

Da biópsia para o microscópio: processamento tecidual em odontologia

From biopsy to microscope: tissue processing in Dentistry

Gabriel Bassan Marinho Maciel¹

Taline Laura Guse²

Roberto Marinho Maciel¹

Cristiane Cademartori Danes¹

Resumo

Objetivo: O objetivo desta revisão de literatura é descrever as etapas fundamentais do processamento tecidual para microscopia óptica com coloração de hematoxilina e eosina (HE) de interesse na odontologia. **Revisão de Literatura:** O processamento tecidual para coloração com HE é constituída basicamente por 7 etapas sequenciais. Imediatamente após a biópsia, o espécime é fixado em formol a fim de interromper a autólise tecidual. Em seguida, na etapa de clivagem, a peça sofre redução de tamanho para facilitar a penetração do agente fixador. Caso a amostra seja dente ou tecido ósseo, ela passa por um processo de descalcificação prévio à clivagem. Nas etapas de processamento e inclusão ocorre remoção de líquidos do interior das células para que em seu lugar entre parafina, e o tecido é incluído em um molde para formar um bloco rígido de parafina, o qual será cortado na fase de microtomia. Finas secções teciduais são então aderidas a uma lâmina, coloridas e seladas. **Conclusão:** Um ótimo resultado na obtenção de lâminas histológicas depende da execução correta de todas as etapas do processamento tecidual, sendo também influenciado pelos cuidados do cirurgião-dentista com a amostra a ser enviada ao laboratório.

<http://dx.doi.org/10.5335/rfo.v29i1.15611>

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

² Departamento de Patologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil

Introdução

A histologia é o ramo da anatomia o qual estuda as células, os tecidos e as suas relações com a matriz e o fluido extracelular, utilizando para isso o processamento tecidual (histotécnica). A histotécnica é um conjunto de procedimentos sequenciais que preparam amostras de interesse ao diagnóstico patológico, de maneira que preserve ao máximo o seu aspecto no estado natural *in vivo* para a análise com microscopia óptica¹. Apesar dos grandes avanços na medicina molecular, o microscópio continua sendo a ferramenta mais importante do patologista cirúrgico em sua prática diária². Para esse tipo de análise, os tecidos biopsiados precisam ser processados, cortados e corados com diferentes reagentes. O emprego da coloração com hematoxilina e eosina juntos (HE), método introduzido por Wissowzky, em 1875³, é considerado universal em histologia⁴.

Na odontologia, não apenas o diagnóstico de boa parte das lesões orais exige o processamento de tecidos moles e amostras mineralizadas como dentes e tecido ósseo, mas também diferentes grupos de pesquisa científica necessitam do preparo correto de suas amostras. A compreensão do passo a passo da histotécnica é relevante para o cirurgião-dentista pois lhe permite conservar apropriadamente peças biopsiadas para envio ao laboratório; interpretar de forma adequada o laudo histopatológico e aprimorar sua comunicação com o patologista. Esta revisão narrativa de literatura tem por objetivo sintetizar as etapas fundamentais do processamento tecidual para análise com microscopia óptica utilizando coloração HE, enfatizando o seu emprego na odontologia.

Revisão de Literatura

Fixação

Imediatamente após a biópsia de uma lesão oral, ela deve ser armazenada em um frasco contendo um agente fixador, o qual tem como intuito interromper a autólise da amostra. Na fixação, utilizam-se agentes químicos que conservam a arquitetura original do tecido através da formação de ligações cruzadas entre as proteínas, impedindo a sua desnaturação e ocasionando o endurecimento da peça como um todo. A fixação evita a proliferação de micro-organismos, facilita a posterior inserção de corantes e aumenta a resistência do tecido para as etapas futuras do processamento^{4,7}.

O agente fixador considerado universal para microscopia de luz é o formol, uma solução de formaldeído a 10% (formalina), obtida com a diluição de formaldeído comercial (37% ou 40%) até alcançar a concentração de 3,7% ou 4%, sendo tradicionalmente conhecido como formol a 10%. O formol em solução aquosa é um líquido incolor e com odor desagradável. Pelo fato de o formaldeído sofrer oxidação em ácido fórmico quando exposto à luz e ao oxigênio, ele precisa ser preparado em solução tamponada, isto é, uma solução cujo potencial hidrogeniônico (pH) sofre pouca variação, entre 6,0 e 7,0. Caso contrário, a precipitação do ácido fórmico pode gerar artefatos na lâmina^{4,6,8}.

O tempo de fixação de uma amostra com formol varia entre 6h até 24h, mas outros autores como Caputo, Gitirana e Manso (2010)⁶ apontam a necessidade de um período de imersão maior, de 24h até 48h. O tempo varia em relação às dimensões da amostra e a temperatura ambiente. A recomendação é que o fragmento de tecido não tenha uma espessura superior a 03 mm, do contrário, a entrada e a difusão do agente fixador ficariam prejudicadas. O tempo de fixação diminui quanto maior for a temperatura, pois

a ação do formol é acelerada. No entanto, o aumento da temperatura pode contrair rapidamente o tecido gerando artefatos na lâmina⁴.

Na etapa de fixação, é preciso utilizar um frasco largo com volume de formol 20 vezes maior que o volume da amostra⁵, embora Barbosa et al. (2005)⁹ destaque que um volume 10 vezes maior também produziria uma boa fixação (Fig.2A). Devem-se manter as superfícies da amostra em contato constante com o líquido fixador, e isso pode ser alcançado mediante agitação do frasco⁴. Em seguida, a amostra deve ser lavada em água corrente por 1 a 2 horas⁶ e pode ser armazenada em álcool 70% indefinidamente⁵.

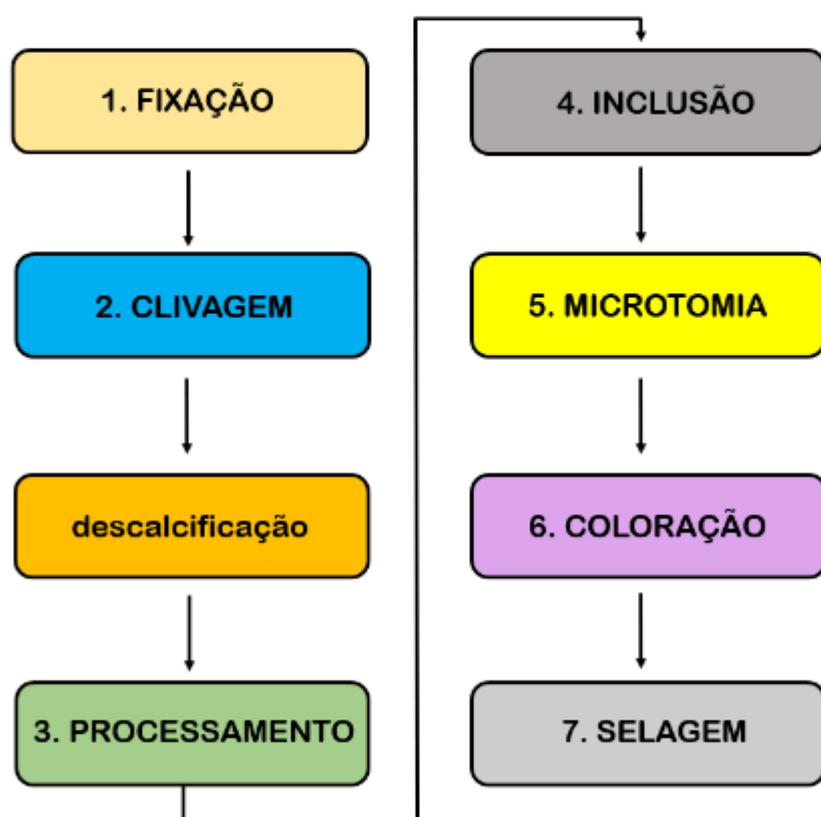


Figura 1 – Fluxograma do processo de histotécnica, começando pela fixação tecidual até a selagem da lâmina pronta para análise em microscópio óptico.

Fonte: autores.

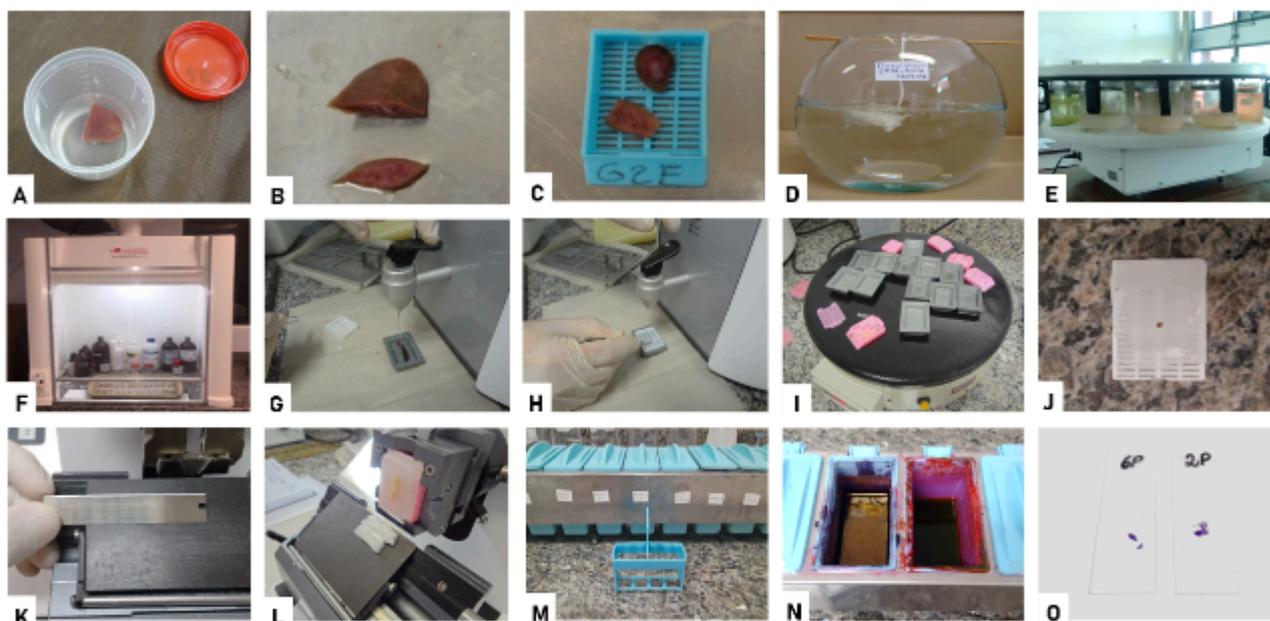


Figura 2 - (A) Amostra de tecido imersa em frasco contendo formol para fixação. (B) Etapa de clivagem, na qual a amostra sofre redução de tamanho. (C) Cassete histológico contendo fragmentos de tecido. (D) Frasco contendo EDTA e a amostra envolta por gaze e suspensa com um barbante para evitar contato com o fundo do frasco. (E) Processador de tecidos em carrossel, cujo objetivo é remover os líquidos do interior das células e substituí-los por parafina. (F) Capela de exaustão. (G-H) Deposição de parafina líquida em uma forma metálica com a peça e anexação de parte do cassete para formar o bloco de parafina. (I) As formas metálicas se mantêm aquecidas numa placa para evitar choque térmico na parafina. (J) Bloco de parafina. (K) Lâmina do micrótomo. (L) Execução de cortes do bloco de parafina contendo tecido no micrótomo. (M) Atrás: bateria de coloração contendo diferentes reagentes e corantes em compartimentos sequenciais; Frente: suporte das lâminas histológicas o qual é inserido nos compartimentos. (N) Hematoxilina (esquerda) e eosina (direita) na bateria de coloração. (O) Lâminas histológicas prontas e identificadas.

Fonte: autores.

Clivagem

Na etapa de clivagem, a peça sofre redução de tamanho para facilitar a penetração do agente fixador, bem como para atingir dimensões adequadas para os procedimentos histológicos seguintes (Fig. 2B). A recomendação para a espessura da amostra é de até 03 mm, do contrário, o líquido fixador não se difundirá pelo tecido a tempo de

impedir sua autólise. No entanto, a espessura necessária dependerá do tipo de órgão que será avaliado^{6,10}.

A clivagem é executada com lâmina de aço afiada com único movimento unidirecional e firme, a fim de obter fragmentos planos e paralelos. Deve-se atentar para a correta orientação dos cortes: em peças sólidas ele segue o maior diâmetro presente. Para órgãos ocos e também para pele e mucosas, o corte é perpendicular à superfície; já para músculos, a secção precisa acompanhar paralelamente o sentido das fibras⁴. Ao término da clivagem, o corte é inserido em um recipiente plástico denominado cassete¹¹ (Fig. 2C), o qual é devidamente identificado e imerso em formol até o começo da etapa seguinte, o processamento⁴. Contudo, tecidos altamente mineralizados, como dentes e ossos, precisam ser descalcificados antes da clivagem.

Tecidos com alta concentração de sais minerais apresentam elevada rigidez, o que impede a secção fina do fragmento e pode ocasionar destruição do fio da lâmina de corte, dificultando o seu processamento. Quando o objetivo da análise de dentes e ossos forem seus constituintes inorgânicos, a técnica preconizada é o desgaste da peça. No entanto, quando a análise envolver a observação do constituinte orgânico, o procedimento técnico empregado deve ser a descalcificação. Nesta etapa, os sais minerais da matriz orgânica são dissolvidos, o que altera a consistência da peça facilitando o seu corte. A descalcificação ocorre após a lavagem da amostra para remover resíduos de fixador e pode ser efetuada através de mecanismos físicos ou químicos, sendo que os físicos complementam os químicos. A escolha do agente descalcificador irá variar de acordo com a urgência do caso, do grau de mineralização da amostra, da técnica de coloração planejada e da intenção da análise^{4,6,12,13}.

A descalcificação química pode ser realizada com o emprego de ácidos, resinas de troca iônica ou métodos histoquímicos. As soluções ácidas, quando constituídas por ácidos fortes, como o ácido nítrico (HNO₃) e o ácido clorídrico (HCl), geram uma rápida

remoção de cálcio dos sais de carbonato ou fosfato do tecido mineralizado, sendo indicadas para análises urgentes. Entretanto, o emprego de ácidos fortes gera danos teciduais e dificuldades na capacidade da amostra receber os corantes. Por outro lado, os ácidos fracos, como ácido fórmico (CH_2O_2), o ácido pícrico ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) e o ácido acético (CH_3COOH), preservam as estruturas celulares e apresentam um efeito fixador concomitante, porém descalcificam a peça lentamente. Ao término da descalcificação, a amostra é imersa durante 24h em uma solução alcalina de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% para neutralização⁶.

Já a descalcificação por métodos histoquímicos possui a vantagem de conservar ácidos nucleicos, enzimas e glicogênio do tecido ósseo, o que não ocorre com o emprego dos ácidos. Ela pode ser realizada de duas formas: com solução tampão de citrato de pH 4,5; ou através de agentes quelantes. Um composto quelante é aquele capaz de se ligar a íons metálicos, removendo-os do tecido e assim formar estruturas em anéis chamados quelatos. O agente quelante mais utilizado é o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por não ser agressivo ao tecido nem afetar sua afinidade com o corante, contudo, exige mais tempo para descalcificar a amostra. Para realizar a descalcificação com ácidos ou com EDTA, o fragmento de tecido é suspenso por um cordão dentro de um recipiente contendo a solução com volume de pelo menos dez vezes as suas dimensões (Fig. 2D). A espessura máxima da peça deve ser de 05 mm e ela não pode encostar no fundo do frasco, pois o cálcio removido pelo ácido deposita-se nessa área. Esse procedimento pode demorar várias semanas, e a solução descalcificadora deve ser trocada diariamente⁶.

Os métodos físicos de descalcificação consistem em: dissociação eletrolítica, em que os íons de cálcio contidos na peça calcificada se desprendem e se deslocam até um eletrodo devido à formação de campo elétrico; o uso de micro-ondas, as quais aquecem a solução descalcificadora e assim ampliam a agitação molecular

aumentando a velocidade das reações químicas e diminuindo o tempo de descalcificação; e com ação de ultrassom, método baseado na agitação molecular cujas vantagens são acelerar a descalcificação e não elevar a temperatura da amostra, preservando com isso a integridade celular^{6,14}.

Existem diferentes reagentes para a descalcificação de dentes, e a sua escolha deverá considerar o tempo requerido para o processo e a integridade do tecido dentário específico que se deseja analisar, assim como a qualidade da coloração da lâmina. Bumalee et al. (2022)¹⁵ compararam os reagentes EDTA neutro 14.4%, ácido nítrico 5%, solução de Anna Morse (50% de ácido fórmico mais 20% de citrato de sódio), ácido fórmico 10%, e um descalcificador comercial para a descalcificação de pré-molares recém-extraídos. Nesse estudo, o ácido nítrico 5% foi o agente descalcificador mais rápido, e, em contrapartida, o EDTA neutro 14.4% foi o mais lento. No entanto, os melhores resultados em termos de preservação da integridade do cemento foram observados para o EDTA, o qual, juntamente da solução de Anna Morse, também se mostrou superior em termos de conservação da integridade tecidual e na qualidade da coloração das células da polpa dentária.

Para descobrir se o tempo de descalcificação já foi o suficiente para a amostra adquirir consistência apropriada para corte, o técnico pode efetuar testes físicos ou químicos. A prova física é obtida por uma avaliação radiográfica ou pela manipulação da peça descalcificada, seja dobrando-a ou através da inserção de uma agulha, alfinete ou lâmina de bisturi, em que a resistência à transfixação determina o grau de desmineralização tecidual. A desvantagem desse teste é o risco de produzir artefatos na lâmina. O teste químico é efetuado adicionando-se oxalato de amônio, $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, em uma amostra do líquido descalcificador removido do fundo do frasco em que estava o espécime. Caso não ocorra formação de precipitado de cálcio, a descalcificação está completa. Com isso, o tecido é então neutralizado e posteriormente lavado^{6,16}.

Processamento

O processamento consiste na remoção de líquidos do interior das células para que em seu lugar entre a parafina, gerando rigidez suficiente para a realização de cortes finos⁶. A parafina, o meio de inclusão mais utilizado em microscopia óptica¹, é constituída por hidrocarbonetos oriundos do petróleo, sendo hidrofóbica e termossensível. A goma arábica e o polietileno são alternativas ao uso da parafina, pois também apresentam as propriedades necessárias para servir como meio de inclusão, tais como compatibilidade aos reagentes do processamento e mudança de fase controlável¹¹.

O processamento da amostra pode ser manual ou automático. O sistema automático é realizado em uma máquina chamada "histotécnico", a qual pode ser do tipo "carrosel", sem sistema à vácuo (Fig. 2E), ou do tipo com transferência de fluidos, em que todo o processamento é realizado à vácuo. O processamento é dividido em três estágios principais: desidratação, clarificação ou diafanização, e infiltração por parafina. A desidratação tem como objetivo remover a água dos tecidos para que a parafina, substância hidrofóbica, possa se difundir pelas células⁶. Para isso, o cassete é imerso em concentrações gradualmente crescentes de álcool etílico (etanol), começando com 70%, em seguida 80%, 90% e por fim, em álcool absoluto¹¹. Tal sequência de banhos alcoólicos é importante para diminuir a contração tecidual que acontece naturalmente com a saída de água, evitando assim a formação de artefatos⁴.

A fase de clarificação ou diafanização tem dois objetivos: remover a gordura da peça, o que na observação ao microscópio será evidenciado como espaços vazios onde antes havia lipídios; e expulsar o etanol proveniente da desidratação do interior dos tecidos, pois a parafina é pouco solúvel ao álcool^{6,11}. O principal reagente empregado nessa fase é o xilol (xileno), em dois banhos de mesma concentração. A

clarificação também pode ser realizada com toluol, benzol, óleo de cedro, acetato butílico e dióxido de dietileno. O xilol é um solvente orgânico de caráter hidrofóbico e miscível ao álcool etílico. Apresenta efeitos tóxicos ao organismo, podendo acarretar náuseas, cansaço, dor de cabeça, irritação das vias aéreas, dano hepático e edema pulmonar. Em vista disso, os profissionais que manipulam o xilol devem o fazer em uma capela com exaustão inferior (Fig. 2F), protegendo-se com máscaras próprias pra solventes orgânicos e com luvas de polivinil, visto que o látex presente nas luvas de procedimento é corroído em contato com o xilol^{4,6,11,17}.

A terceira etapa do processamento é a infiltração por uma substância com afinidade pelo xilol e com solidificação controlada para impregnar o tecido quando fluida, e, após endurecer, possibilitar a execução de cortes finos. A parafina é o material mais utilizado para infiltração. A parafina apresenta-se sólida em temperatura ambiente, sendo necessário para a infiltração que seja aquecida entre 56°C a 60°C em uma estufa, na qual a amostra tecidual passa por duas imersões na parafina líquida^{4,6}.

Inclusão

A inclusão é a etapa na qual a peça infiltrada por parafina une-se a uma forma metálica contendo parafina líquida para, ao endurecer, formar um bloco permitindo a realização de finas secções. Essa etapa utiliza um dispensador de parafina (Fig. 2G-H) e uma placa aquecida sobre a qual ficam as formas para evitar choque térmico na parafina (Fig. 2I). A inclusão ocorre imediatamente após a infiltração a fim de evitar que o tecido se fragmente com o choque térmico da parafina do interior das células com a aquecida no molde. Dependendo da morfologia da peça e do estudo a que se destina, o profissional que realiza a inclusão deve planejar o posicionamento do fragmento no molde em relação à incidência do corte na etapa seguinte, a microtomia. A superfície a

ser visualizada no microscópio óptico é disposta para baixo na forma de parafina líquida, com, por exemplo, amostras longas ordenadas longitudinalmente e órgãos ocos arranjados no plano transversal⁶.

Microtomia

O objetivo da microtomia é realizar cortes do tecido incluído no bloco de parafina (Fig. 2J) para obter secções finas o bastante para a luz de um microscópio óptico o atravessar. Esse procedimento é realizado através de um micrótomo, um aparelho com suporte para o bloco de parafina o qual é aproximado de uma navalha quando se aciona um braço rotatório, gerando cortes sucessivos de espessura padronizada. As lâminas do micrótomo (Fig. 2K) podem ser fixas e confeccionadas em aço, ou descartáveis e produzidas em platina ou com material cromado. As navalhas de perfil alto possuem fio cortante de 1 cm a 1.5 cm, ao passo que as de perfil baixo possuem fio menor ou igual a 0.5 cm. A vantagem do emprego de navalhas descartáveis em relação às de aço é o custo reduzido, pois dispensam a manutenção da afiação com equipamentos caros^{1,11,18}.

Segundo Aarestrup (2018)¹¹, a espessura ideal das tiras de parafina cortadas do bloco varia entre 4µm a 6µm. Já para Gartner e Hiatt (2007)¹ uma espessura de 5µm a 10µm é satisfatória para microscopia óptica. Antes dos cortes, o bloco é resfriado para endurecer ainda mais a parafina. Conforme os cortes são realizados (Fig. 2L), forma-se uma fina fita de parafina a qual é conduzida com o auxílio de uma pinça até um recipiente com água em banho-maria (40°C a 45°C). O intuito desse banho-maria é esticar as fitas obtidas de modo a facilitar a apreensão com uma lâmina de vidro, um procedimento denominado pescagem^{4,6}.

A lâmina de vidro, estando devidamente limpa, seca e identificada, recebe um adesivo para impedir que o corte se desprenda. Os adesivos mais empregados em microscopia óptica são a albumina de Mayer, a qual é resultante da união entre clara de ovos de galinha com glicerina pura¹⁹, a gelatina e a celoidina. Alguns tipos de lâminas de vidro são silanizadas para adesão do corte histológico. Após a pesca do tecido, as lâminas são colocadas em uma estufa a 60°C com o intuito de remover a parafina excedente e aprimorar a adesão da amostra à lâmina de vidro⁶.

Coloração

Ao término da etapa de microtomia, as células encontram-se transparentes e repletas de parafina. Para permitir a diferenciação dos componentes celulares em microscopia óptica, é preciso remover a parafina do tecido e em seguida acrescentar pigmentos para colori-lo. A etapa de coloração precisa gerar contraste entre núcleo, citoplasma e meio extracelular, mantendo os tons estáveis ao decorrer do tempo¹¹. Um corante é um composto orgânico cuja estrutura é constituída por uma parte denominada cromógeno e outra auxocromo. O cromógeno forma-se da união de um anel benzeno com um cromóforo, sendo esse um conjunto de elementos adicionados que são responsáveis pela intensidade da cor, como grupos cetona, nitro, etileno e nitroso. O auxocromo é a estrutura encarregada por tornar o corante seletivo a moléculas específicas, caracterizando-o como um corante ácido, básico ou neutro. Um corante ácido conecta-se a estruturas básicas (acidófilas), como o citoplasma e matriz extracelular, uma vez que seu auxocromo é aniônico, ou seja, possui carga negativa e é atraído por constituintes celulares carregados positivamente. Da mesma forma, elementos celulares com carga negativa (basófilos), como o núcleo, são tingidos por corantes básicos, de auxocromo catiônico, isto é, com carga positiva. A cor é, então,

decorrente das ligações eletrostáticas entre as estruturas ácidas ou básicas com os radicais ionizados teciduais^{1,4,6}.

A coloração é dividida em cinco passos (Fig. 2M). A desparafinização é a remoção da parafina do tecido após a microtomia, utilizando xilol. Primeiramente, se emprega um banho de xilol quente em uma estufa durante 20 minutos, sob temperatura de 60°C. Em seguida, aplica-se um banho de xilol frio por 5 minutos. A etapa seguinte, a hidratação, visa adaptar o tecido para incorporar os corantes solúveis em água. Ocorre através de uma sequência de imersões em álcoois de concentrações decrescentes, começando com álcool 100%, 95%, 80%, 70% e, por fim, em água destilada. Caso os pesquisadores pretendam empregar um corante alcoólico, a hidratação termina no banho de álcool 70%^{6,20,21}.

A hematoxilina, devido seu caráter básico, cora as estruturas ácidas das células em um tom azulado ou arroxeadado, como os ácidos nucleicos, os grupos fosfatos e carboxila de proteínas, e o RNA presente nos ribossomos. Já a eosina, um corante ácido, tingem os componentes de características básicas de uma tonalidade que varia do rosa ao avermelhado, principalmente o citoplasma, as fibras colágenas e as mitocôndrias^{20,21} (Fig. 2N). Depois de colorido, o tecido precisa ter sua água removida, uma vez que o material utilizado para selagem permanente é hidrofóbico. Ocorre então a fase de desidratação, com banhos de álcool de concentrações crescentes: 70%, 80%, 95% e 100%. Por fim, a mostra colorida é novamente exposta ao xilol em uma etapa de clarificação⁶.

Selagem

Conhecida também como montagem, a selagem é a etapa na qual une-se a lâmina com tecido a uma lamínula através de um adesivo (Fig. 2O). A selagem serve para

proteger o tecido corado de injúrias físicas, possibilitar a visualização do corte ao microscópio óptico e preservar a tonalidade dos corantes utilizados. O procedimento deve ser efetuado em uma capela de exaustão de gases, pois há volatilização de solventes^{1,11}.

Discussão

A observação microscópica de uma amostra tecidual possibilita o diagnóstico de grande parte das patologias que assomam a cavidade oral. A ciência vale-se do microscópio óptico desde o século XVII²¹ para expandir o conhecimento da natureza, seja observando a forma das células e de seus componentes, seja identificando anormalidades em tecidos excisados. O material a ser analisado, a coloração e o tipo de microscopia a serem empregados vão requerer técnicas de processamento diferentes, a exemplo da imuno-histoquímica. A microscopia óptica com coloração HE, desenvolvida no século XIX³, contribuiu intensamente no entendimento das causas e dos mecanismos das doenças bucais e ainda hoje é a mais utilizada nos laboratórios de patologia. O processamento tecidual em odontologia não se limita ao preparo de tecidos moles como em casos de papilomas, fibromas ou leucoplasias; ele inclui dentes, tecido ósseo e calcificações que, devido à sua acentuada rigidez, necessitam de uma etapa de descalcificação antes do corte da peça. Sendo assim, consome-se mais tempo para obtenção da lâmina histológica, o objeto de estudo da histologia, o que deve ser considerado no planejamento de uma pesquisa.

No contexto de análise com coloração HE, a histotécnica requer sete etapas sequenciais: fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia, coloração e selagem. Apesar da histotécnica ser realizada em laboratório por um técnico, o seu sucesso também depende do cuidado do cirurgião-dentista no armazenamento e envio

da amostra. Após a biópsia, seja ela incisional ou excisional, a peça cirúrgica não pode ser seccionada nem excessivamente pressionada com pinça hemostática. De fato, a amostra deve ser imediata e completamente imersa em formol dentro de um frasco de boca larga, para garantir sua adequada fixação. Ademais, a compreensão de como ocorre o processamento tecidual possibilita ao cirurgião-dentista, ao observar uma lâmina histológica, diferenciar artefatos resultantes das etapas laboratoriais de verdadeiras anormalidades no tecido, bem como aprimora sua comunicação com o patologista. Aos pesquisadores, esse conhecimento auxilia no planejamento adequado de experimentos e análises envolvendo dentes, modelos animais e lesões orais, colaborando, em última instância, ao avanço da ciência odontológica.

Conclusão

O exame histopatológico com microscopia óptica exige um preparo cuidadoso do tecido a ser observado, o qual é realizado em diversas etapas sequenciais pela histotécnica. O conhecimento desse processo é de grande utilidade aos estudantes e profissionais de odontologia, tendo em vista que o diagnóstico de grande parte das patologias orais envolve a microscopia óptica. Um ótimo resultado na obtenção da lâmina histológica depende da execução correta de todas as etapas da histotécnica no laboratório, contudo, esse resultado também depende dos cuidados do cirurgião-dentista com a amostra a ser analisada.

Abstract

Aim: The aim of this literature review is to describe the fundamental steps of tissue processing for optical microscopy with hematoxylin and eosin (HE) staining of interest in dentistry. **Literature Review:** Tissue processing for HE staining basically consists of 7 sequential steps. Immediately after the biopsy, the specimen is fixed in formaldehyde to stop tissue autolysis. Then, in the cleavage stage, it undergoes size reduction to facilitate the penetration of the fixing agent. If the sample is a tooth or bone tissue, it goes

through a decalcification process prior to cleavage. In the processing and inclusion stages, liquids are removed from the interior of the cells so that paraffin enters in its place, and the tissue is included in a mold to form a rigid block of paraffin, which will be cut in the microtomy phase. Thin tissue sections are then adhered to a slide, colored and sealed. Conclusion: An excellent result in obtaining histological slides depends on the correct execution of all stages of the tissue processing, and is also influenced by the dentist's care with the sample to be sent to the laboratory.

Referências

1. Gartner LP, Hiatt JL. Tratado de histologia em cores. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 592 p.
2. Chan JKC. The Wonderful Colors of the Hematoxylin–Eosin Stain in Diagnostic Surgical Pathology. *Int. J. Surg. Pathol.* 2014;22(1):12-32.
3. Cook HC. Origins of...Tinctorial methods in histology. *J Clin Pathol.* 1997;50:716-720.
4. Nunes CS, Cinsa LA. Princípios do processamento histológico de rotina. *Revista interdisciplinar de estudos experimentais.* 2016;8(1).
5. Timm LL. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. *Canoas: Caderno La Salle XI.* 2005;2(1).
6. Caputo LFG, Gitirana LB, Manso PPA. Técnicas Histológicas. In: *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde.* Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. 290 p.
7. Pereira FEL. Degenerações/ morte celular. In: FILHO, G. B. Bogliolo, patologia geral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2013. 476 p.
8. Musiał A, Gryglewski RW, Kielczewski S, Loukas M, Wajda J. Formalin use in anatomical and histological science in the 19th and 20th centuries. *Folia Medica Cracoviensia.* 2016;56(3).
9. Barbosa RPS, Paiva MDEB, Rodrigues TLC, Rodrigues FG. Valorizando a biópsia na clínica odontológica. *Belo Horizonte: Arquivos em odontologia.* 2005;4(4).
10. Slaoui M, Fiette L. Histopathology procedures: from tissue sampling to histopathological evaluation. In: GAUTIER, J. *Drug Safety Evaluation: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology,* 691, 2011. 427 p.
11. Aarestrup BJ. *Histologia essencial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 476 p.
12. Carvalho LFCS, Neves ACC, Ricardo LH, Rode SM. Tempo de descalcificação e preservação do núcleo celular de tecido mineralizado descalcificado com ácido nítrico a 5%, EDTA a 7% e Biodec-R. *Revista Periodontia.* 2008;18(2).
13. Pittella JEH, Pena GP. Pigmentações/ Calcificações. In: FILHO, G. B. Bogliolo, patologia geral. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara e Koogan, 2013. 476 p.
14. Choube A, Astekar M, Choube A, Sapra G, Agarwal A, Rana A. Comparison of decalcifying agents and techniques for human dental tissues. *Biotechnic & Histochemistry.* 2018;93(2).
15. Bumalee D, Laphthanasupkul P, Songkapol K, Srimaneekarn N, Kitkumthorn N, Arayapisit T. Qualitative Histological Evaluation of Various Decalcifying Agents on Human Dental Tissue. *Eur J Dent.* 2023;17(3).
16. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory methods in histotechnology.* Washington, D.C: Armed Forces Institute of Pathology. American Registry of Pathology, 1994. 279p.
17. Costa KNS, Pinheiro IO, Calazans GT, Nascimento MS. Avaliação dos riscos associados ao uso do xilol em laboratórios de anatomia patológica e citologia. *São Paulo:RBSO.* 2007; 32(116).
18. Mohammed F, Arishiya TF, Mohamed S. Microtomes and microtome knives – A review and proposed classification. *Annals of Dentistry. University of Malaya.* 2012;19(2).
19. Bezerra HL, Rizzo LV, Yu MCZ, Freitas D. Utilização da albumina na citologia esfoliativa em pacientes com conjuntivite alérgica. *Arq Bras Oftalmol.* 2003;66(6).
20. Titford M. A short history of histopathology technique. *The Journal of Histotechnology.* 2006;29(21).
21. Almeida LM, Pires CEBM, Coelho AB. *Microscopia: contexto histórico, técnicas e procedimentos para observação de amostras biológicas.* São Paulo: Érica 2014. 120 p.

Endereço para correspondência:

Gabriel Bassan Marinho Maciel
Rua Álvaro Hoppe, nº 60, Bairro Camobi
CEP 97105410 – Santa Maria, RS, Brasil
Telefone: 559981782880
E-mail: gabrielbmmaciel@yahoo.com.br

Recebido em: 27/02/2024. Aceito: 25/03/2024.