Toluol, Benzeno, Óleo de Cedro e solventes universais (Acetato butílico, Dióxido dietileno e Benzoato metílico). Tais produtos químicos são muitas vezes chamados de agentes clarificadores porque tornam o tecido semi-translúcido, quase transparente (MICHALANT, 1988; GARTNER e HIATT, 1999).

### **5. Infiltração e Inclusão**

O processo de inclusão consiste em impregnar os tecidos com uma substância de consistência firme, que confira rigidez ao material, possibilitando que ele seja

cortado. Os meios de inclusão mais utilizados na investigação histológica e histopatológica são a parafina e a resina (GARTNER e HIATT, 1999).

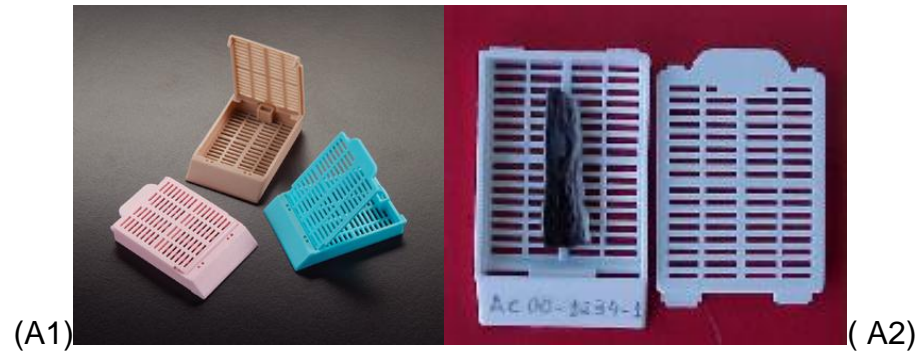
Durante a inclusão em resina ou parafina, deve ser determinada a orientação do material. A Inclusão permite que os processos de coloração sejam realizados possibilitando assim a posterior visualização do material no microscópio (GARTNER e HIATT, 1999).

Quando o meio de inclusão é a parafina, durante a infiltração (também chamada de impregnação), o xilol contido no material é completamente eliminado e há total penetração deste agente nos espaços vazios deixados pela água e gordura, antes existentes no tecido. Normalmente, os fragmentos teciduais são passados em duas trocas de parafina para assegurar a substituição de todo o agente clarificador. Emprega-se a parafina a uma temperatura de 56 a 60° C (parafina fundida) mantida em estufa. O fragmento de tecido permanecerá imerso na parafina fundida (em estufa) durante o tempo necessário para a completa impregnação. Posteriormente, serão retirados da estufa e deixados à temperatura ambiente até que a parafina endureça e então conduzidos ao corte (GARTNER e HIATT, 1999).

Podem-se citar ainda como agentes de impregnação: celoidina, goma arábica, parafina plástica, polietileno glicol e parafina esterificada (KIERNAN, 2008).

Ao se utilizar resinas plásticas, como o polietileno glicol, os fragmentos de tecidos são desidratados em etanol e antes da inclusão, o material passa pelos processos de pré-infiltração e infiltração. Os reagentes que compõem tais etapas normalmente são comercializados conjuntamente em um kit. A vantagem de se utilizar as resinas plásticas é que após o processo de desidratação em etanol não há a necessidade de banhos em xilol, um agente sabidamente cancerígeno. A inclusão nestes meios pode evitar alguns dos efeitos da alta temperatura das estufas, produzindo menos artefatos que os da parafina e permitindo a obtenção de cortes mais delgados (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). A grande desvantagem das resinas plásticas é que têm um custo bem maior que as parafinas.

Na figura 2 podem ser observadas as etapas de dissecação de material biológico e os procedimentos até a obtenção de um bloco de parafina com tecido fixado me formalina.



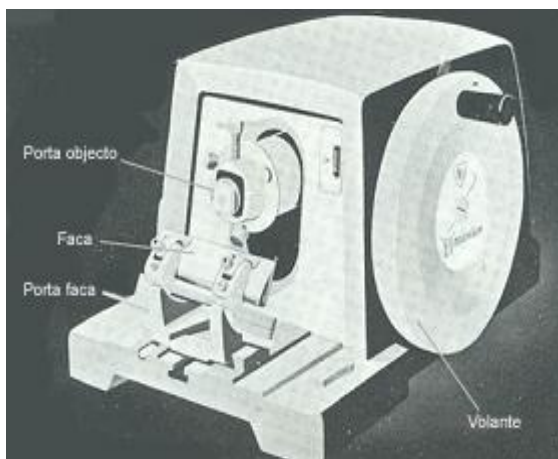
**Figura 02:** Níveis de disseção de materiais biológicos e respectivos procedimentos. (A1): Cassetes típicos para processamento de peças cirúrgicas ou biópsias em laboratórios de Patologia. (A2): Fragmento de tecido a ser processado. (B)



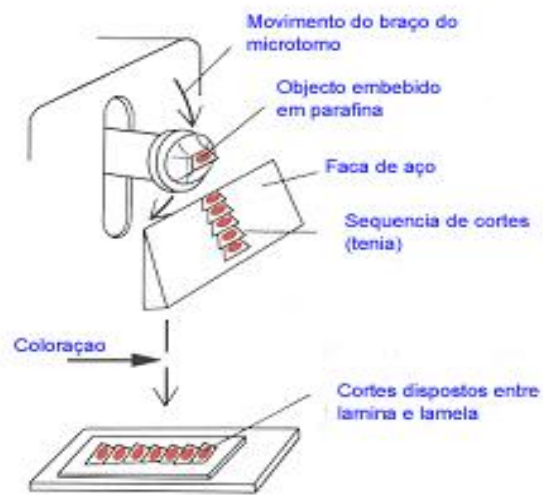
Equipamento automatizado para as etapas de desidratação, diafanização, infiltração e inclusão em parafina. (C1 e C2): Formas para moldar o bloco de parafina e bloco pronto para ser cortado em micrótomo ([http://www.lupetec.ind.br/index/components/com\\_virtuemart/shop\\_image/product/Processador\\_Auto\\_4a97f4de26234.jpg](http://www.lupetec.ind.br/index/components/com_virtuemart/shop_image/product/Processador_Auto_4a97f4de26234.jpg)).

## 6. *Microtomia*

Para se obter cortes de material incluído em parafina ou resina é necessário um equipamento específico: o micrótomo. Os micrótomos variam de acordo com os fabricantes e têm como fundamento duas peças principais: o suporte ou mandril e a navalha. O suporte é uma parte móvel, onde os blocos de parafina ou resina são apoiados, e seu movimento é vertical, promovendo a aproximação entre o bloco e a navalha produzindo os cortes. O micrótomo tem como unidade de medida o micrômetro ( $\mu\text{m}$ ) que corresponde à milésima parte do milímetro. Normalmente, um micrótomo faz cortes cuja espessura varia de 1 a 50  $\mu\text{m}$ , mas as espessuras mais utilizadas em microscopia óptica são de 3 a 6  $\mu\text{m}$ . Há vários tipos de micrótomos: rotativo, tipo Minot, de congelação e o destinado a trabalhos de microscopia eletrônica (MICHALANT, 1988; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004; KIERNAN, 2008) (Figura 3).

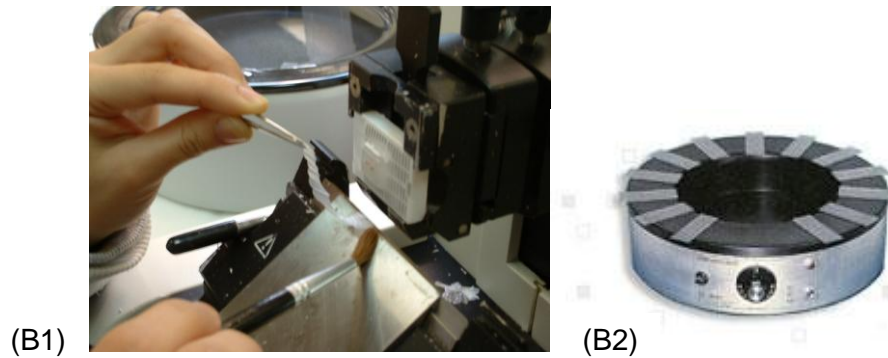


(A1)



(A2)

(fonte: <http://www.dbio.uevora.pt/jaraujo/biocel/histoltecnicas.htm>)



**Figura 03:** (A1): Ilustração de um micrótomo rotativo manual onde são identificados seus principais componentes, ou seja, porta objeto (local de encaixe do bloco de parafina), porta navalha e navalha e volante (manivela que aproxima o bloco da navalha a cada giro de 360 °C em sentido horário). (A2): Bloco de parafina sendo cortado. (B1) Fita de cortes de parafina seqüenciais prontos para serem distendidos em banho-maria e transferidos para lâmina histológica. (B2): Típico banho-maria para rotina histológica. (<http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modtecni>).

### 7. *Distensão dos cortes e transferência para as lâminas*

#### **Parafina**

Os cortes provenientes dos blocos de parafina formam uma fita, que deve ser seccionada em partes menores. Estes cortes são então transferidos para banho-maria contendo água a uma temperatura de 40°C onde são mantidos para sua distensão (VALLE, 2001; SALAS et al., 2004).

Em seguida, mergulha-se a lâmina diagonalmente no banho-maria até que os cortes sejam aderidos a ela. Para evitar a formação de bolhas a transferência deve ser cuidadosa. Por fim, a lâmina é retirada da água e a secagem e total aderência dos cortes ocorrem à temperatura ambiente (SALAS et al., 2004).

#### **Resina**

Após a microtomia do bloco de resina, com o auxílio de uma pinça o material é transferido para uma vasilha com um fundo escuro, contendo água destilada em temperatura ambiente. Na vasilha, o corte é distendido podendo então ser transferido para a lâmina. Para isso a lâmina é mergulhada na água e lentamente

aproximada do corte distendido, até sua total aderência. Em seguida é colocada em placa aquecedora a 60°C para adesão e secagem dos cortes (KIERNAN, 1989).

### **8. Colorações e Reações Citoquímicas**

Para serem analisados ao microscópio, os cortes histológicos devem ser corados. Isto porque, com poucas exceções, a maioria dos tecidos é incolor. Por isso, foram desenvolvidos métodos de coloração que não só tornam evidentes os vários componentes dos tecidos, como também facilitam a distinção entre eles (MICHALANT, 1988; BANCROFT e STEVENS, 1996; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

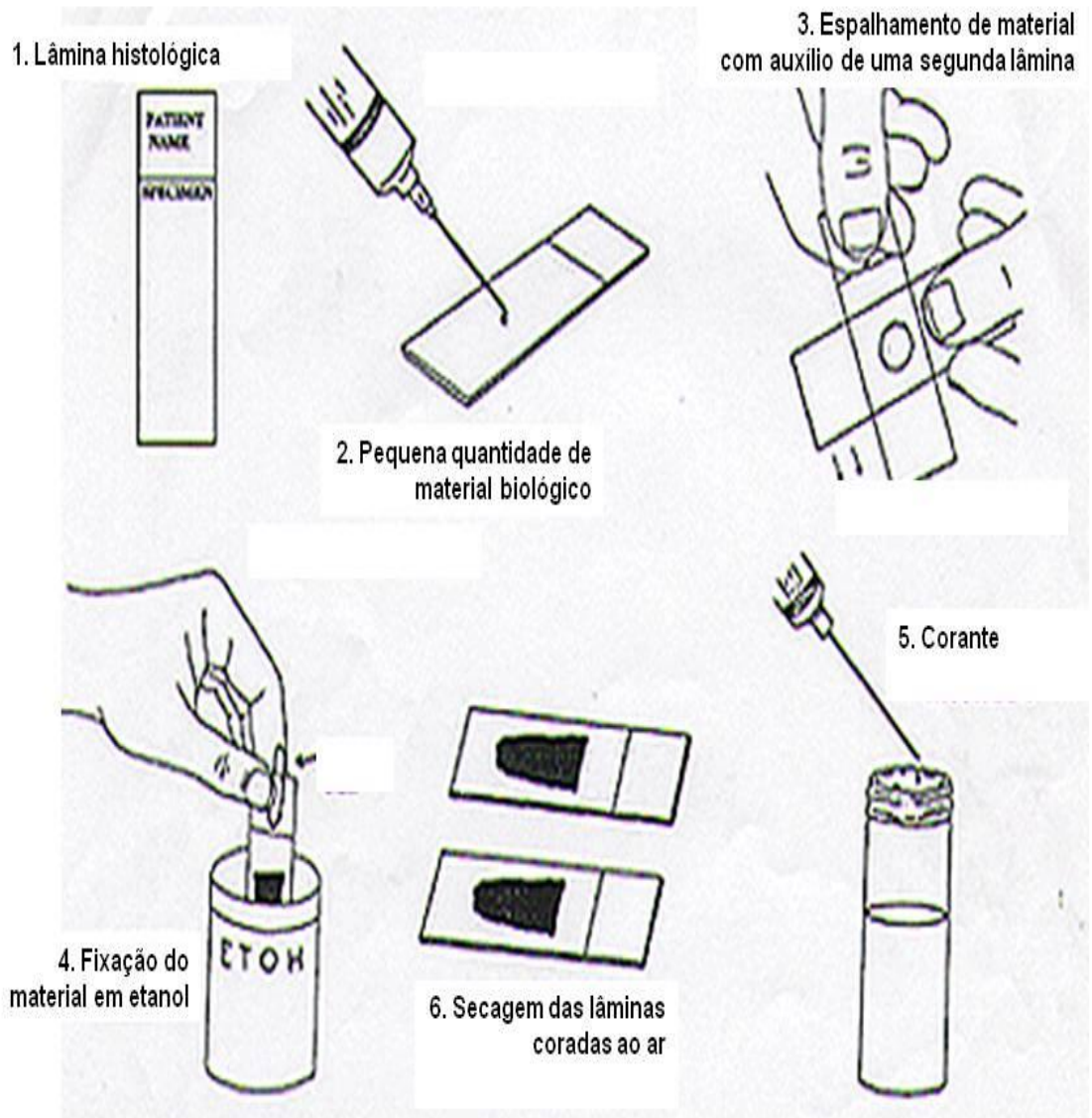
A coloração é de importância fundamental em histologia, pois os tecidos não tratados têm pouca diferenciação óptica. As colorações de um modo geral se efetuam por processos físico-químicos ou puramente físicos. A maioria dos corantes se comporta como compostos ácidos ou básicos e tendem a formar ligações eletrostáticas (salinas) com radicais ionizados dos tecidos (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O mecanismo de coloração das células ainda é controverso, mas duas hipóteses se destacam: fenômenos de adsorção e fatores químicos. Nos dois casos, o grau de dissolução dos corantes e a forma sob a qual se encontram, aniônica ou catiônica, são fatores importantes. Admite-se que as porções celulares de pH ácido tendem a se combinar com os corantes de radical catiônico, tanto por adsorção como por reações químicas e o inverso ocorre com os corantes de radical aniônico (BURTIZ e ASHWOOD, 1998; GARTNER e HIATT, 1999).

A grande maioria dos corantes tem cor, devido à sua configuração molecular, a qual apresenta um anel paraquinonóide ou então um ou mais grupamentos azo. Estas estruturas apresentam uma configuração eletrônica que leva a absorção de diferentes comprimentos de onda. Estes grupamentos responsáveis pela cor recebem o nome de cromóforos e quanto maior o seu número, mais intensa é a cor do corante (BURTIZ e ASHWOOD, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Para se corar convenientemente a célula, deve-se recorrer a um método de coloração sucessiva do núcleo e do citoplasma. Quanto à cromatização, ou seja, de acordo com o número de cores conferidas às estruturas pelas colorações simples ou combinadas, estas tomam a denominação de colorações monocrômicas (uma cor), bicroômicas (duas cores), tricrômicas (três cores) e policrômicas (mais de três cores)

(BURTIZ e ASHWOOD, 1998; SILVEIRA, 2006). A combinação mais comum de corantes usada em histologia e histopatologia é a Hematoxilina e Eosina (HE). A hematoxilina é um corante natural obtido da casca de pau campeche. Não é realmente um corante e deve ser oxidada em hemateína a fim de tornar-se um (GARTNER e HIATT, 1999). Enquanto o citoplasma é formado por componentes ácidos e básicos, no núcleo das células predominam os ácidos nucléicos. O corante que reage com estas moléculas é a Hematoxilina, conferindo ao núcleo uma coloração azulada. Ademais, o corante que resulta (hematoxilina-hemateína) não tem afinidade para os tecidos. Deve ser usado um mordente, como o alumínio ou o ferro, juntamente com a mistura de hematoxilina antes que ela possa corar os tecidos. A mistura cora em azul-púrpura. O segundo componente é a Eosina Y (eosina yellowish, eosina solúvel ou eosina amarelada). Eosina Y é uma tetrabromo fluoresceína, mas as formas derivadas, mono e dibromo, também podem estar presentes no corante, em proporções variáveis. Essas formas derivadas modificam seu tom avermelhado, que é proporcional ao íon Br presente no produto. O corante é utilizado, principalmente, na coloração de grânulos oxifílicos do citoplasma, que têm longa afinidade por corantes ácidos (SALAS et al., 2004). A eosina é atraída pelos elementos básicos da proteína do citoplasma da célula, corando-o de róseo a vermelho. Os componentes dos tecidos que se coram prontamente com os corantes básicos são chamados basófilos; os que têm afinidade pelos corantes ácidos são chamados acidófilos. A hematoxilina comporta-se como um corante básico e, portanto, cora o núcleo de modo basófilo. A eosina é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). O núcleo é uma estrutura muito importante no interior da célula para o diagnóstico de um tumor, uma vez que carrega informações, que se quantificadas podem permitir diagnóstico e potencialmente predizer o curso da doença (BANCROFT e STEVENS, 1996; VAN DE WOUVER et al., 2000; DE ANGELIS, 2001).

Exemplos na Figura 4 de método de coloração rápida com espalhamento de material líquido em lâmina. Este método é também utilizado em procedimentos de coloração de tecido congelado em centros cirúrgicos. Este último tem como objetivo informar ao cirurgião se a margem cirúrgica deve ser ampliada ou não. A lâmina é lida por um patologista.



**Figura 04:** Ilustração de método de coloração rápida com espalhamento de material líquido em lâmina feito manualmente ou em procedimento de congelamento tecidual efetuado em centros cirúrgicos (fonte: <http://www.breastdiseases.com/fna.htm>).

Certos corantes reagem com os componentes do tecido e os coram com uma cor diferente da cor da solução corante. A mudança de cor do corante chama-se metacromasia. O azul-de-metileno, o azul-de-toluidina e a tionina são exemplos de corantes simples que exibem metacromasia. Com os corantes azuis a cor muda para vermelho. A coloração dos mastócitos com o azul-de-metileno constitui um bom exemplo. Os grânulos do citoplasma coram-se em vermelho-púrpura, enquanto que o resto do tecido fica azul. A causa da metacromasia não é totalmente compreendida, porém tem sido sugerido que é devido à polimerização das moléculas do corante. Julga-se que a presença de macromoléculas com radicais eletronegativos no tecido facilita a polimerização e provoca a mudança de cor (KIERNAN, 1989; BURTIZ e ASHWOOD, 1998).

Antes que o corte seja corado, a parafina em que ele foi incluído deve ser removida. O corte, que já foi aderido à lâmina de vidro (pesca em banho-maria), é banhado no xilol para dissolver a parafina. Devido ao fato de muitos corantes serem solúveis em água, torna-se necessário remover o xilol do tecido e substituí-lo por água (hidratação). O corte é imerso em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico até que esteja hidratado. Depois que o corte estiver hidratado procede-se à coloração propriamente dita. No caso da HE, o tecido é imerso primeiramente em hematoxilina, lavado com água para retirada de excedente, depois imerso em eosina e, após isto também se faz lavagem do tecido (BURTIZ e ASHWOOD, 1998).

### **9. Meios de Montagem das Lâminas**

Para que a lâmina e a lamínula permaneçam aderidas e para que seja formado um meio óptico transparente que clarifique o corte, é necessária a utilização de uma substância específica sobre o corte corado. Os meios mais empregados são confeccionados a partir de resinas naturais, como o Bálsamo do Canadá, extraído da *Abies balsamea pinaceae*. Atualmente meios de montagem sintéticos são bastante comercializados por empresas como de produtos químicos em geral, como exemplo, pode ser citado o meio Enttalan (Merck, USA).

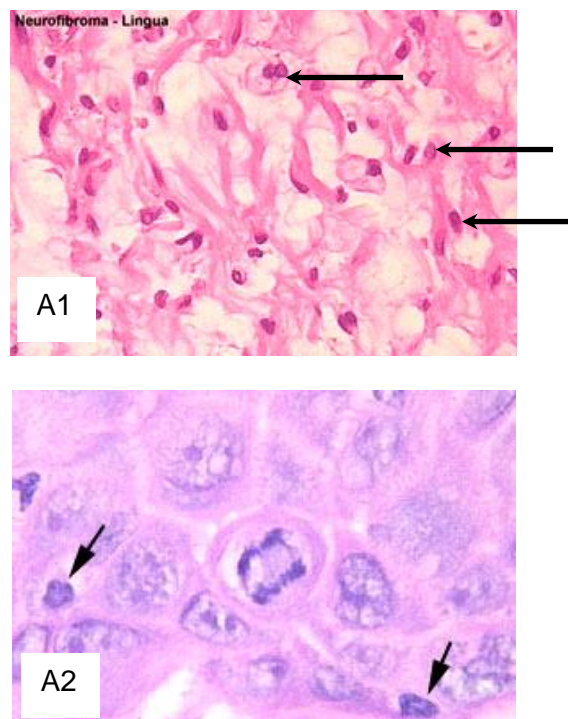
A sua utilização é feita da seguinte maneira: coloca-se uma gota do meio de montagem sobre a lâmina contendo o material corado, e logo após coloca-se uma



lamínula, pressionando-a contra a lâmina. As eventuais bolhas que se formam devem ser retiradas com o auxílio de uma pinça, pressionando-a contra a lamínula. Por fim a lâmina já com a lamínula aderida, deve ser colocada sobre uma superfície para sua secagem. Após todo o processo, a lâmina está pronta para ser observada ao microscópio de luz.

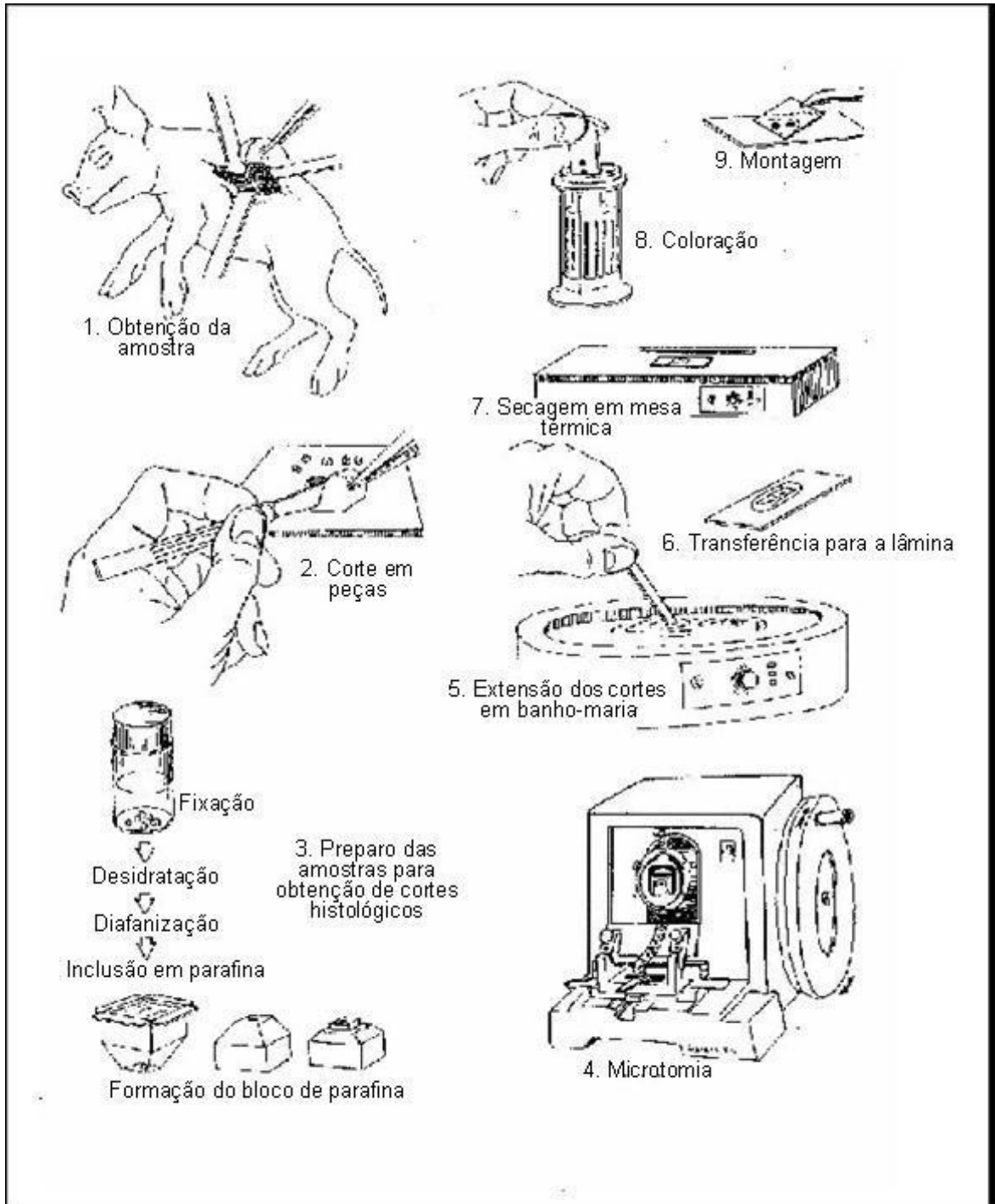


**Figura 05:** Análise de lâminas histológicas coradas pelo H/E no microscópio de luz (<http://www.citocamp.com.br/biopsia/processamento.html>).



**Figura 06:** (A1): Neoplasia benigna de tecido nervoso periférico; núcleos (setas). (A2): Neoplasia maligna epitelial, exibindo hiperchromatismo (setas), células de tamanhos e formas variados (pleomorfismo), vacuolização no citoplasma e alteração da relação núcleo-citoplasma. Mitose atípica é vista no centro do campo.

Na Figura 7 estão ilustradas todas as etapas que antecedem a preparação de uma lâmina histológica de boa qualidade de acordo com os procedimentos já descritos.



**Figura 06:** Resumos das etapas necessárias para obtenção de lâminas histológicas (fonte: <http://minerva.ufpel.edu.br/~mqrheing/praticaesq.htm>).



## **II. JUSTIFICATIVA**

A coloração é a operação pela qual os tecidos são submetidos à ação de substâncias capazes de tingir os seus componentes. Os corantes são especialmente úteis e a informação obtida é maximizada quando os mecanismos que governam as suas propriedades corantes são compreendidos e adequadamente aplicados em uma rotina laboratorial.

Pode-se considerar o século XX como sendo o século da qualidade, período em que os conceitos de qualidade sofreram uma evolução considerável em função das características dos tipos de serviços prestados pelas empresas em geral. O uso da técnica de coloração de H/E para diagnóstico histopatológico é bem anterior a este período de adequações de padrão de qualidade. Portanto, faz-se necessária uma revisão dos métodos primordiais e atuais da técnica, para a constatação se os avanços tecnológicos atualmente utilizados aperfeiçoaram os diagnósticos clínicos.

### **III. OBJETIVOS**

Este trabalho teve como objetivos:

1. A realização de uma revisão bibliográfica no que se referem abordagens necessárias para a preparação dos vários tipos de órgãos para análise histopatológica e a importância da coloração pela técnica de hematoxilina eosina neste tipo de rotina.
2. Padronização de procedimentos visando um melhor controle de qualidade em lâminas histológicas coradas pela técnica de hematoxilina eosina para otimização de diagnósticos clínicos.

## **IV. TÉCNICAS DE PREPARO**

### ***IV.1 Equipamentos e objetos gerais a serem utilizados na preparação de diversos métodos histológicos***

Entre os equipamentos automatizados utilizados na rotina de histologia destacaram-se: Processador automático de tecidos, Dispensador de parafina, Placa refrigerada, Agitador e Aquecedor Magnético, Balança analítica, Banho-maria histológico, Destilador de água, Estufa e Micrótomo. Quanto aos utensílios usuais utilizou-se: vidraria (Becker, proveta, funil, pipetas), lâminas e lamínulas, navalhas de inox descartáveis, pincel número 03, carrinho de inox para suporte das lâminas, lápis ou caneta especial para escrever em lâminas e pinças.

Com o intuito de implementação de procedimentos de trabalho para a garantia do controle de qualidade, ressalta-se que todos os materiais citados serão devidamente limpos após serem utilizados. Para isso será utilizada solução de detergente neutro 1%. Após o enxágüe em água corrente os materiais passarão por lavagens em água destilada, sendo então colocados na estufa de secagem (60°C). Quando secos os materiais serão guardados em armários de modo que fiquem protegidos de possíveis contaminantes (MOTTA et al., 2001).

### ***IV.2 Coleta do material – Estabelecimento de método de controle de qualidade***

Em diferentes setores hospitalares, na atualidade são realizadas diariamente biópsias e cirurgias e parte deste material é destinada ao Departamento de Patologia para que seja feita sua análise, processamento, e cortes histológicos. Neste departamento após a confecção de lâminas histológicas, os patologistas realizam o diagnóstico das amostras recebidas.

Ainda no centro cirúrgico o material é colocado em recipientes contendo formalina tamponada, devidamente identificado e segue para o setor de Macroscopia do Departamento de Patologia. Os funcionários deste setor, entre outras funções, selecionam fragmentos do material histológico acondicionado diariamente no fixador. Pequenas porções dos órgãos são acometidas em recipientes plásticos próprios (cassetes), identificados e enviados para

processamento histológico no setor denominado Técnica. Neste, os fragmentos seguem em processador automático de tecidos passando pelas fases de desidratação, diafanização, infiltração da parafina.

Durante a desidratação do material foi feita a substituição da água presente nos tecidos por um agente desidratante, neste protocolo utilizou-se o etanol. Este procedimento consistiu na imersão do fragmento em solução alcoólica de concentrações crescentes (70%, 80%, 95%) até a total remoção da água do tecido por banho em álcool absoluto. Para a garantia de controle de qualidade ficou estabelecido que o etanol utilizado seria o da marca Merck (USA). A impregnação do tecido com o meio de inclusão é impossível nesse estágio porque as substâncias semelhantes à parafina usadas para a inclusão não se misturam com o etanol. Os tecidos foram então imersos em xilol, um produto químico em que o álcool e a parafina são solúveis (GENESER, 2003). O xilol é tipo como agente clarificador porque torna o tecido semi-translúcido, quase transparente, na etapa de diafanização (BANKS, 1992). Também como garantia de controle de qualidade ficou estabelecido que o xilol utilizado seria o da marca Merck (USA).

O processo de inclusão consiste em impregnar os tecidos com uma substância de consistência firme, que confira rigidez ao material, possibilitando que ele seja cortado. O meio de inclusão mais utilizado na investigação histopatológica é a parafina (GARTNER e HIATT, 1999). Durante a infiltração (também chamada de impregnação), o xilol contido no material foi completamente eliminado e então houve a total penetração da parafina nos espaços vazios deixados pela água e gordura, antes existentes no tecido. Os fragmentos teciduais passaram em duas trocas de parafina para assegurar a substituição de todo o agente clarificador. Empregou-se a parafina a uma temperatura de 60° C (parafina fundida). O fragmento de tecido permaneceu imerso na parafina fundida durante o tempo necessário para a completa impregnação. Como garantia de controle de qualidade ficou estabelecido que a parafina utilizada seria a comercializada como Histosec (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Como controle de qualidade e estabelecimento de instrução de trabalho são utilizados os seguintes utensílios: pinças de vários tamanhos, moldes para inclusão em parafina, dispensador de parafina, placa fria, caneta própria para escrever em parafina, parafina líquida em quantidade suficiente para imergir completamente a

peça a ser incluída, um aquecedor de pinças. Foi determinado o uso de jaleco, óculos de proteção e máscara.

Após colocar os itens de segurança, com o uso de pinças retira-se os cassetes contendo os fragmentos teciduais, do interior dos cestos do dispensador de parafina, abre-se os cassetes um a um e retira-se o material, com o auxílio de pinça pequena coloca-se o material no molde de inclusão. Posteriormente, recoloca-se o cassete com a numeração correspondente sobre cada molde de inclusão e completa-se com parafina derretida. Os moldes são depositados sobre a placa fria e após resfriamento, desenforma-se o cassete. Estes são ordenados de acordo com a numeração. Quando prontos, os blocos ficam acometidos em freezer ou geladeira até o início da microtomia, fase em que são realizados os cortes histológicos.

### ***IV.3 Microtomia – Estabelecimento de método de controle de qualidade***

Como instrução de trabalho houve a padronização do procedimento de microtomia obedecendo às seguintes normas: higienização das mãos, retirada dos blocos de parafina em ordem numérica do freezer (para manter a parafina enrijecida e facilitar a microtomia), colocar os blocos ao lado do micrótomo, iniciar os cortes a partir do primeiro bloco, enumerar a lâmina histológica de acordo com o número do bloco correspondente utilizando uma caneta própria, encaixar o bloco no porta-objetos do micrótomo, aparar o bloco com a navalha até ter contato com o material, realizar um corte seqüencial (fita) de 3 µm de espessura, verificar a temperatura da água do banho histológico com termômetro (aproximadamente 60°C), remover a fita com o auxílio de pinça e pincel e distendê-la no banho histológico, transferir os cortes para a lâmina enumerada, transferir a lâmina para o suporte de secagem. Após, remover o bloco do micrótomo e limpar o suporte da navalha entre o corte de um bloco e o seu subsequente, limpar a água do banho histológico entre um bloco e outro. Encaixar o bloco seguinte no micrótomo e proceder como descrito anteriormente. Após a confecção dos cortes, acondicionar as lâminas em estufa à temperatura de 60°C de 1 a 2 horas, até que a parafina derreta em volta dos cortes. Retirar as lâminas da estufa e passá-las primeiramente por xilol aquecido (60°C) e após em xilol à temperatura ambiente.

Ao final encaminhar as lâminas para coloração de rotina conforme solicitação médica, descartar os materiais residuais em recipientes próprios, encaminhar os blocos para o arquivo do departamento e realizar a higienização das mãos.

#### ***IV.4 Coloração por Hematoxilina-Eosina – Estabelecimento de método de controle de qualidade***

Como controle de qualidade e estabelecimento de instrução de trabalho são utilizados os seguintes utensílios: etanol e xilol em quantidades suficientes para imergir as lâminas durante a coloração, carrinho porta-lâminas de inox, um conta-gotas, meio de montagem em quantidade suficiente para instilar as lâminas, corante hematoxilina e corante eosina em quantidade suficiente para imergir as lâminas, uma bandeja porta-lâminas, água corrente para lavagem das lâminas. Foi determinado o uso de jaleco, óculos de proteção e máscara. Também como garantia de controle de qualidade ficou estabelecido que o meio de montagem de lâminas utilizado será o Enttelan (Merck, USA).

O funcionário deve receber as lâminas do técnico de laboratório e, após colocar os itens de segurança, iniciar o procedimento de coloração. Colocar as lâminas em carrinho de inox, passá-las pelo xilol, passar em etanol, lavar em água corrente, retirar o excesso de água, imergir as lâminas em hematoxilina por 3 minutos, lavar em água corrente rapidamente para remoção do excesso de corante, imergir as lâminas no corante eosina por 3 minutos, passar as lâminas sequencialmente por 6 cubas contendo etanol retirando o excesso de uma para outra, passar as lâminas sequencialmente por 6 cubas contendo xilol retirando o excesso de uma para outra. Para a montagem permanente das lâminas, retirar uma por vez do carrinho, passar em cuba contendo xilol, enxugar as bordas e a parte de traz, instilar com conta-gotas o Enttelan, colocar uma lamínula inclinada sobre a lâmina para não formar bolhas de ar. Secar as bordas para remoção dos possíveis excessos de Enttelan e xilol e depositar as lâminas em bandeja para secar. Etiquetar cada lâmina com a numeração do registro interno e encaminhá-las para a avaliação do patologista.

Na identificação em nível microscópico dos elementos celulares corados distintamente pela técnica de H/E tem-se que os núcleos celulares aparecem corados em azul ou violeta (hematoxilina) e o citoplasma em rosa (eosina).

## **V. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

No presente estudo foi revisado e atualizado o controle de qualidade de lâminas histológicas coradas pela metodologia do H/E visando à melhoria do diagnóstico médico em um Departamento de Patologia Hospitalar.

Destaca-se entre as observações efetuadas que o controle de qualidade do sistema depende: da formação e da experiência do profissional que manipula o material biológico; a limpeza e a secagem adequada do material a ser utilizado são de fundamental importância para a estabilidade dos reagentes e obtenção de resultados corretos; a água utilizada na limpeza do material e no preparo dos reagentes deve ser de boa qualidade, ou seja, proveniente de sistemas de filtragem com osmose reversa. Com o uso, os corantes vão perdendo a capacidade tintorial, sendo necessário um ajuste periódico nos tempos de coloração. Estas conclusões estão de acordo com Lopes (2003).

Durante a realização do estudo notou-se que a capacidade de aproveitamento das lâminas confeccionadas foi alta. Ocasionalmente, alguns problemas que ainda ocorreram foram: seleção de áreas teciduais onde prevaleceram sítios de necrose, impedindo a avaliação diagnóstica real pelo patologista, remoção de áreas com prevalência de tecido adiposo ou área não representativa das características morfológicas do órgão em análise.

Em pequenos laboratórios e mesmo em locais onde os recursos financeiros são escassos, ainda não há a presença de um controle de qualidade efetivo para a produção de lâminas histológicas. Nestes casos, o processamento de material biológico faz-se segundo os protocolos iniciais como o de Behmer e colaboradores (1976) ou Beçak e Paulete (1976). Como não havia os equipamentos automatizados para processamento de material biológico, a parafina era de derretida no interior de recipientes de alumínio sobre fogo, o que alterava a temperatura de 60°C ideal para a inclusão. Nestes casos a ocorrência de danos à morfologia tecidual era comum, ocasionando o “cozimento” tecidual. Não havia controle de qualidade nos reagentes comercializados como o etanol, xilol e formol. Frequentemente, a etapa de diafanização do tecido era realizada com óleo de cedro e levava vários dias (7 dias) para a penetração do reagente no tecido. A obtenção de lâminas histológicas era um processo lento e de baixo aproveitamento, tamanho a quantidade de problemas

processuais. Os corantes como a hematoxilina e a eosina eram feitos a partir do pigmento em pó, o que levava grande gasto de tempo até a solução reagente ficar pronta para uso.

Ademais, considerando que os métodos imunohistoquímicos têm sido amplamente utilizados para o diagnóstico e classificação de doenças nos países desenvolvidos, há poucos relatos de sua utilização nos países em desenvolvimento, onde H/E é o esteio do diagnóstico de doenças como o linfoma de Hodgkin. Como exemplo, pode ser citado Uganda, na África, em que as condições de saúde precárias não permitem técnicas modernas e, portanto mais caras de diagnóstico (TUMWINE et al., 2003). A técnica de H/E se estende ainda na identificação de espécies específicas de infecções humanas. A rápida identificação de portadores de *Taenia solium* pode prevenir a cisticercose (uma das principais causas de epilepsia adquirida). Tanto a histologia por H/E quanto PCR (reação em cadeia da polimerase) são técnicas úteis para a diferenciação de *T. solium* de *T. saginata*. H/E é de menos custo e está disponível na maioria das regiões de endemicidade e, PCR pode ser executada na maioria dos centros hospitalares que possuem o equipamento (MAITA et al., 2000). H/E também vindo sendo descrita como importante no diagnóstico de queratite causada *Acanthamoeba*, em relação a outras técnicas de coloração citoquímica (GROSSNIKLAUS et al., 2003).

No Brasil, os programas de Controle da Qualidade em Laboratório Clínico foram introduzidos na década de 80, através do Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas e do Programa de Excelência para Laboratórios Clínicos da Sociedade Brasileira de Patologia. Há controles de qualidade gerenciados por empresas produtoras de insumos laboratoriais. Para atender as necessidades de uma avaliação mais ampla dos Laboratórios Clínicos há hoje no Brasil o Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas e o Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos da Sociedade Brasileira de Patologia (MOTTA et al., 2001).

Quando se refere à qualidade de exames deve-se incluir o custo envolvido na realização dos mesmos. Se qualidade significa a conformidade às necessidades do cliente, então os custos da qualidade englobam os custos de conformidade e custos de não conformidade. A partir da década de 90 tornou-se notório que os sistemas de



garantia de qualidade em organizações de assistência à saúde estão em constante evolução (ROTH, 1998).

Há pressões de ordem públicas e privadas pela melhoria da qualidade, mas em contrapartida é necessário que se faça a contenção de custos. Os custos de conformidade podem ser divididos em custos de prevenção e de avaliação. Já os custos de não conformidade referem à falha interna e externa, por exemplo, custo com repetição de exame (falha interna), pedidos repetidos de exames (falha externa). Melhorias na qualidade podem levar à redução de custos por evitar repetições de exames, os quais resultam em desperdício de tempo e dinheiro (ROTH, 1998).

Para se obter qualidade nos exames realizados, é preciso que se faça uma padronização dos processos envolvidos, desde a solicitação médica dos mesmos até a liberação do laudo. Deste modo, para que se possa entender o sistema de realização de um exame deve-se ter em mente que este envolve uma série de processos, cada um dos quais com fontes potenciais de erros. A padronização no laboratório clínico tem a finalidade de prevenir, detectar, identificar e corrigir erros ou variações que possam ocorrer em todas as fases de realização do teste (RODRIGUES, 2001). No Material e Métodos do presente estudo foram descritos todas as etapas que correspondem à padronização de controle de qualidade para confecção de lâminas histológicas coradas pela técnica de H/E.

Com a padronização correta dos processos pôde-se alcançar a qualidade desejada e todas as atividades do laboratório foram documentadas através de instruções de trabalho (IT) ou procedimento operacional padrão (POP), aprovadas e colocadas à disposição do corpo técnico de apoio.

## VI. REFERÊNCIAS

- BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. 5<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, 776 p., 1996.
- BANKS, W. J. **Métodos de histologia**. In: BANKS, W. J., *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Editora Manole, p. 5 -14, 1992.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Vol. 1 e 2. Livros Técnicos e Científicos. São Paulo: Editora S.A, 574 p., 1976.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Edart, 239 p., 1976.
- BURTIZ, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Fundamentos de química clínica**. 4<sup>o</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998.
- DE ANGELIS, L. M. **Brain tumors**. N. Engl. J. Med., 344:114-123, 2001. (<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200101113440207>, acesso em 20/09/2010).
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. 1<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1999.
- GENESER, R.J. **Histologia**. 3<sup>a</sup> edição. Rio de Janeiro: Editora: Guanabara Koogan S.A. 2003.
- GROSSNIKLAUS, H. E.; WARING, G. O., AKOR, C.; CASTELLANO-SANCHEZ, A. A.; BENNETT, K. Evaluation of hematoxylin and eosin and special stains for the detection of acanthamoeba keratitis in penetrating keratoplasties. Am. J. Ophthalmol., 136: 520-526, 2003 (<http://www.ajo.com/article/PIIS0002939403003222/> acesso em 20/09/2010).
- FINCH, J. M. **Recent developments in preclinical toxicological pathology**. Toxicol Appl Pharmacol, 207(2): 209-213, 2005. ([http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6WXH-4GGWG75-6&\\_user=10&\\_coverDate=09%2F01%2F2005&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=search&\\_origin=search&\\_sort=d&\\_docanchor=&\\_view=c&\\_acct=C000050221&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=10&md5=ae279036a08080dc2fb72b9ec49344ee&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6WXH-4GGWG75-6&_user=10&_coverDate=09%2F01%2F2005&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_sort=d&_docanchor=&_view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=ae279036a08080dc2fb72b9ec49344ee&searchtype=a), acesso em 05/09/2010).
- FISCHER, A. H.; JACOBSON, K. A.; ROSE, J.; ZELLER, R. **Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections**. In: *Preparation of Cells and Tissues for Fluorescence Microscopy*, Chapter 4, In *Basic Methods in Microscopy* (eds. Spector and Goldman). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006 (<http://cshprotocols.cshlp.org/cgi/content/abstract/2008/6/pdb.prot4986>, acesso em 05/09/2010).

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 19ª edição. São Paulo: Editora Manole, 1999.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2004.

KIERNAN, J. H. **Histological and histochemical methods. Theory and practice**. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford, Pergamon Press, 1989.

LOPES, H. J. J. **Garantia e controle de qualidade no laboratório clínico**. II Curso de atualização em análises clínicas. Belo Horizonte, 27p., 2003.

MAYTA, H.; TALLEY, A.; GILMAN, R. H.; JIMENEZ, J.; VERASTEGUI, M., RUIZ, M.; GARCIA, H. H.; GONZALEZ, A. E. **Differentiating *Taenia solium* and *Taenia saginata* Infections by Simple Hematoxylin-Eosin Staining and PCR-Restriction Enzyme Analysis**. J. Clin. Microbiol, 38(1): 133–137, 2000. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC86038/?tool=pubmed>, acesso em 29/08/2010)

MICHALANT, J. Operações fundamentais da técnica histológica. In: **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: Editora Michalany LTDA, cap. II, p. 24-31, 1988.

MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária, 277p., 1980.

MOTTA, V. M.; CORRÊA, J. A.; MOTTA, L. R. **Gestão da qualidade no laboratório clínico**. 2ª edição. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 2001.

RODRIGUES, M. M. A. **Gestão laboratorial e sistema de gestão da qualidade**. II Curso de Atualização em Análises Clínicas, SBACMG, 2001.

ROTH, E. **Como implantar a qualidade em laboratório clínico: O caminho das pedras**. Hunsdale consultorias e treinamento Ltda., Rio de Janeiro, 1998.

SALAS, V. W., et al. **Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas**. Rev. Cubana Med. Milit; 33(2), 2004. ([http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac\\_38\\_02/rbac3802\\_11.pdf](http://www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_02/rbac3802_11.pdf), acesso em 05/09/2010).

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia Humana**. 2ª edição. São Paulo: Editora Manole, 2001.

SILVEIRA, S. O. **Orientação para práticas de laboratório**. Universidade de Santa Maria, 60p., 2006.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: Editora Manole, 341p., 2005.

TUMWINE, L.K.; WABINGA, H.; ODIDA, M. **Haematoxylin and eosin staining in the diagnosis of Hodgkin's disease in Uganda**. East Afr. Med. J., 80(3): 119-23, 2003 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, acesso em 29/08/2010).

VALLE, F. C. **Práticas de citologia e genética**. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 2001.

VAN DE WOUNVER, G.; WEYN, B.; SCHEUNDERS, P.; JACOB., W.; VAN MARCK, E.; VAN DYCK, D. **Wavelets as chromatin texture descriptors for the automated identification of neoplastic nuclei**. J. Microsc., 97: 25-35, 2000. (<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2818.2000.00594.x/full>, acesso em 20/09/2010).

### **FONTE DAS FIGURAS**

**Figura 01:** Remoção de fragmento de fígado para realização de biópsia (fonte: <http://www.iged.com.br/imagens/servicos/figado-Biopsia01.jpg>)

**Figura 02:** Níveis de dissecação de materiais biológicos e respectivos procedimentos ([http://www.lupetec.ind.br/index/components/com\\_virtuemart/shop\\_image/product/Processador\\_Auto\\_4a97f4de26234.jpg](http://www.lupetec.ind.br/index/components/com_virtuemart/shop_image/product/Processador_Auto_4a97f4de26234.jpg))

**Figura 03:** (A1): Ilustração de um micrótomato rotativo manual onde são identificados seus principais componentes e de um banho histológico. (<http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla.asp?zona=modtecn>)

**Figura 04:** Ilustração de método de coloração rápida com espalhamento de material líquido em lâmina feito manualmente (fonte: <http://www.breastdiseases.com/fna.htm>)

**Figura 05:** Ilustração das etapas que compõem o procedimento de coloração de Gram, muito utilizada em Microbiologia (fonte: [http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public\\_version/contents/appendices/appendix002/pages/page008.html](http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/public_version/contents/appendices/appendix002/pages/page008.html))

**Figura 06:** Análise de lâminas histológicas coradas pelo H/E no microscópio de luz (<http://www.citocamp.com.br/biopsia/processamento.html>)

**Figura 07:** Resumos das etapas necessárias para obtenção de lâminas histológicas (fonte: <http://minerva.ufpel.edu.br/~mgrheing/praticaesq.htm>)