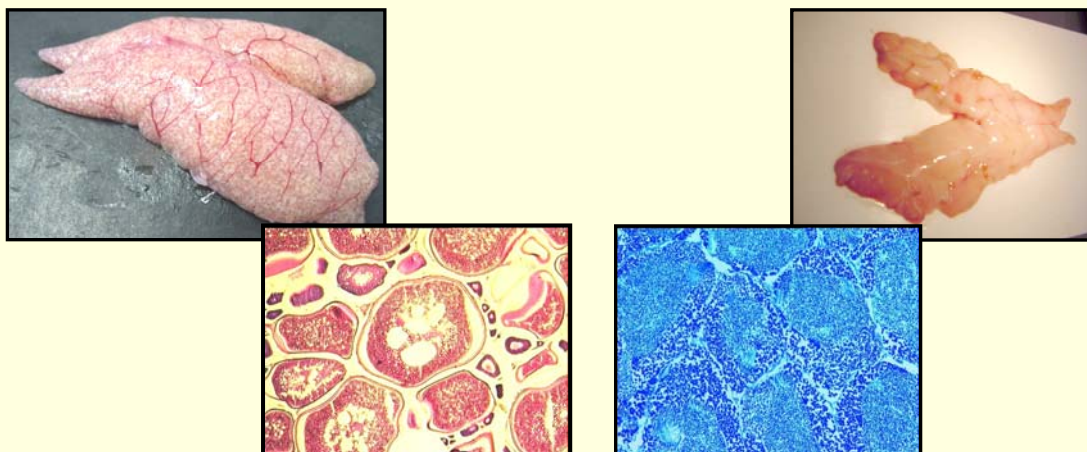


GUIA

PARA O PROCESSAMENTO

DE AMOSTRAS DE GÓNADAS

PARA HISTOLOGIA



Guia de Histologia

Ana M. Costa, M.C. Silva e J. Oliveira



COMISSÃO EUROPEIA

Fundos estruturais



Referência Bibliográfica:Costa, A.M., M.C. Silva e J. Oliveira, 2009. Guia de Histologia. Projecto NeoMav – IPIMAR. Lisboa. 16 p. + XI Anexos.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMO	1
1 – INTRODUÇÃO	2
2 – FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	3
3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	5
3.1 – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA	5
3.1.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	6
3.1.2 – DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO EM PARAFINA	6
3.1.3 – EXECUÇÃO DOS BLOCOS	7
3.1.4 – CORTE DOS BLOCOS	7
3.1.5 – COLORAÇÃO DOS CORTES	8
3.1.6 – MONTAGEM DAS LÂMINAS	9
3.2 – COLORAÇÃO MANUAL	10
3.3 – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM RESINA	11
3.3.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	11
3.3.2 – DESIDRATAÇÃO	11
3.3.3 – INCLUSÃO EM RESINA	12
3.3.4 – PREPARAÇÃO DOS BLOCOS	13
3.3.5 – CORTE DOS BLOCOS	13
3.3.6 – COLORAÇÃO DOS CORTES	14
3.3.7 – MONTAGEM DAS LÂMINAS	14
4 – INFORMAÇÕES FINAIS	15
5 – AGRADECIMENTOS	15
6 – BIBLIOGRAFIA	15
7 – ANEXOS	16

RESUMO

O objectivo deste Guia é descrever detalhadamente as técnicas de processamento de amostras de gónadas de peixe para histologia, bem como fornecer outras informações, como sendo o equipamento existente no Laboratório de Fecundidade do L-IPIMAR e o material e reagentes necessários para o processamento das amostras. São descritas as técnicas de inclusão em parafina e em resina.

Palavras chave: Gónadas, histologia, equipamento, técnicas de inclusão em parafina e em resina, protocolos de execução.

ABSTRACT

Title: Histological Guide for the processing of fish gonads

The aim of this Guide is to describe in detail the histological work carried out at the L-IPIMAR's Fecundity Laboratory, as well as other informations concerning laboratory equipment and material and reagents necessary to process samples. Paraffin and resin technics are presented.

Key words: Gonads, histology, equipment, paraffin and resin technics, protocols.

1 – INTRODUÇÃO

Este Guia foi elaborado como resultado final dos Workshops de Histologia realizados em Lisboa de 22 a 23 de Novembro de 2006 e de 18 a 22 de Junho de 2007, no âmbito do projecto NeoMav. O seu objectivo é fornecer informação sobre as técnicas histológicas de processamento de amostras de gónadas (ovários e testículos) usadas na rotina do Laboratório de Fecundidade do L-IPIMAR para observação microscópica.

Os estudos de biologia que envolvem a observação das gónadas femininas e masculinas de peixes, cefalópodes e outros organismos marinhos são vários e incluem aspectos tais como: escalas de maturação, ogivas de maturação e fecundidade. A observação macroscópica das gónadas envolve uma grande percentagem de erro, porquanto determinadas características não são perceptíveis macroscopicamente. Assim, torna-se necessário recorrer à observação microscópica, a qual permite a identificação rigorosa da estrutura interna da gónada.

O Laboratório de Fecundidade do L-IPIMAR, pertencente à Unidade de Recursos Marinhos e Sustentabilidade (U-REMS), dispõe de todo o equipamento, material e reagentes necessários (descritos no **Anexo I**) para a aplicação das técnicas de processamento de amostras para histologia, tanto para inclusão em parafina como em resina. A parafina é, em geral, o meio de inclusão adequado para o processamento de gónadas tanto de peixes como de cefalópodes. No entanto, a resina permite fazer cortes mais finos, o que lhes confere uma maior transparência e nitidez, que podem ser necessárias em determinados estudos específicos.

Além disso, devem ter-se presentes as vantagens e desvantagens dos dois métodos, nomeadamente, tempo de preparação das amostras, execução dos cortes, coloração e montagem, qualidade dos cortes e tipo de processamento e custos, os quais estão compilados na **Tabela 1**:

Tabela 1 - Comparação entre os dois métodos de inclusão – parafina e resina

	Parafina	Resina
Tempo de preparação dos blocos	Mais rápido (2 dias)	Mais demorado (5 dias)
Execução dos cortes	Mais fácil (micrótomo rotativo)	Mais difícil (micrótomo de corredeira e montagem prévia dos blocos)
Coloração	Automatizada	Manual
Montagem	Entellan [®]	Entellan [®]
Transparência dos cortes	Menos transparentes	Mais transparentes
Tipo de processamento	Muitas etapas automatizadas	Totalmente manual
Temperatura ambiente	Fortemente dependente	Fortemente dependente
Humidade do ar	Independente	50 – 55 %
Acção sobre os tecidos	Actua a quente	Actua a frio
Custos	Menos dispendioso	Mais dispendioso

Durante todo o processamento das amostras devem cumprir-se as regras básicas de conduta e segurança em laboratório, compiladas no **Anexo II**.

2 – FIXAÇÃO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras destinadas a histologia devem ser fixadas imediatamente após a captura dos exemplares, os quais nunca devem ser congelados (Hunter, 1985; Macewicz, comunicação pessoal). A formação de cristais de gelo provoca o rebenamento das estruturas internas das gónadas, tornando impossível a sua observação (Arruda, 1983).

Para cada espécie de peixe deve ter-se em atenção qual o fixador mais indicado referido na bibliografia, sendo os mais utilizados os seguintes: formol neutro a 4% ou 10% (formaldeído a 37%, neutralizado com carbonato de cálcio ou com hidrogenofosfato mono-sódico + hidrogenofosfato di-sódico), solução de Bouin (ácido pícrico + formol + ácido acético glacial), solução de Sanfelice (formol neutralizado + ácido acético glacial + ácido crómico) e AFA (álcool + formol + ácido acético). A solução de Bouin é um excelente fixador do núcleo e das estruturas nucleares (fixação durante cerca de 24 horas). Este fixador é muito útil para os estudos dos testículos e esperma ou para a observação das oogónias e dos primeiros estados oocitários. Nos tecidos fixados com solução de Bouin, as

colorações ficam mais contrastadas e brilhantes. No que diz respeito ao formol e ao solvente a utilizar, a água doce é claramente preferível em relação à água salgada (Lockwood e Daly, 1975). É fundamental que o formol neutralizado tenha pH=7 para evitar a alteração das células e/ou produção subsequente de metanol. Os tampões mais utilizados são o borato de sódio (borax), o acetato de sódio (com os quais é necessário acertar o pH com a utilização de um aparelho medidor de pH ou com fitas indicadoras, embora menos rigorosas) e os fosfatos de sódio (mono e dibásico), sendo estes últimos os mais aconselhados para gónadas de peixe (Witthames, 2008) e com os quais já não é necessário corrigir o pH. O protocolo para a tamponização do formol está descrito no **Anexo III**.

A fixação com formol deve fazer-se durante pelo menos 10 dias à temperatura ambiente (o formol penetra relativamente rápido nos tecidos mas o processo de fixação é mais lento). É igualmente de grande importância o tamanho dos recipientes para fixação do material e o volume do fixador. Os recipientes deverão ser de plástico, para facilitar o manuseamento, de boca larga, para não danificar a gónada ao retirá-la (o endurecimento da gónada após a fixação torna-a mais frágil e quebradiça do que quando se introduz no recipiente em fresco) e com uma capacidade que permita que o volume do fixador seja no mínimo equivalente ao triplo do volume da gónada (Macewicz, comunicação pessoal). Nos casos de gónadas muito grandes pode optar-se por separar e fixar os dois lobos individualmente. As gónadas poderão ser passadas para álcool algum tempo depois de recolhidas, se isso facilitar o seu manuseamento, mas se o tempo que medeia entre a recolha e o processamento for longo é preferível mantê-las no fixador inicial porque o álcool seca e endurece muito os tecidos. As gónadas devem sempre ser pesadas em fresco, pois o seu peso altera-se após a fixação prolongada (Costa, 2003).

Devido à alta toxicidade e às características cancerígenas do formol deve ter-se muita atenção ao seu manuseamento. Devem usar-se luvas e máscaras de protecção e as amostras devem ser sempre manipuladas com pinça e na “hotte”.

Em estudos que envolvam contagem de oócitos (ex.: estudos de fecundidade) pode usar-se o líquido de Gilson (ácido nítrico + ácido acético glacial + cloreto de mercúrio + etanol + água destilada) para dissolver o tecido conjuntivo e intersticial dos ovários, permitindo assim dissociar os oócitos e facilitar a sua contagem, mas a sua toxicidade é muito elevada devido ao cloreto de mercúrio e a qualidade da fixação para histologia é baixa (Witthames, 2008).

3 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A preparação das amostras destinadas a histologia tem de ser feita em condições térmicas adequadas, visto que a temperatura ambiente interfere na rigidez dos blocos. Numa sala muito aquecida os blocos de parafina ficam moles e pouco resistentes ao corte com a faca, enquanto que o ambiente demasiado frio torna os blocos estaladiços. No processo de inclusão em resina, é muito importante que o ambiente não esteja demasiado frio nem que haja correntes de ar, pois atrasam a secagem da resina perturbando o processo de polimerização. Contrariamente, se a temperatura ambiente for demasiado elevada, a resina solidifica dentro do copo, impedindo a sua utilização.

O processamento das amostras quer em parafina quer em resina provoca sempre alguma retracção dos tecidos, devido à fixação, desidratação com etanol e/ou aquecimento na parafina: cerca de 10 – 30% no caso da parafina e 10 – 20% no caso da resina (Saborido-Rey, 2008). É preciso ter isso em conta quando se usam cortes histológicos para fazer medidas de diâmetros de oócitos e/ou medidas de áreas de outras estruturas. Para se obterem os valores reais dessas medidas, é aconselhável previamente estimar a percentagem de retracção para uma dada espécie e tecido, efectuando essas medidas antes e depois do processamento, a fim de depois se converterem os valores obtidos com os cortes histológicos.

3.1 – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA (Anexos IV, V e VI)

Processamento semi-automatizado

Fases do processo:

1. Preparação das amostras
2. Desidratação e inclusão em parafina
3. Execução dos blocos
4. Corte dos blocos
5. Coloração dos cortes
6. Montagem das lâminas

No **Anexo IV** apresenta-se o protocolo para preparação de cortes histológicos de amostras em parafina, fazendo-se em seguida a descrição detalhada das diferentes fases:

3.1.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS (Anexo V – Figura 1)

- Proceder à identificação das cassetes de inclusão escrevendo a lápis em cada cassette a espécie, a origem da amostra (cruzeiro, porto ou outra), a data, o número da observação (identificação do indivíduo), o estado de maturação das gónadas e/ou outras informações (Fig.1 – A).

- Colocar num tabuleiro os recipientes que contêm as gónadas e sobre cada um deles a respectiva cassette (Fig. 1 – B).

- Retirar cuidadosamente com uma pinça a gónada do recipiente para cima da placa de PVC, de modo a não a rebentar (Fig. 1 – C).

- Cortar com um bisturi duas amostras, uma de cada lobo (Fig. 1 – D), e colocá-las na respectiva cassette (Fig. 1 – E). As amostras devem ser cortadas transversalmente e com uma espessura máxima correspondente à altura da cassette.

- Colocar as cassetes num recipiente de plástico grande, contendo álcool comercial a 70% e identificado com a espécie e o reagente que contém (Fig. 1 – F). As amostras deverão ficar nesta fase durante um período mínimo de 24 horas e máximo de 15 dias, até serem processadas.

3.1.2 – DESIDRATAÇÃO E INCLUSÃO EM PARAFINA (Anexo V – Figura 2 e Tabela 2)

No processamento semi-automatizado a desidratação das amostras faz-se num processador de tecidos (Fig. 2 – A), de acordo com o seguinte protocolo:

- Colocar as cassetes, no número máximo de 75, num cesto metálico do processador (Fig. 2 – B).

- O equipamento possui um sistema de programação (Fig. 2 – C) que permite controlar automaticamente o tempo de imersão em cada reagente, bem como a hora a que o processo terá início, permitindo assim ter as amostras prontas para a fase seguinte à hora desejada.

- O processo de desidratação compreende a passagem pelos vários recipientes do aparelho, contendo sucessivamente álcool a 70%, 90%, 96% e absoluto, butanol, parafina + butanol, parafina 42 – 44 °C e parafina 56 – 58 °C (Fig. 2 – D).

- Os tempos de imersão devem ser ajustados para cada fase da desidratação, tendo em conta a espécie de peixe, o tamanho da amostra ou qualquer outro factor que se considere importante, os quais poderão ser gravados na memória do aparelho, até um

máximo de 10 programas (Tabela 2). Depois do programa concluído as cassetes são retiradas do processador e colocadas no doseador de parafina.

3.1.3 – EXECUÇÃO DE BLOCOS (Anexo V – Figura 3)

- Preparar o doseador de parafina, colocando no reservatório superior a parafina com ponto de fusão 56 – 58 °C e os moldes num dos recipientes laterais (Fig. 3 – A).

- Programar o aparelho para que a parafina se encontre no ponto de fusão pretendido à hora a que se irá iniciar o trabalho.

- Colocar as cassetes retiradas do processador no outro recipiente do doseador (Fig. 3 – B).

- Deitar um pouco de parafina no fundo do molde antes de colocar a peça para que esta se sustenha na posição correcta para a boa execução do corte (Fig. 3 – C).

- Verificar que a amostra fica centrada dentro do molde e com a superfície de corte na horizontal.

- Colocar a cassette sobre o molde e encher este com parafina (Fig. 3 – D).

- Os blocos de parafina têm de ser arrefecidos rapidamente numa placa fria para evitar que se formem várias camadas distintas de parafina, o que dificulta o corte (Saborido-Rey, 2008) (Fig. 3 – E).

- No entanto, é necessário esperar alguns minutos antes de colocar os moldes sobre a placa fria para que não ocorra um choque térmico muito violento devido à grande diferença de temperatura entre a parafina líquida (cerca de 56 – 58 °C) e a placa térmica (13 °C negativos).

- Deve colocar-se sempre parafina em excesso à volta dos tecidos (Saborido-Rey, 2008).

- Depois da parafina ter solidificado, retirar os blocos dos moldes e colocá-los num tabuleiro (Fig. 3 – F). 24 horas depois, colocá-los no frigorífico.

3.1.4 – CORTE DOS BLOCOS (ANEXO V – Figura 4)

- Colocar os blocos no congelador cerca de 12 horas antes de se iniciar o corte para manter a consistência da parafina.

- Utilizando-se um micrótomo rotativo, onde se fixa a cassete com o bloco (Figs. 4 – A e B) proceder ao desbaste da parafina que envolve a peça, depois de alinhar o ângulo de corte e ajustar a faca ao bloco.
- Fazer cortes com uma espessura de 20 μm , a qual se vai diminuindo na proximidade da peça.
- Fazer cortes bastante finos, de 3 a 5 μm de espessura, para facilitar a identificação das várias estruturas.
- Com a ajuda de dois pincéis orientar a saída dos cortes, geralmente denominados por “ténias”, devido ao facto de, por ser um micrótomo rotativo, vários cortes ficarem ligados uns aos outros (Fig. 4 – C).
- Colocar estas “ténias” na água destilada do banho-maria, que deve estar à temperatura de 40 °C, para que a parafina estique e os cortes fiquem sem pregas (Fig. 4 – D).
- Colocar uma camada fina de albumina glicerinada (clara de ovo + igual volume de glicerina; agitar até homogeneizar; filtrar) sobre as lâminas de vidro.
- Retirar os cortes da água com a própria lâmina onde vão ser montados, devendo a lâmina ser metida dentro da água do banho-maria por baixo dos mesmos (Fig. 4 – E).
- Os cortes não devem ficar na água do banho-maria mais do que alguns segundos porque se ficarem muito tempo na água expandem-se demasiado (Saborido-Rey, 2008).
- Após escorrer o excesso de água colocar as lâminas em suportes de metal e deixá-las na estufa cerca de 12 horas para se fazer uma pré-desparafinação (Fig. 4 – F), devendo estas ficar protegidas do pó enquanto não se procede à coloração dos cortes.

3.1.5 – COLORAÇÃO DOS CORTES (Anexo V – Figura 5)

- Colocar as lâminas nos suportes do processador de coloração (Figs. 5 – A, B e C), tendo o cuidado de as colocar em ranhuras alternadas, dado que a coloração assim é mais eficiente.
- Este equipamento possui 26 tinas para colocação dos reagentes que irão permitir a coloração dos cortes (Fig. 5 – D), os quais são identificados por etiquetas colocadas no interior do próprio aparelho.

- Um sistema de programação (Fig. 5 – E), incorporado no processador, com capacidade para 15 programas, permite colocar em memória diversos protocolos de coloração que podem ser mandados executar de acordo com o objectivo de cada trabalho.

- O aparelho permite corar 15 lâminas de cada vez (utilizando apenas metade da capacidade dos suportes). Podem ser corados vários suportes em simultâneo, com intervalo mínimo de 15 minutos.

- Os cortes de gónadas em parafina são, por rotina, corados com hematoxilina e eosina, embora possam ser utilizados outros corantes, dependendo das estruturas celulares que se pretenda realçar (Fig. 5 – F).

- Os tempos de imersão em cada tina contendo os vários reagentes e corantes devem ser testados previamente para cada espécie antes de se proceder à programação do aparelho.

- Cada programa de coloração termina com duas passagens por xilol, a primeira de 10 minutos e a segunda de 5 minutos.

- Os reagentes devem ser mudados ou filtrados entre espécies distintas de peixes, quando apresentam impurezas ou estão saturados.

- Cada programa de coloração deve ser numerado e identificado com a respectiva espécie. Estas informações devem ser registadas no bloco de notas do próprio aparelho.

3.1.6 – MONTAGEM DAS LÂMINAS (Anexo V – Figura 6)

- As lâminas podem ser mantidas em xilol até ao momento da montagem, sem qualquer problema para a qualidade dos cortes.

- Proceder à montagem das lâminas com Entellan[®].

- Com uma vareta de vidro colocar uma gota do meio de montagem na lâmina (Fig. 6 – A), sobre a qual se coloca a lamela.

- Para evitar a formação de bolhas, que dificultariam a observação do corte, deve-se pressionar ligeiramente a lamela com uma pinça (Fig. 6 – B), tendo o cuidado de nunca o fazer sobre o corte para não danificar os tecidos.

- Fazer esta operação na “hotte”, sobre uma cartolina preta, que permite ver melhor se existem bolhas do meio de montagem e usando uma máscara, devido à toxicidade do reagente utilizado.

- Colocar as lâminas já montadas num tabuleiro para que o Entellan[®] seque (Fig. 6 – C).
- Passadas 24 horas, com a ajuda de um bisturi, retirar o excesso de Entellan[®] em torno da lamela.
- Arquivar as lâminas numa caixa arquivadora devidamente identificada ou num móvel arquivador (Fig. 6 – D).

3.2 – COLORAÇÃO MANUAL DOS CORTES EM PARAFINA

- Como foi referido, a coloração automatizada dos cortes requer a programação do processador de coloração com base no conhecimento dos tempos que as lâminas devem estar mergulhadas em cada reagente e qual a sua sequência.
- Quando se pretende aplicar uma nova técnica de coloração, quer porque se trata de uma nova espécie ou órgão ou uma nova gama de corantes, pode-se proceder à coloração manual de alguns cortes.
- O procedimento manual requer menos quantidade de cada reagente e evita a constante correcção da programação do aparelho, visto que nestes casos a coloração correcta dos cortes poderá apenas ser conseguida após diversas tentativas dos tempos de imersão em cada corante.
- Este procedimento deverá ser efectuado na “hotte”, utilizando caixas de coloração (**Anexo VI**, Fig. 7 – A).
- Colocar as lâminas dentro dos cestos de coloração (**Anexo VI**, Fig. 7 – B) ou em caixas de coloração verticais (**Anexo VI**, Fig. 7 – C).
- Identificar na tampa os reagentes contidos em cada caixa (**Anexo VI**, Fig. 7 – D) e colocá-los pela ordem que se pretende seguir no processo de coloração (**Anexo VI**, Fig. 7 – E).
- Controlar os tempos utilizando um cronómetro.
- Uma vez acertados os tempos correctos a aplicar e a sequência dos corantes poderá então proceder-se à coloração automática de todas as lâminas no processador de coloração, introduzindo o programa correspondente.

3.3 – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM RESINA (Anexos VII e VIII)

Fases do processo:

1. Preparação das amostras
2. Desidratação
3. Inclusão em resina
4. Preparação dos blocos
5. Corte dos blocos
6. Coloração dos cortes
7. Montagem das lâminas

No **Anexo VII** apresenta-se o protocolo para preparação de cortes histológicos de amostras em resina, fazendo-se em seguida a descrição detalhada das diferentes fases:

3.3.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS (Anexo VIII – Figura 8)

- Fazer uma folha de registo com a identificação de cada indivíduo – número do cruzeiro, número de estação, dados biológicos (comprimento, peso, sexo, estado de maturação) – e atribuir-lhe um número de ordem.
- Identificar as cassetes de inclusão com os respectivos números de ordem atribuídos a cada indivíduo (Fig. 8 – A).
- Com uma pinça retirar cuidadosamente a gónada do fixador para cima da placa de PVC de modo a não a rebentar.
- Com um bisturi, cortar transversalmente duas amostras, uma de cada lobo, com uma espessura inferior à altura da cassette de inclusão (Fig. 8 – B).
- Colocar as amostras nas cassetes de inclusão, devidamente identificadas a lápis com o número de ordem correspondente ao indivíduo em questão (Fig. 8 – C).
- Colocar as cassetes num copo de vidro de 1000 ml com álcool a 70 % (Fig. 8 – D).

3.3.2 – DESIDRATAÇÃO (Anexo VIII – Figura 9)

- Efectuar 3 lavagens das amostras com álcool a 90 %, com intervalos de 2 horas, após o que se guardam as cassetes para o dia seguinte.

- No dia seguinte efectuar mais 2 lavagens com álcool a 95 %, feitas com o mesmo intervalo de tempo do dia anterior (Fig. 9 – A).
- Substituir o álcool pela solução intermédia (Fig. 9 – B) e esperar mais 2 horas.
- Finalmente, mudar as cassetes para resina activada, onde ficam durante 24 horas (Fig. 9 – C).
- Todas estas soluções são feitas a partir dos reagentes incluídos no kit de resina Technovit 7100 (Fig. 9 – D), da seguinte forma:
 - Preparação da resina activada:
100 ml de resina *Technovit 7100* + 1 g de Hardener I e agitar durante 1 hora
 - Preparação da solução intermédia:
 - 50% de álcool a 95% + 50% de resina activada; agitar durante 5 minutos

3.3.3. – INCLUSÃO EM RESINA (Anexo VIII – Figura 10)

- Identificar a placa de silicone onde se encontram os moldes para inclusão em resina com uma letra, escrita na parte superior, e cada cavidade com o número de ordem correspondente a cada amostra (cassete) (Fig. 10 – A).
- Colocar em cada cavidade a melhor amostra, de acordo com o seu aspecto (Fig. 10 – B).
- Verificar que a amostra fica centrada dentro da cavidade do molde e numa posição horizontal.
- Ao preparar a resina para fazer os blocos devem fazer-se pequenas quantidades de cada vez porque seca muito rapidamente e torna-se impossível deitá-la nos moldes.
- Deitar num copo graduado resina e Hardener II numa proporção de 15:1 (resina endurecida) e agitar num agitador magnético durante 5 minutos (Fig. 10 – C).
- Cobrir as amostras com a resina endurecida, tendo o cuidado de verificar se se mantêm na posição correcta (Fig. 10 – D).
- Para que a resina seque, colocar as placas numa estufa a baixa temperatura, sob a luz de um candeeiro de secretária ou sobre uma placa térmica a baixa temperatura.

3.3.4 – PREPARAÇÃO DOS BLOCOS (Anexo VIII – Figura 11)

- Retirar os blocos dos moldes e cortar com uma tesoura os excessos de resina em torno do bloco.
- Colar os blocos nos paralelepípedos de madeira com super-cola de secagem rápida (Fig. 11 – A).
- Identificar os blocos na parte inferior da madeira com o respectivo número da amostra (Fig. 11 – B) e apertá-los no torno (Fig. 11 – C) durante uns minutos para facilitar a colagem.
- Com uma grossa limar os blocos de modo a diminuir a superfície de corte (Figs. 11 – D e E).

3.3.5 – CORTE DOS BLOCOS (Anexo VIII – Figura 12)

- Fixar os paralelepípedos de madeira com os blocos de resina no micrótomo de corredeira (Figs. 12 – A e B).
- Alinhar o ângulo de corte e ajustar a faca ao bloco.
- Iniciar o processo de desbaste da resina que envolve a peça, fazendo cortes com uma espessura de 20 μm , a qual se deve diminuir quando estes estão já muito próximos da peça.
- Os cortes de gónadas devem ser bastante finos, de 3 a 5 μm de espessura, para facilitar a identificação das várias estruturas (Fig. 12 – C).
- Recolher os cortes individuais com um pincel e colocá-los na água destilada do banho-maria, a 40 °C.
- Preparar as lâminas de vidro, cobrindo-as com uma fina camada de albumina glicerinada.
- Retirar os cortes da água com a própria lâmina de vidro onde vão ser montados, devendo as lâminas ser metidas dentro de água por baixo dos cortes. Quando as lâminas são retiradas da água já trazem os cortes presos.
- Colocar as lâminas nos suportes de metal após remover o excesso de água. Enquanto não se procede à coloração dos cortes estes devem ficar protegidos do pó.

3.3.6 – COLORAÇÃO DOS CORTES (Anexo VIII – Figura 13)

- Corar os cortes com azul de toluidina ou com eosina/hematoxilina, da seguinte forma:

- Coloração com azul de toluidina:

Colocar umas gotas de azul de toluidina sobre o corte (Fig. 13 – A); colocar as lâminas sobre uma placa térmica a 60 °C até o corante estar seco (Fig. 13 – B). Lavar as lâminas em água corrente durante 5 minutos; secá-las e colocá-las num suporte de metal, estando prontas para a montagem.

- Coloração com eosina/hematoxilina:

Colocar as lâminas na hematoxilina durante 20 minutos; lavar em água corrente durante 5 minutos. Secar as lâminas sobre uma placa térmica a 60 °C e colocá-las na eosina durante 10 minutos (Fig. 13 – C). Lavar o excesso de eosina com água destilada; secar as lâminas e colocá-las num suporte de metal, estando prontas para a montagem (Fig. 13 – D).

3.3.7 – MONTAGEM DAS LÂMINAS (Anexo VIII – Figura 14)

- Proceder à montagem das lâminas, utilizando o Entellan[®].

- Com uma vareta de vidro colocar uma gota do meio de montagem na lâmina (Fig. 14 – A), sobre a qual se coloca a lamela.

- Pressionar ligeiramente a lamela com uma pinça, para que não fiquem bolhas que dificultariam a observação do corte (Fig. 14 – B), tendo em atenção de nunca o fazer sobre o corte para não danificar os tecidos.

- Esta operação deve ser feita na “hotte”, sobre uma cartolina preta o que permite ver melhor se existem bolhas do meio de montagem e com o uso de uma máscara, devido à toxicidade do reagente utilizado.

- Colocar as lâminas já montadas num tabuleiro para que o Entellan[®] seque (Fig. 14 – C).

- No dia seguinte, com a ajuda de um bisturi, retirar os excessos de Entellan[®] em torno da lamela.

- Arquivar as lâminas numa caixa arquivadora devidamente identificada (Fig. 14 – D) ou num móvel arquivador.

4 – INFORMAÇÕES FINAIS

- Junta-se em anexo um protocolo alternativo para inclusão de amostras em resina, utilizado em laboratórios ingleses e espanhóis (Witthames, 2000) (**Anexo IX**).

- Os três Manuais de Histologia:

- **Manual de Técnica Histológica – Guia de Trabalhos Práticos**, 1943. A. Celestino da Costa e P. Roberto Chaves. Livraria Portugália, Lisboa, 544 pp.
- **Técnicas de Histologia Animal**, 1950. R. Martoja e M. Martoja-Pierson. Toray-Masson S.A. Ed. Barcelona, 350 pp.
- **Theory and Practice of Histological Techniques**, 1990. Ed. John D. Bancroft e Alan Stevens, 562 pp.

estão disponíveis no Laboratório e poderão ser consultados na aplicação das técnicas de processamento de amostras.

- No **Anexo X** disponibilizam-se algumas notas e informações de carácter geral que podem ajudar a um melhor e mais rápido desempenho de todo o trabalho.

- O **Anexo A** é um complemento deste Guia, onde se descreve ao pormenor todo o trabalho que decorre no laboratório, desde a recepção das amostras até à sua entrega ao responsável do projecto, passando pela armazenagem e manipulação de reagentes.

5 – AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto NeoMav – Novas Metodologias de Avaliação (QCA-3/MARE-FEDER). O financiamento para a aquisição do equipamento, material e reagentes existentes no laboratório é assegurado pelo Plano Nacional de Recolha de Dados (PNAB). Os autores agradecem à Doutora Cristina Nunes e à Dra. Patrícia Gonçalves pelas sugestões dadas na elaboração deste Guia.

6 – BIBLIOGRAFIA

- ARRUDA, L.M., 1983. Histological changes in the gonads of *Trachurus trachurus* (L.) through the annual cycle. *Revista de Biologia*, 12: 597-608.
- COSTA, A.M., 2003. Efeito da conservação de gónadas em estudos de fecundidade e de maturação. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital*, nº 4, 8 pp.

- HUNTER, J.R., 1985. Preservation of northern anchovy in formaldehyde solution. *In* Lasker, R. (editor). An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the northern anchovy, *Engraulis mordax*, p. 63-65. U.S. Dep. Commer., NOAA Tech. Rep. NMFS 36.
- LOCKWOOD, S.J. e DALY, C. de B., 1975. Further observations of the effects of preservation in 4% neutral formalin on the length and weight of 0-group flatfish. *Journal du Conseil International pour l' Exploration de la Mer*, 36 : 170-175.
- SABORIDO-REY, F., 2008. Applicability of paraffin histology to stereology. FRESH Training school. "Methodological Advancements in Applied Fish Reproductive Biology", Bergen (3-5 de Março de 2008).
- WITTHAMES, P.R., 2000. A manual for the estimation of fecundity and atresia in Mackerel and Horse Mackerel. CEFAS. 31 pp.
- WITTHAMES, P.R., 2008. Relevant fixation techniques and histological protocols FRESH Training school. "Methodological Advancements in Applied Fish Reproductive Biology", Bergen (3-5 de Março de 2008).

7 – ANEXOS

- I. EQUIPAMENTO DO LABORATÓRIO DE FECUNDIDADE
- II. REGRAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO
- III. PROTOCOLO PARA A TAMPONIZAÇÃO DO FORMOL
- IV. PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE AMOSTRAS EM PARAFINA
- V. INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA
- VI. COLORAÇÃO MANUAL DOS CORTES EM PARAFINA
- VII. PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE AMOSTRAS EM RESINA
- VIII. INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM RESINA
- IX. PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE GÓNADAS EM RESINA (ADAPTADO DE WITTHAMES, 2000)
- X. NOTAS E RECOMENDAÇÕES FINAIS
- A. TRABALHO NO LABORATÓRIO PASSO A PASSO

ANEXO 1 – LISTA DE EQUIPAMENTO, MATERIAL E REAGENTES NECESSÁRIOS PARA O
PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DE GÓNADAS

O Laboratório de Fecundidade do L-IPIMAR possui equipamento e recursos humanos que permitem desenvolver várias técnicas de processamento histológico de amostras. O laboratório está equipado com bancadas com armários, água corrente, esgotos, gás, electricidade, ventilação, ar condicionado e uma “hotte” de extracção. O laboratório possui ainda os seguintes equipamentos, materiais e reagentes:

Equipamento:

- 1 Processador de tecidos, Leica, modelo TP 1020
- 1 Unidade de inclusão de parafina, Leica, modelo EG 1140 H
- 1 Placa fria, Leica, modelo EG 1130
- 1 Processador de coloração de lâminas, Leica, modelo Autostainer XL
- 1 Micrótopo rotativo, Leica, modelo RM 2125
- 1 Micrótopo rotativo, Sakura modelo Accu-Cut SRM
- 1 Micrótopo de corredeira, Leica, modelo SM 2400
- 2 Banhos circulares para histologia
- 2 Estufas bacteriológicas e de incubação
- 1 Microscópio, ZEISS, 451889 Axioplan
- 1 Câmara de vídeo, Sony, DXC 1930 P
- 1 Lupa binocular, Leica, modelo MZ 12
- 1 Lupa binocular, Olympus, modelo SZX 12
- 1 Computador com análise de imagem
- 1 Balança electrónica de precisão
- 1 Frigorífico
- 1 Destilador de água
- 1 placa térmica
- 1 Agitador com aquecimento
- 1 Calorímetro isoperibólico, PARR, modelo 1261
- 1 Micro-ondas
- 1 Armário para produtos químicos

Material:

- Agulhas de dissecação
- Alcoómetro/Densímetro
- Armários arquivadores para 5000 lâminas de vidro
- Bidons de plástico de 25 L, com torneira
- Bidons de plástico de 10 L, com boca larga, sem torneira
- Bisturis
- Blocos de madeira
- Caixas com cesto para coloração de lâminas
- Caixas para arquivo de lâminas
- Caixas verticais para coloração de lâminas
- Candeeiro de secretária
- Cartolina preta
- Cassetes de inclusão com tampa, com rede de várias dimensões
- Contentor de azoto líquido
- Copos de vidro graduados
- Esguichos de plástico
- Facas descartáveis para cortes em parafina, Ref. R-35
- Facas descartáveis para cortes em resina, Ref. Histonife H – ref. T-397
- Filtros de papel
- Funis de vidro
- Grosa
- Lamelas com 24 x 50 mm
- Lâminas de vidro 75 x 25 mm, de bordos esmerilados e cantos foscos em 20 mm
- Luvas cirúrgicas
- Máscaras de papel Bilson 2241/Willson 5141
- Moldes metálicos para inclusão em parafina, com 24x24x12 mm
- Moldes em PVC para inclusão em resina
- Pinças de dissecação de bicos normais
- Pinças de relojoeiro
- Pincéis
- Pipetas graduadas
- Placas de PVC
- Pompete
- Provetas de vidro graduadas

- Super-cola rápida
- Suportes de metal para lâminas de vidro
- Tabuleiros de plástico
- Tesouras de bicos rectos
- Torno
- Varetas de vidro

Consumíveis:

Alcoóis:

- Álcool clorídrico (0,3 ml de ácido clorídrico + 250 ml de álcool a 70%)
- Álcool comercial a 70%
- Álcool comercial a 90%
- Álcool comercial a 95%
- Álcool comercial a 96%
- Butanol pró-análise
- Etanol absoluto

Meios de inclusão:

- Kit de resina Technovit 7100, Kultzer, ref. T - 218
- Parafina com ponto de fusão 42 – 44 °C
- Parafina com ponto de fusão 56 – 58 °C

Corantes:

- Azul de toluidina
- Eosina amarela
- Hematoxilina de Harris

Meios de montagem:

- Bálsamo do Canadá
- Entellan[®]

Outros:

- Ácido acético pró-análise
- Ácido clorídrico pró-análise
- Água destilada

- Albumina
- Borato de sódio (borax)
- Caixa de primeiros socorros
- Fitas indicadoras de pH
- Formol comercial 37%
- Fosfato de sódio dibásico e dihidratado pró-análise ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- Fosfato de sódio monobásico e monohidratado pró-análise ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Material de escritório diverso
- Para-Clear
- Xilol pró-análise

ANEXO 1 (Cont.) – EQUIPAMENTO DO LABORATÓRIO DE FECUNDIDADE



“Hotte” de extracção



Processador de tecidos



Processadores



Processador de coloração



Estufa



Inclusão em parafina



Unidade de inclusão de de parafina



Placa fria



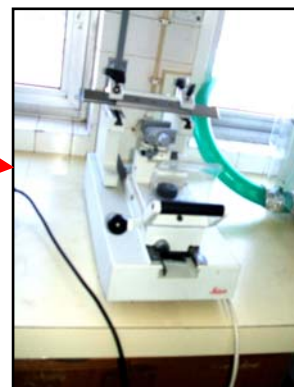
Micrótopo rotativo



Micrótopos



Banho-maria



Micrótopo de corredeira



Microscópio com câmara de video



Lupas



Destilador



Calorímetro

ANEXO II – REGRAS DE SEGURANÇA EM LABORATÓRIO

Durante todo o processamento das amostras devem cumprir-se as regras básicas de conduta e segurança em laboratório:

- Usar bata;
- Manipular reagentes utilizando luvas e máscara;
- Sempre que possível manipular os reagentes dentro da “hotte” de extracção;
- Todos os reagentes utilizados e que se pretendam deitar fora devem ser recolhidos em vasilhas próprias e posteriormente colocados em contentores destinados à recolha de produtos tóxicos;
- Quando se torna imprescindível lavar material utilizado com parafina deve deitar-se bastante água quente na canalização para que os resíduos de parafina não solidifiquem nos canos e os entupam;
- Manter um bom arejamento do laboratório quando se utilizam reagentes que libertem cheiro;
- Assegurar que no fim do dia de trabalho todos os aparelhos ficam desligados, com excepção dos que ficarem programados para iniciar o trabalho no dia seguinte;
- Ao sair do laboratório apagar as luzes e fechar a porta.

ANEXO III – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DE 5 LITROS DE FORMOL

Sais fosfato	MW	Concentração final (M)	Mol	Quantidade necessária (g)
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	137.99	0.02948	0.1474	20.340
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	177.99	0.04601	0.23005	40.947

Concentração final da solução (%)	Concentração inicial do formol (%)	Quantidade de formol necessária (L)	Quantidade de água destilada necessária (L)
4	37	0.550	4.450
10	37	1.350	3.650

Procedimento:

- Dissolver 20.340g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 40.947g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ no volume de água destilada correspondente à concentração desejada
- Agitar a solução num agitador magnético até os sais estarem dissolvidos
- Juntar o respectivo volume de formol a 37% e agitar

ANEXO IV – PROTOCOLO PARA PREPARAÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE AMOSTRAS EM
PARAFINA

Preparação das amostras:

1. Cortar duas peças de cada gónada, com uma espessura inferior à altura da cassete de inclusão
2. Colocá-las numa cassete devidamente identificada
3. Colocar as cassetes num recipiente de plástico com álcool a 70%
4. Deixar em álcool durante pelo menos 24 horas

Desidratação e inclusão em parafina:

1. Colocar as cassetes no copo do processador
2. Correr o programa de desidratação no processador de tecidos

Execução dos blocos:

1. Colocar as peças nos moldes
2. Colocar a cassete sobre o molde
3. Encher o molde com parafina 56 – 58 °C
4. Deixar alguns minutos à temperatura ambiente
5. Colocar os moldes na placa fria
6. Depois da parafina solidificar retirar os blocos e colocá-los num tabuleiro
7. Após 24 horas colocar os blocos no frigorífico

Corte dos blocos com um micrótomo rotativo:

1. Colocar os blocos no congelador 12 horas antes de iniciar os cortes
2. Desbastar os blocos com cortes de 20 µm de espessura
3. Cortar a peça com 3 – 5 µm de espessura
4. Colocar os cortes na água do banho-maria
5. Retirar os cortes com a própria lâmina de vidro, coberta com albumina glicerinada
6. Colocar as lâminas em suportes de metal e pô-los na estufa cerca de 12 horas
7. Proteger as lâminas do pó enquanto não se procede à coloração dos cortes

Coloração dos cortes:

1. Colocar as lâminas alternadamente nos suportes do processador de coloração
2. Correr o programa de coloração do aparelho, utilizando os corantes adequados para cada espécie de peixe

Montagem das lâminas:

1. Manter as lâminas em xilol até serem coradas
2. Colocar uma gota de Entellan[®] sobre a lâmina
3. Colocar a lamela sobre a lâmina e pressionar ligeiramente à volta do corte
4. Colocar as lâminas a secar num tabuleiro
5. Após 24 horas retirar os excessos de Entellan[®] em torno da lamela
6. Arquivar as lâminas numa caixa devidamente identificada

ANEXO V – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA



A – Identificação das cassetes de inclusão



B – Correspondência entre as amostras e as respectivas cassetes



C – Gónada pronta para cortar



D – Corte de duas amostras da gónada



E – Colocação das amostras na cassette



F – Frasco com as cassetes com as amostras

Figura 1 – Preparação das amostras



A – Processador de tecidos

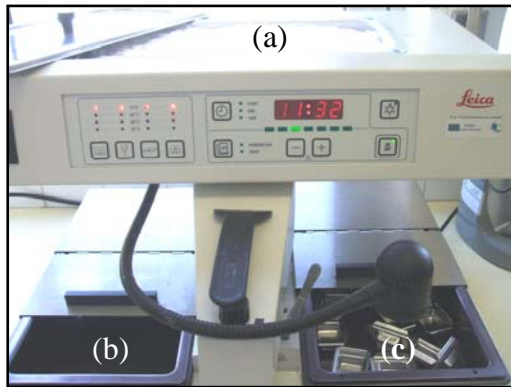


B – Colocação das cassetes no cesto do processador



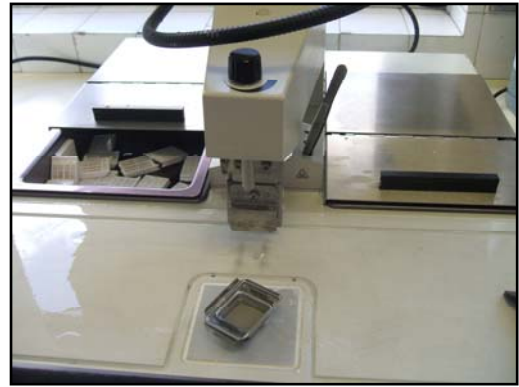
C – Processador de tecidos. Sistema de programação

Figura 2 – Desidratação e inclusão em parafina



A – Doseador de parafina

- (a) Parafina
- (b) Recipiente para colocação das cassetes
- (c) Recipiente para colocação dos moldes



B – Cassetes no doseador



C – Colocação da peça no molde



D – Enchimento do molde



E – Colocação dos moldes na placa fria



F – Blocos já prontos para o corte

Figura 3 – Execução de blocos



A – Bloco de parafina colocado no micrótomo



B – Pormenor da colocação da cassete no micrótomo



C – Cortes em “ténia”



D – Cortes no banho-maria



E – Colocação dos cortes na lâmina



F – Lâminas na estufa

Figura 4 – Corte dos blocos

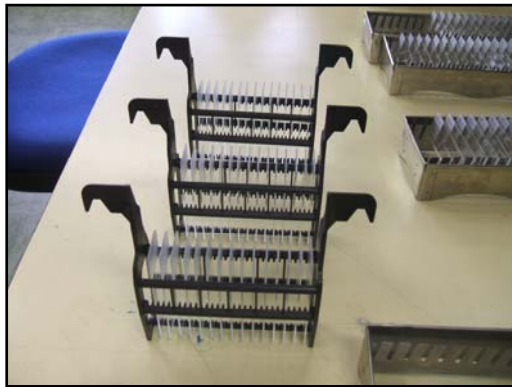


A – Processador de coloração

(a) Identificação dos reagentes colocados em cada tina



B – Colocação das lâminas nos suportes do processador de coloração



C – Lâminas colocadas nos suportes

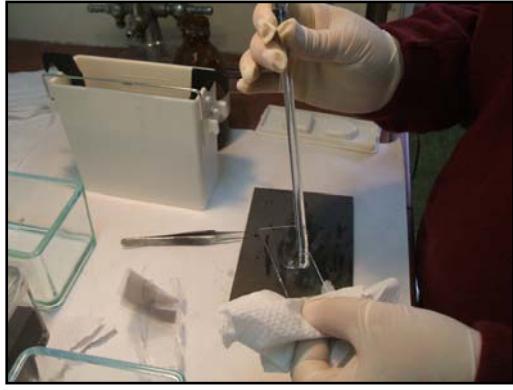


D – Tinas com reagentes de coloração

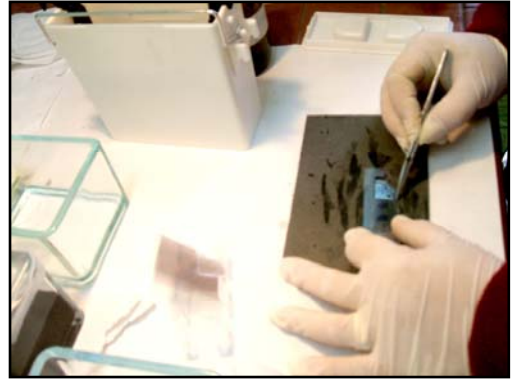


E – Processador de coloração. Sistema de programação

Figura 5 – Coloração dos cortes



A – Colocação do meio de montagem



B – Colocação da lamela



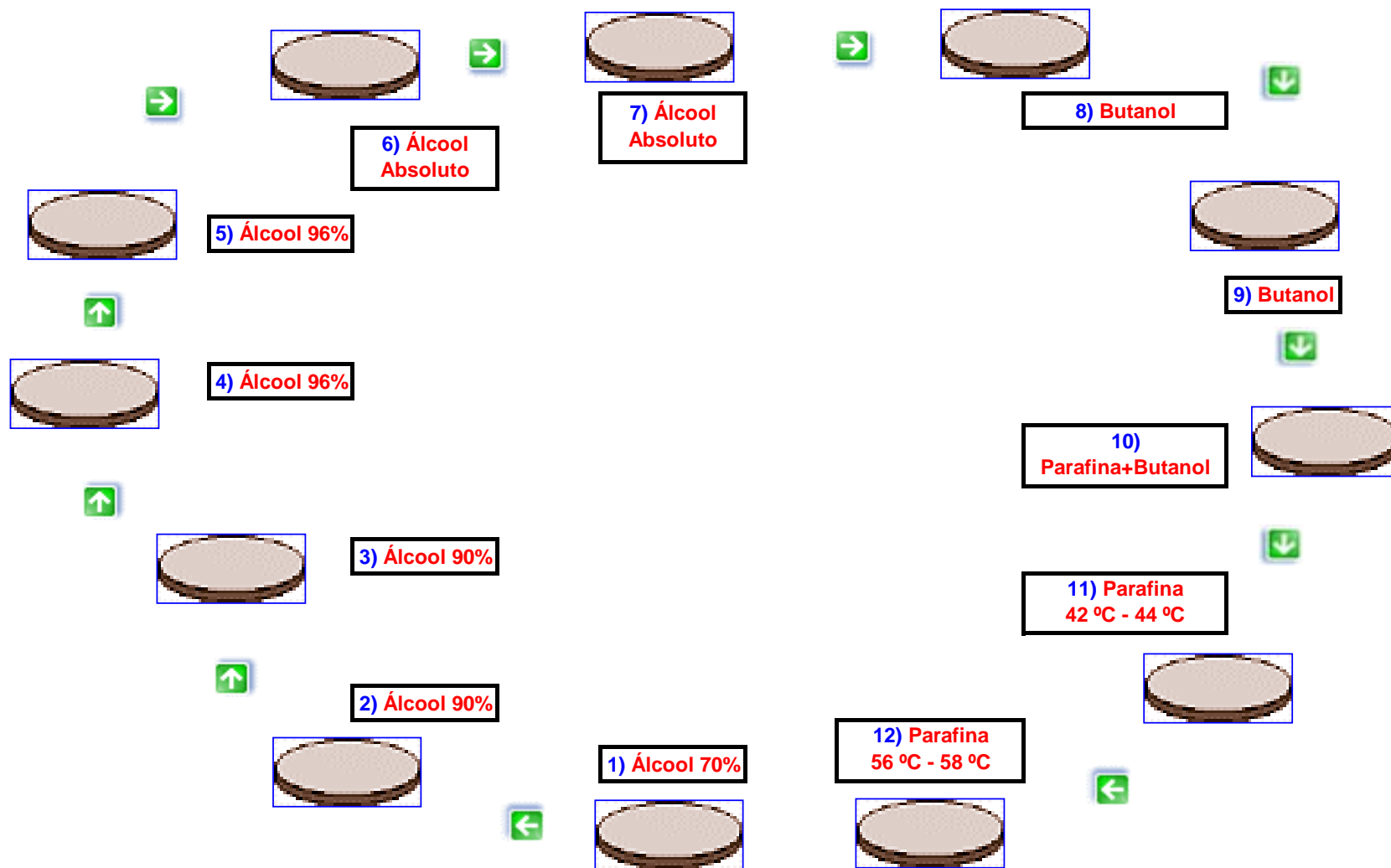
C – Lâminas já montadas a secar



D – Móvel arquivador de lâminas

Figura 6 – Montagem das lâminas

ANEXO V – Figura 2 – D – ESQUEMA DO PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO E DE INCLUSÃO DOS TECIDOS EM PARAFINA



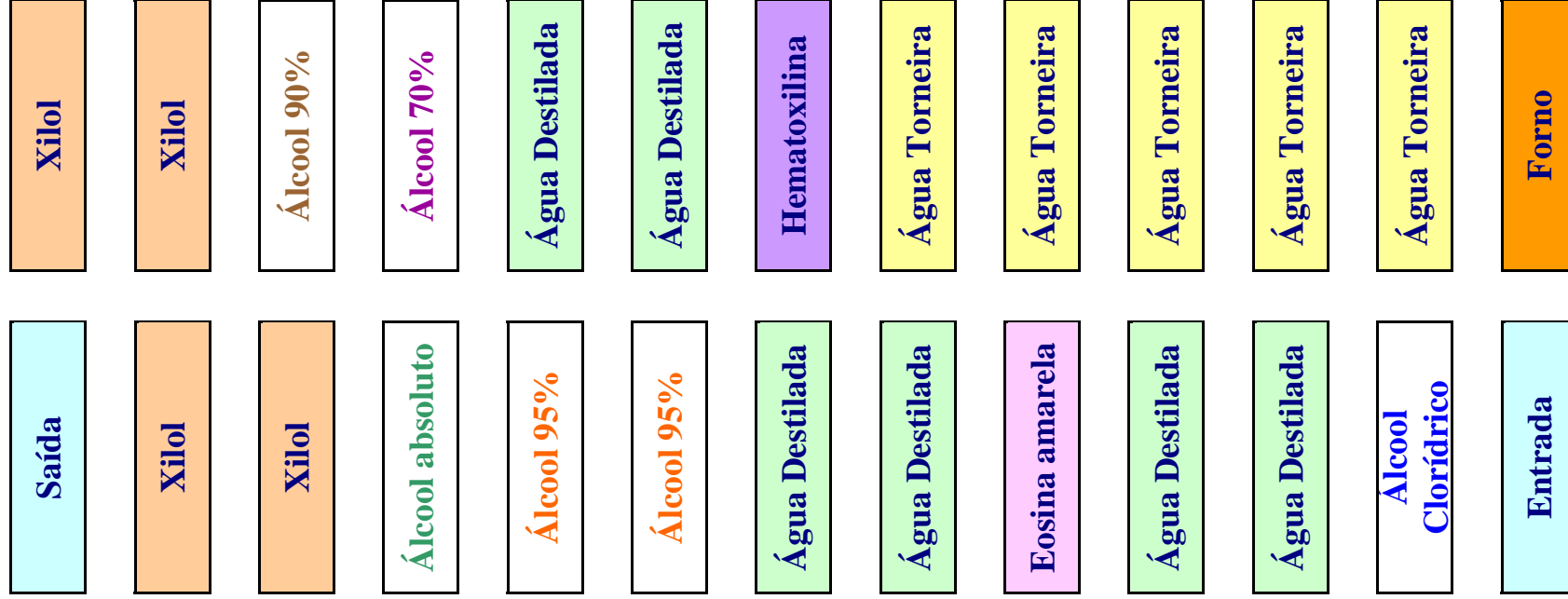
ANEXO V – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA

Tabela 2 – Tempos de imersão em cada reagente (exemplo)

Nº	REAGENTE	TEMPO	VÁCUO
1	ÁLCOOL 70%	15 minutos	NÃO
2	ÁLCOOL 90 %	10 minutos	NÃO
3	ÁLCOOL 90 %	5 minutos	NÃO
4	ÁLCOOL 96 %	10 minutos	NÃO
5	ÁLCOOL 96 %	5 minutos	NÃO
6	ÁLCOOL ABSOLUTO	10 minutos	NÃO
7	ÁLCOOL ABSOLUTO	5 minutos	NÃO
8	INCLUSÃO BUTANOL	30 minutos	NÃO
9	INCLUSÃO BUTANOL	3 Horas	NÃO
10	PARAFINA + BUTANOL	4 Horas	SIM
11	PARAFINA 42 °C – 44 °C	30 minutos	SIM
12	PARAFINA 56 °C – 58 °C	30 minutos	SIM
	TEMPO TOTAL	9 Horas e 30 minutos	

ANEXO V – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM PARAFINA

Figura 5 – F – Esquema da localização dos reagentes utilizados no processo de coloração dos cortes incluídos em parafina



ANEXO VI – COLORAÇÃO MANUAL DOS CORTES EM PARAFINA



A – Caixas de coloração



B – Cestos de coloração



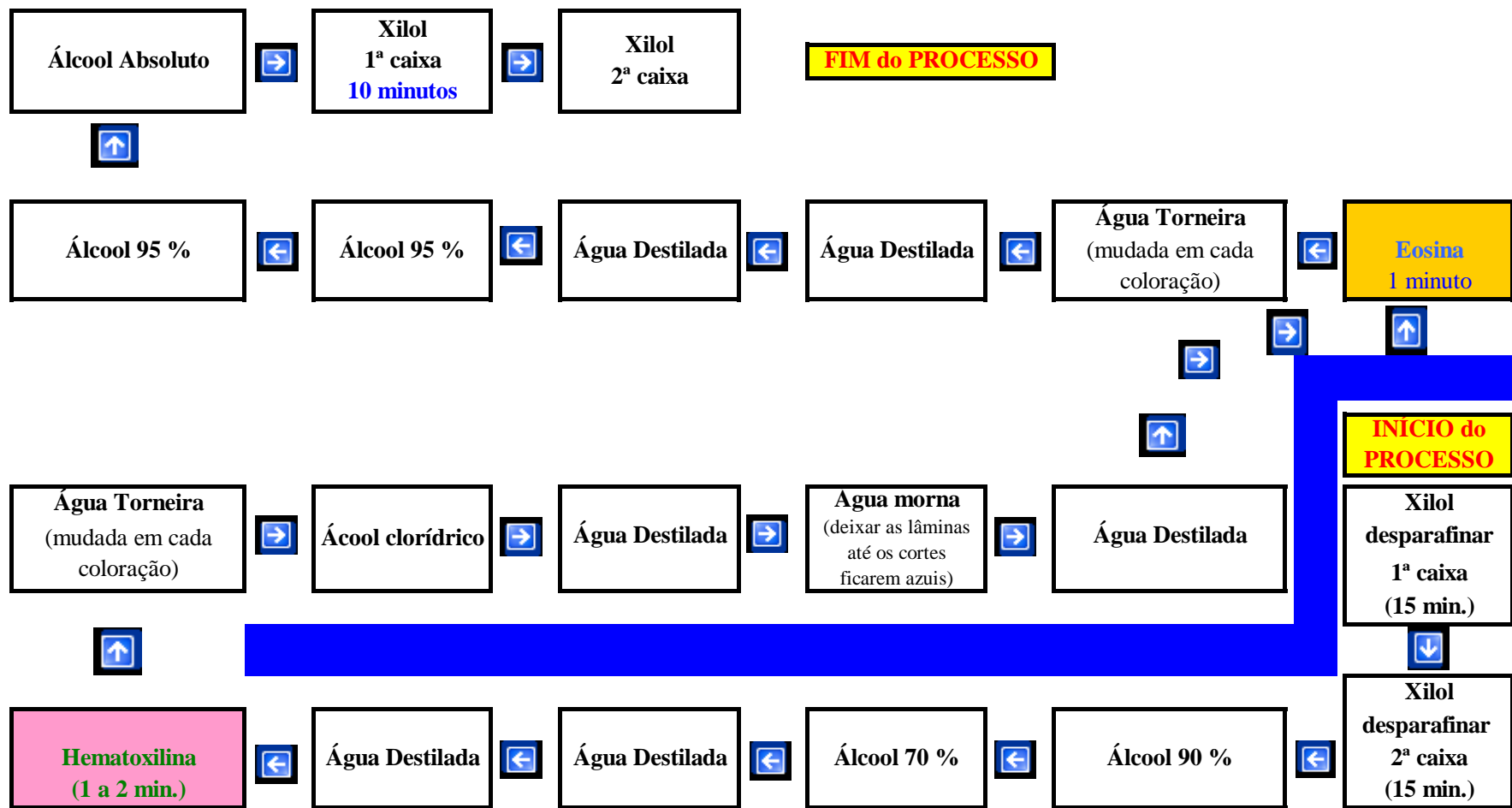
C – Caixa de coloração vertical



D – Identificação do reagente
contido na caixa de coloração

Figura 7 – Caixas de coloração

ANEXO VI – Figura 7 – E – ESQUEMA DA COLORAÇÃO MANUAL DOS CORTES EM PARAFINA



ANEXO VII – PROTOCOLO PARA INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM RESINA

Preparação das amostras:

1. Cortar duas peças de cada gónada com uma espessura inferior à altura da cassette de inclusão
2. Colocá-las nas cassetes de inclusão devidamente identificadas
3. Colocar as cassetes num recipiente com álcool a 70%
4. Deixar em álcool durante 24 horas

Desidratação:

1. Efectuar 3 lavagens com álcool a 90%, com intervalos de 2 horas
2. Deixar de um dia para o outro
3. Efectuar 2 lavagens com álcool a 95%, com o mesmo intervalo de tempo
4. Preparar a solução intermédia (*)
5. Colocar as amostras na solução intermédia durante 2 horas
6. Colocar as cassetes na resina activada e deixar ficar durante 24 horas

Inclusão em resina:

1. Identificar a placa e as cavidades dos moldes
2. Colocar as amostras nos moldes
3. Preparar a resina endurecida (**)
4. Cobrir as amostras com a resina
5. Colocar na estufa, sobre uma placa térmica ou sob a luz de um candeeiro de secretária para secar

Preparação dos blocos:

1. Retirar as peças dos moldes
2. Cortar os excessos de resina à volta do bloco
3. Colar os blocos em paralelepípedos de madeira identificados na parte inferior
4. Colocar estes conjuntos no torno
5. Limar os blocos com uma grossa para fazer diminuir a superfície de corte

Corte dos blocos com um micrótomo de corrediça:

1. Desbastar os blocos com cortes de 20 µm de espessura

2. Cortar a peça com 3 – 5 μm de espessura
3. Colocar os cortes na água do banho-maria com a ajuda de uma pinça
4. Retirar os cortes do banho-maria com a própria lâmina de vidro
5. Colocar as lâminas em suportes de metal
6. Proteger do pó

Coloração dos cortes:

1. Colocar umas gotas de azul de toluidina sobre os cortes
2. Colocar as lâminas sobre uma placa térmica a 60 °C até o corante estar seco
3. Lavar as lâminas em água corrente durante 5 minutos
4. Secar as lâminas
5. Colocar as lâminas em suportes de metal

OU

1. Colocar as lâminas na hematoxilina durante 20 minutos
2. Lavar as lâminas em água corrente durante 5 minutos
3. Secar as lâminas sobre uma placa térmica a 60 °C
4. Colocar as lâminas na eosina durante 10 minutos
5. Lavar o excesso de eosina com água destilada
6. Secar as lâminas
7. Colocar as lâminas em suportes de metal

Montagem das lâminas:

1. Colocar uma gota de Entellan[®] sobre a lâmina
2. Colocar a lamela sobre a lâmina e pressionar ligeiramente à volta do corte
3. Colocar as lâminas a secar num tabuleiro
4. Passadas 24 horas retirar os excessos de Entellan[®] que estão em torno da lamela
5. Arquivar as lâminas numa caixa devidamente identificada

(*) Preparação da solução intermédia:

50% de álcool a 95% + 50% de resina activada; agitar durante 5 minutos

Preparação da resina activada:

100 ml de resina *Technovit 7100* + 1 g de Hardener I e agitar durante 1 hora

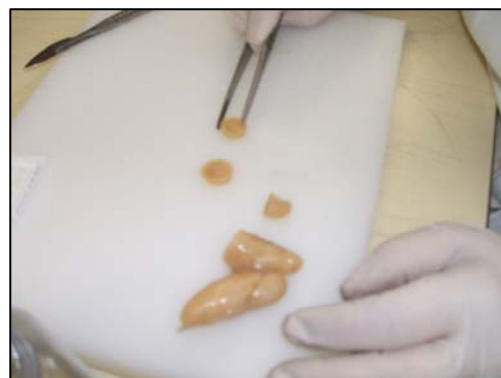
(**) Preparação da resina endurecida:

Deitar num copo graduado resina e Hardener II numa proporção de 15:1 e agitar num agitador magnético durante 5 minutos

ANEXO VIII – INCLUSÃO DE AMOSTRAS EM RESINA



A – Identificação das cassetes de inclusão



B – Corte de duas amostras da gónada



C – Amostras na cassette

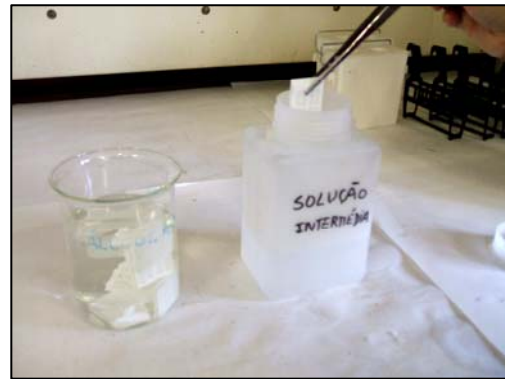


D – Cassetes no álcool a 70%

Figura 8 – Preparação das amostras



A – Mudança dos alcoóis



B – Mudança para a solução intermédia



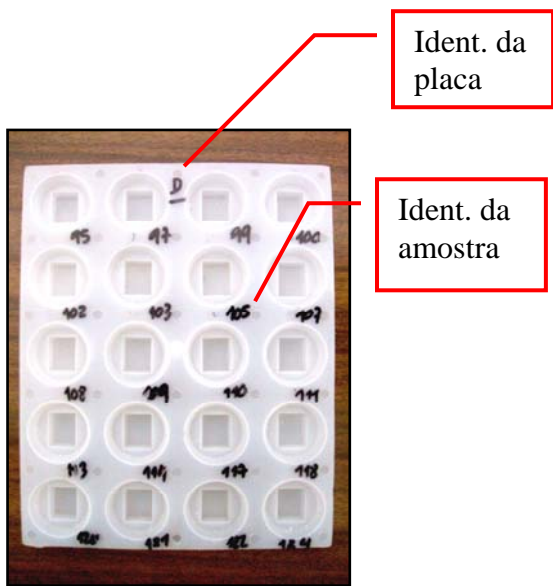
C – Colocação na resina activada



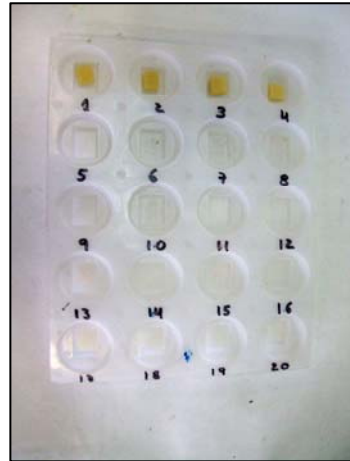
D – Kit de resina^(*)

(*) Ao adquirir os kits de resina é necessário verificar se o prazo de validade é suficientemente alargado pois não se deve utilizar resina fora de prazo, uma vez que o seu poder de secagem se perde e os blocos nunca chegam a solidificar totalmente.

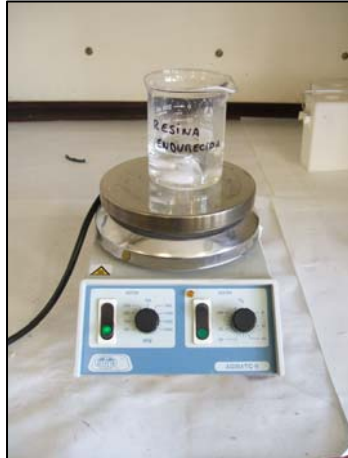
Figura 9 – Desidratação



A – Identificação da placa e da amostra



B – Amostras dentro dos moldes



C – Resina endurecida

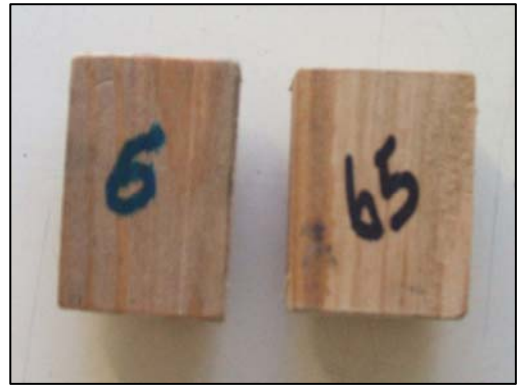


D – Colocação da resina

Figura 10 – Inclusão em resina



A – Blocos colados na madeira



B – Identificação dos blocos



C – Blocos a colar

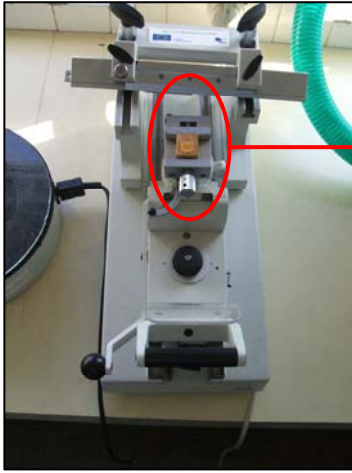


D – Para dar a forma final

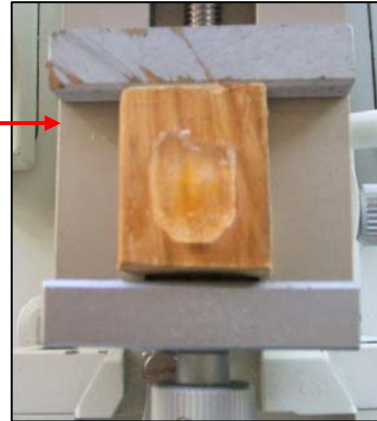


E – Blocos com a forma final

Figura 11 – Preparação dos blocos



A – Colocação do bloco no micrótomo de corredeira



B – Pormenor da colocação do bloco



C – Cortes individuais

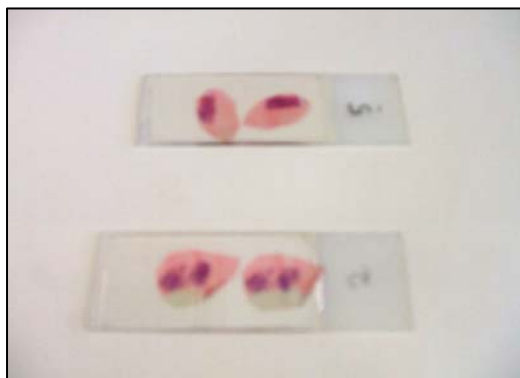
Figura 12 – Corte dos blocos



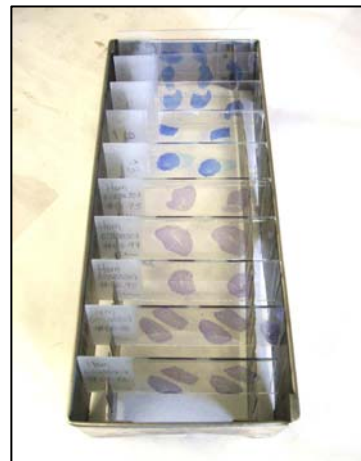
A – Coloração com azul de toluidina



B – Secagem do corante

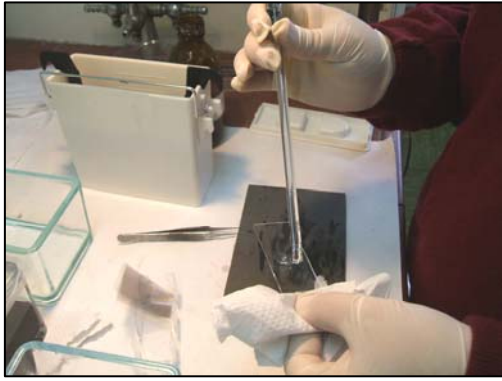


C – Coloração com eosina / hematoxilina

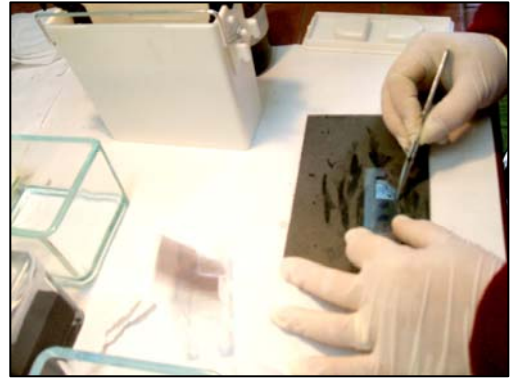


D – Cortes prontos para montar

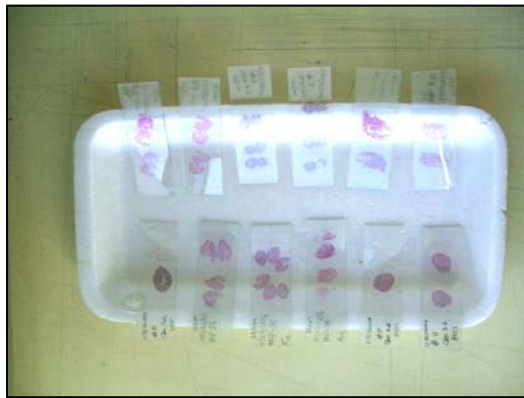
Figura 13 – Coloração dos cortes



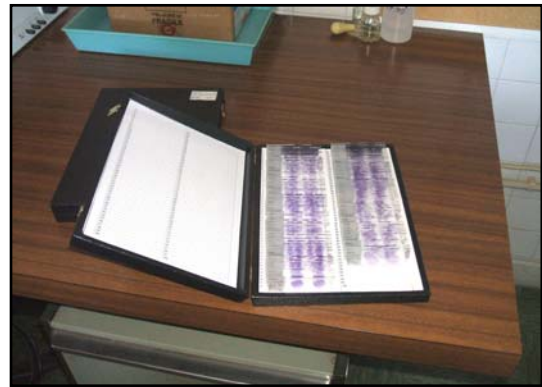
A – Colocação do meio de montagem



B – Colocação da lamela



C – Lâminas já montadas a secar



D – Caixa arquivadora com lâminas

Figura 14 – Montagem das lâminas

ANEXO IX – PROTOCOLO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE CORTES HISTOLÓGICOS DE GÓNADAS EM RESINA (ADAPTADO DE WITTHAMES, 2000)

1 – Preparação das amostras:

Material:

- Bisturi
- Cassetes de inclusão
- Papel de filtro
- Pinças de dissecação de bicos normais

Reagentes:

- Formol tamponado a 3,6%

Procedimento:

- 1.1** – Seccionar a gónada na parte central e cortar 2 amostras com 5 mm de largura
- 1.2** – Colocar as amostras numa cassete de inclusão
- 1.3** – Colocar as cassetes em formol tamponado a 3,6%

2 – Desidratação

Material e equipamento:

- Recipientes de 1 litro com tampa hermética de rosca
- Luvas
- Papel de filtro
- Pinças de dissecação de bicos normais
- Segunda tampa para cada frasco, furada e com uma rede grossa
- Frigorífico

Reagentes:

- Etanol a 70%
- Etanol a 96%
- Etanol a 100%
- Resina
- Resina “Technovit 7100” + Endurecedor I

Procedimento:

O tipo de resina que se utiliza determina os tempos de infiltração. Neste caso utiliza-se a Histroresina **Technovit 7100**. Se a inclusão não for boa, em caso de dúvida é melhor aumentar os tempos de infiltração.

Passo	Solução de infiltração	Tempo	Observações
1	Etanol a 70%	1 dia	Temperatura ambiente
2	Etanol a 90%	1 dia	Temperatura ambiente
3	Etanol a 96%	1 dia	Temperatura ambiente
4	Etanol a 96% + Resina activada (1:1)	2 dias	No frigorífico
5	Resina activada	2,5 dias	No frigorífico

* O etanol deve ser diluído em água destilada

* A resina activada deve ser preparada numa placa com agitação magnética durante 1 hora

2.1 – Colocar as cassetes com as amostras num recipiente com etanol a 70% durante 1 dia. Não se devem colocar mais de 30 unidades em cada recipiente, para permitir o fácil fluxo dos líquidos entre as cassetes.

2.2 – No dia seguinte, substituir o etanol a 70% por etanol a 90% e deixar mais 1 dia.

2.3 – Substituir o etanol a 90% por etanol a 96% e deixar mais 1 dia.

2.4 – Substituir o etanol a 96% por uma solução com 50% de etanol a 96% + 50% de resina activada. Deixar no frigorífico durante 2 dias, agitando o frasco de vez em quando para facilitar a penetração da solução nas amostras. Deve fechar-se bem o frasco.

2.5 – Substituir a solução anterior por resina activada. Deixar no frigorífico durante 2 dias e meio. Depois de retiradas as amostras, filtrar a resina activada com um papel de filtro para eliminar as impurezas e poder reutilizá-la para as amostras seguintes.

Technovit 7100: Resina Activada = 100 ml de resina + 1 g de Endurecedor I
--

3 – Polimerização

Material:

- Etiquetas
- Luvas
- Moldes de silicone
- Pinças de dissecação de bicos normais
- Pipetas de Pasteur plásticas
- Placa de madeira

Reagentes:

- Resina “Technovit 7100” + Endurecedor II

Procedimento:

É importante que o processo de polimerização se faça num laboratório bem arejado. A resina a utilizar tem de ser nova e à temperatura ambiente.

3.1 – Colocar os moldes (de 9 cavidades) sobre um suporte de madeira

3.2 – Preparação da resina endurecida: A resina endurecida mantém-se pouco tempo no estado líquido, pelo que este processo deve ser feito rapidamente. Aconselha-se a fazer a resina em pequenas quantidades de cada vez (por exemplo, de 15 em 15 ml), num recipiente descartável (de plástico). Misturam-se bem a resina e o endurecedor, com uma pipeta de Pasteur plástica ou com uma vareta de vidro. Colocar em cada cavidade do molde a mesma quantidade de resina endurecida, com a ajuda de uma pipeta e pouco a pouco para evitar a formação de bolhas de ar, sem atingir a extremidade do molde.

<p><i>Technovit 7100:</i> Resina Endurecida = 15 partes de resina activada + 1 parte de Endurecedor II</p>
--

4 – Preparação dos blocos

Material e equipamento:

- “Hotte” de extração

- Luvas
- Pinças de dissecação de bicos normais
- Pipetas de Pasteur plásticas
- Recipientes plásticos descartáveis para a resina endurecida

Reagentes:

- Resina “Technovit 7100” + Endurecedor II

Procedimento:

4.1 – Tirar as cassetes do frigorífico e abri-las com a ajuda das pinças e utilizando luvas.

4.2 – Colocar a peça na cavidade do molde pré-cheio e completar com resina até cobrir o tecido e atingir a extremidade de cada molde.

4.3 – Colocar a respectiva cassete sobre cada cavidade e acabar de encher o molde. Se não houver tempo, podem-se deixar as gónadas cobertas com a resina e no dia seguinte acabar de encher o molde e pôr uma etiqueta com o código da amostra, visto que a resina apaga a marcação da cassete. Para encher cada cavidade são necessários 7,5 ml de resina.

4.4 – Guardar o molde à temperatura ambiente durante toda a noite, tentando não mover a placa de silicone.

5 – Armazenamento dos blocos

Material:

- Contentor de plástico grande
- Contentores pequenos

Reagentes:

- Glicerol
- Sílica gel

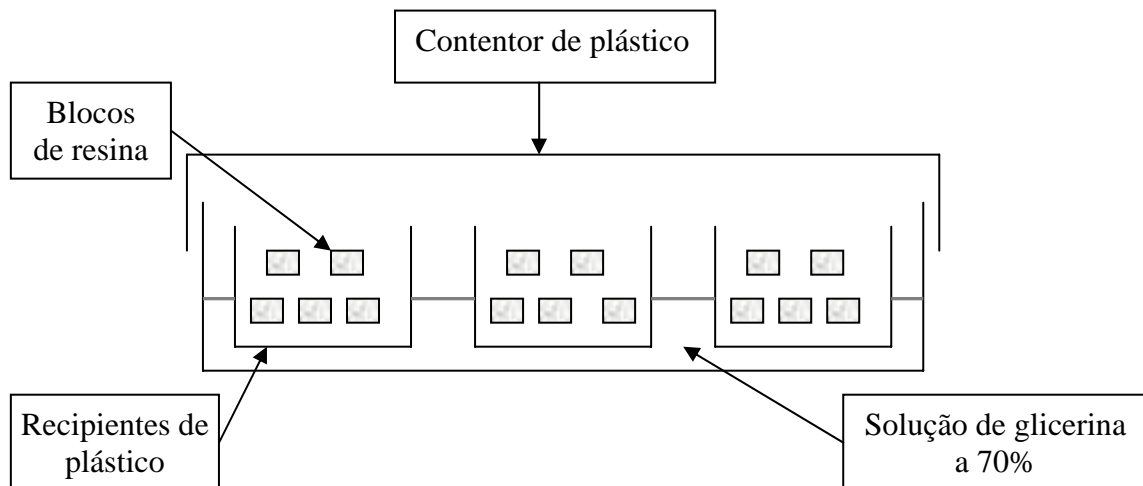
Procedimento:

5.1 – Para fazer cortes em resina os blocos têm de ser mantidos em condições óptimas de humidade, pelo que devem ser armazenados em condições especiais (com humidade

ambiente de 50 – 55%). Para isso, deve-se preparar um contentor grande de plástico, hermético, com uma solução de glicerina a 70% em água, dentro do qual se coloca outro recipiente plástico (seco e aberto) com os blocos das amostras. É necessário pesar de vez em quando a caixa com as amostras para repôr a água que se evapora e manter assim a mesma percentagem de humidade. Os cortes devem ser feitos pouco tempo depois dos blocos estarem prontos, para evitar pesar a caixa.

5.2 – Uma vez realizados os cortes, guardam-se os blocos numa caixa bem fechada, com sílica gel.

5.3 – Se for necessário repetir o corte de um bloco já guardado, terá de se rehidratar o bloco como se descreve no ponto 5.1.



6 – Corte dos blocos

Material e equipamento:

- Banho-maria para histologia
- Lâminas de vidro
- Micrótomo com facas novas
- Pincel
- Água destilada

Procedimento:

6.1 – Desbaste: fazer cortes de 5 µm até conseguir uma secção completa de tecido.

6.2 – Guardar os blocos no congelador a ± 2 °C.

6.3 – Corte: A espessura do corte deve ser de 2 – 3 µm. Quando se conseguir um corte fino e límpido, estendê-lo sobre a água do banho-maria e recolhê-lo com a lâmina.

6.4 – Secagem: Colocar as lâminas sobre uma placa quente durante 1 minuto com temperatura reduzida. Deixá-las sob a luz de um candeeiro de secretária durante toda a manhã e no dia seguinte corá-las.

7 – Coloração com Hematoxilina-Eosina

Material e equipamento:

- Processador automático de coloração (em alternativa, caixas de coloração com cestos para as lâminas)
- Água corrente

Reagentes:

- Álcool ácido
- Carbonato de Lítio
- Eosina-Floxina B
- Etanol a 100%
- Etanol a 70%
- Etanol a 96%
- Hematoxilina de Harris
- Xilol

Preparação dos reagentes:

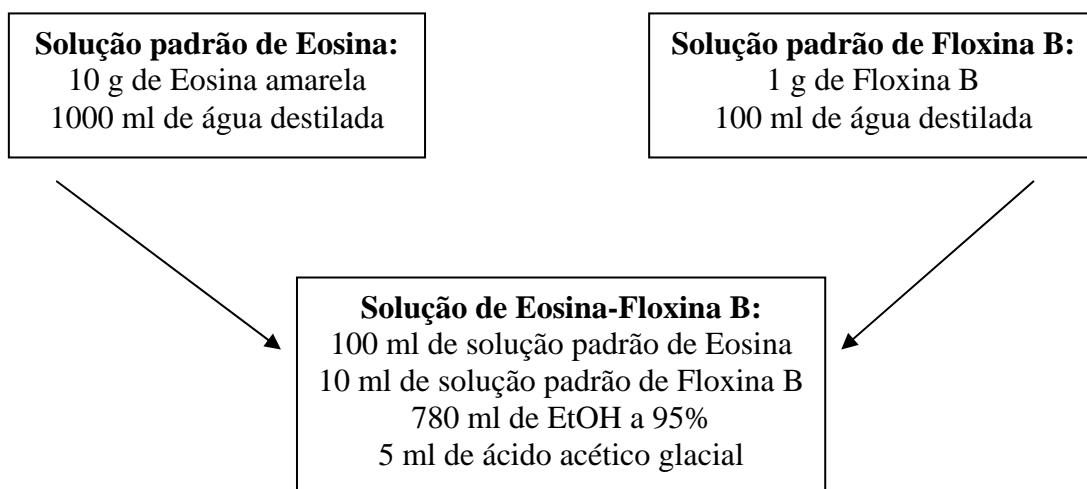
Álcool ácido:

5ml de ácido clorídrico (ClH) concentrado em 1000 ml de etanol (EtOH) a 70%

Carbonato de Lítio:

Dissolver 10 g de Carbonato de Lítio em 1 litro de água destilada (até saturar)

Eosina-Floxina B:



Procedimento:

Colocar as lâminas nos cestos (evitar que fiquem encostadas umas às outras) e iniciar o processo de coloração. Neste caso utiliza-se o protocolo de coloração de Hematoxilina-Eosina.

Processo manual:

Colocar na “hotte” os reservatórios com os reagentes ordenados de acordo com o protocolo de coloração. Introduzir os cestos com as 10 lâminas em cada reservatório, sequencialmente e respeitando os tempos do protocolo.

Processo automático com o processador de coloração “Leica”:

Encher os reservatórios com os reagentes, abrir a torneira de água corrente e ligar o interruptor do aparelho. Colocar o suporte com as lâminas no primeiro reservatório, seleccionar o programa correspondente e iniciar o processo de coloração com a tecla LOAD.

O protocolo de coloração com Hematoxilina-Eosina é o seguinte:

Passo	Reservatório	Reagente	Tempo	Exacto
1	Wash 2	Água	2:00	Não
2	7	Hematoxilina de Harris	10:00	Sim
3	Wash 3	Água	2:00	Não
4	13	Álcool ácido	0:05	Sim
5	Wash 4	Água	1:00	Não
6	14	Carbonato de Lítio	1:30	Sim
7	Wash 5	Água	1:00	Não
8	11	Etanol a 70%	1:00	Não
9	8	Eosina-Floxina B	3:30	Sim
10	4	Etanol a 96%	2:00	Não
11	3	Etanol a 100%	2:00	Não
12	17	Xilol	5:00	Não
13	18	Xilol	3:00	Não
14	Exit	Xilol	0:00	Não

Depois de terminar o processo, pressionar a tecla EXIT e retirar as amostras do último suporte.

Depois de terminado o processo de coloração convém deixar as amostras mergulhadas em xilol até ao momento da montagem, para evitar que sequem.

8 – Coloração com Reagente de Schiffs-Mallory Trichrome H&E

Material e equipamento:

- Processador automático de coloração (em alternativa, caixas de coloração com cestos para as lâminas)
- Água corrente

Reagentes:

- 1:1 de IMS ⁽¹⁾ a 100% e Citoclear ⁽²⁾
- Ácido Fosfomolibdico

- Ácido Periódico
- Citroclear
- Etanol a 100%
- Etanol a 90%
- Fucsina Ácida a 1%
- Reagente Mallory Trichrome

⁽¹⁾ IMS – “Industrial Methylated Spirit”

⁽²⁾ Citroclear – substituto do xilol

Preparação dos reagentes (para 1 L):

Ácido Periódico a 5%:

Dissolver 50 g de ácido em 1 litro de água destilada

Ácido fosfomolibdico a 1%:

10 ml de ácido fosfomolibdico em 1 litro de água destilada

Mallory Trichrome:

5 g de anilina azul

20 g de orange G

20 g de ácido oxálico

Fucsina Ácida a 1%:

10 g de fucsina em 1000 ml de água destilada

Procedimento:

Colocar as lâminas nos cestos (evitar que fiquem encostadas umas às outras) e iniciar o processo de coloração. Neste caso utiliza-se o protocolo de coloração de Schiff's-Mallory Trichrome.

Processo manual:

Colocar na “hotte” os reservatórios com os reagentes ordenados de acordo com o protocolo de coloração. Introduzir os cestos com as 10 lâminas em cada reservatório, sequencialmente e respeitando os tempos do protocolo.

Processo automático com o processador de coloração “Leica”:

Encher os reservatórios com os reagentes, abrir a torneira de água corrente e ligar o interruptor do aparelho. Colocar o suporte com as lâminas no primeiro reservatório, seleccionar o programa correspondente e iniciar o processo de coloração com a tecla LOAD.

O protocolo de coloração com Schiff's-Mallory Trichrome é o seguinte:

Passo	Reservatório	Reagente	Tempo	Exacto
1	1	Ácido periódico a 5%	4.5 min.	Sim
2	2	Água destilada	10 seg.	Não
3	3	Reagente de Schiff's	60 min.	Sim
4	Wash 1	Água	10 min.	Não
5	4	Fucsina Ácida a 1%	1 min.	Sim
6	5	Água destilada	30 seg.	Sim
7	6	Água destilada	30 seg.	Sim
8	7	Ácido Fosfomolibdico a 1%	1 min.	Sim
9	8	Água destilada	10 seg.	Sim
10	9	Reagente de Mallory Trichrome	15 seg.	Sim
11	10	Água destilada	10 seg.	Sim
12	11	IMS a 90%	5 seg.	Sim
13	12	IMS a 100%	5 seg.	Sim
14	13	IMS a 100%	5 seg.	Sim
15	14	IMS-Citroclear 1:1	5 seg.	Sim
16	15	Citroclear	5 seg.	Sim
17	16	Citroclear	5 seg.	Sim
17	17	Exit		

Depois de terminar o processo, pressionar a tecla EXIT e retirar as amostras do último suporte.

9 – Montagem das lâminas

Material:

- Lamelas
- Pinças de dissecação de bicos normais
- Pipeta descartável

Reagentes:

- Meio de montagem (DPX)

Procedimento:

9.1 – Tirar as lâminas dos cestos e deixá-las escorrer.

9.2 – Colocá-las na horizontal sobre papel de filtro e eliminar os restos de corante com a ajuda de algodão embebido em xilol.

9.3 – Colocar uma gota de DPX sobre o corte e deixar cair a lamela obliquamente, evitando a formação de bolhas.

9.4 – Colocar as amostras a secar sobre uma superfície plana, durante 24 horas, sem as deslocar. Se, passado este tempo, ficarem restos de DPX, limpá-lo com cuidado com um algodão molhado em xilol.

9.5 – Colocar as lâminas numa caixa devidamente identificada para posterior leitura.

ANEXO X – NOTAS E RECOMENDAÇÕES FINAIS

- Recuperação de lâminas ou blocos de parafina

Quando as lâminas montadas apresentam bolhas e é necessário recuperar os cortes, podem desmontar-se as lâminas, introduzindo-as num recipiente com xilol, aguardar que a lamela se solte e voltar depois a montá-las. De igual forma, se a peça estiver numa posição incorrecta dentro do bloco de parafina, este pode voltar a fundir-se na estufa, a uma temperatura de 54 – 56 °C, para se poder corrigir a posição da peça e refazer o bloco num novo molde. No entanto, nenhum dos casos é prática comum pois não é totalmente garantido que se consigam recuperar os cortes ou os blocos em bom estado.

- Dificuldade em executar cortes em boas condições

Quando os cortes dos blocos de parafina se tornam difíceis devido à temperatura ambiente estar demasiado elevada pode-se tentar ultrapassar este problema mantendo os blocos no congelador e tirar um a um ou então colocar junto do micrótomo uma tina com água fria e alguns cubos de gelo onde se colocam os blocos até ao momento de os cortar. Outra alternativa, embora mais dispendiosa, é ter dois suportes para facas e manter um sempre no frigorífico, com a respectiva faca, enquanto se utiliza o outro e substituí-los quando for necessário.

- Objectivos do trabalho a realizar

Sempre que se pretenda fazer mais do que um corte de cada bloco deve-se ter em conta o objectivo do trabalho. Em estudos de fecundidade, deve desbastar-se o suficiente entre os dois cortes de modo a não se cortarem os mesmos oócitos. O desbaste deve ser maior do que o diâmetro máximo dos oócitos existentes na amostra, de acordo com a espécie e o estado de maturação. Para a identificação e datação de folículos, os cortes devem ser sequenciais, de forma a se poder “reconstruir” espacialmente cada folículo.

- Validade dos reagentes

Em qualquer trabalho a correcta preparação das amostras é fundamental para a obtenção de bons resultados, pelo que se deve ter sempre muita atenção à data de validade dos reagentes que se utilizam. Em particular as soluções de formol não devem ser usadas após 3 meses, pelo que se deve apontar no recipiente a data em que a solução foi feita (Witthames, 2008). Ao adquirir os kits de resina é necessário verificar se o prazo de

validade é suficientemente alargado pois não se deve utilizar resina fora de prazo, uma vez que o seu poder de secagem se perde e os blocos nunca chegam a solidificar totalmente.

- **Qualidade dos cortes**

Para fazer o desbaste dos blocos podem aproveitar-se as facas velhas que, por apresentarem bordos fragmentados ou irregulares, já não se podem utilizar para fazer bons cortes, os quais ficariam rasgados ou com estrias.

Depois de montar as lâminas, os cortes poderão ser triados numa primeira observação pelo técnico do laboratório (caso tenha formação nesse sentido) para que sejam eliminados e repetidos os que não estiverem em boas condições, facilitando o trabalho do investigador que irá estudar as lâminas.

- **Lavagens com álcool**

No processamento de amostras em resina entende-se por lavagens com álcool a colocação das cassetes em álcool, o qual vai sendo substituído por outro de acordo com os tempos e concentrações indicados no protocolo.

ANEXO A

Trabalho no Laboratório Passo a Passo

Maria do Carmo Silva

1. Entrega das Amostras

- Os trabalhos realizados pelos técnicos do laboratório de fecundidade devem ser solicitados ao responsável do Laboratório. Quem pede o trabalho **deve informar detalhadamente** aquilo que deve ser feito e verificar se é necessário requisitar material para esse trabalho.
- Depois de ter sido formulado o pedido de execução de trabalho as amostras devem ser entregues no laboratório **sempre acompanhadas das folhas de amostragem**, caso contrário não se começam a processar as amostras.

2. Folha de Controlo do Trabalho

- Antes de se começar a processar as amostras fazem-se as folhas de controlo de trabalho com base nas folhas de amostragem. Estas folhas servem antes de mais para verificar se as amostras entregues correspondem de facto à informação que vem nas folhas de amostragem e vão sendo preenchidas à medida que o processo avança; nelas ficam registadas as datas de cada passo do processo assim como qualquer dificuldade ou problema que surja durante o mesmo.

3. Mudança das Amostras para Álcool

- A primeira coisa a fazer é verificar se as amostras estão fixadas em formol ou se já foram **mudadas para álcool a 70%** (nunca com menos de 2 a 3 semanas dependendo do tamanho das gónadas em formol). Se a amostras ainda estiverem em formol devem ser mudadas uma vez que é mais seguro trabalhar com gónadas em álcool do que em formol (só se omitirá isto se assim for pedido pelo responsável do trabalho). É nesta altura que se **pesam as gónadas** se o responsável do trabalho o tiver solicitado e se não tiver sido feito pelo amostrador. (Quem pede o trabalho deve sempre

salientar o facto de o material estar ou não pesado e da necessidade de o fazer). O tempo que medeia entre a mudança para álcool e fazer as cassetes não deve ser superior a 15 dias.

4. Fazer as Cassetes

- As cassetes são umas pequenas caixinhas com perfurações e que vão permitir fazer a desidratação de várias amostras ao mesmo tempo sem perder a identificação de cada uma.
- Nas cassetes de parafina escreve-se a seguinte informação: Espécie, cruzeiro ou porto, estação, amostra. Depois corta-se de um dos lóbulos da gónada uma secção de cerca de 0,5 cm de espessura que é colocada na respectiva cassette e esta é colocada num frasco grande com álcool a 70% e com a identificação das cassetes que contém.
- Depois de se fazerem as cassetes faz-se uma cruz (ou outro sinal que assinale que a amostra já foi cortada) nos frascos das amostras, que são colocados em caixas de cartão ou plástico (se forem muitas amostras as de plástico são melhores e devem ser encomendadas pelo responsável do trabalho). As caixas terão bem visível a seguinte informação: Espécie, cruzeiro ou porto, ano e as estações a que pertencem as amostras. Estas caixas são guardadas no armazém.

5. Desidratação

- Começa-se com a desidratação, que é levada a cabo no Processador de Tecidos onde as cassetes com os bocadinhos de gónada vão passando por vários alcoóis de graduação crescente, por reagente dissolvente da parafina, por xilol, por uma mistura de álcool e xilol e por fim por parafina fundida.
- A primeira coisa é verificar os níveis e estado dos reagentes em cada copo do Processador de Tecidos. As cassetes são então aí colocadas ao fim do dia e ficam a processar durante a noite. Existem duas programações: Uma permite fazer os blocos logo às 10h da manhã e outra só a partir das 14h. A máquina apita quando termina o processo e as cassetes são retiradas e

colocadas no reservatório da máquina de inclusão. (Ver funcionamento no anexo).

6. Fazer os Blocos

- A máquina de inclusão em parafina tem de ser ligada de véspera em modo automático para que comece a fundir a parafina de modo a estar líquida por volta das 10h (se se fazem os blocos só à tarde basta ligar logo de manhã por volta das 9h - 9h30m). A placa refrigeradora é ligada na altura de se fazerem os blocos.
- As formas são cheias com parafina líquida até um terço da sua capacidade e colocam-se na plaquinha fria da própria máquina. A peça de gónada é retirada da cassette e colocada na forma o mais chegado ao fundo possível. É preciso ter atenção para que fique bem centrada e se a secção for demasiado grande (deixando pouca parafina a envolver o tecido) corta-se e coloca-se apenas metade ou um quarto. A parte da cassette que tem a identificação da amostra é colocada por cima da forma. Preenche-se o resto da forma com a parafina de forma a cobrir a cassette. Com cuidado, para evitar que a gónada se movimente dentro da forma, coloca-se esta entre a máquina e a placa fria. Quando a superfície da parafina estiver opaca a forma passa para a placa fria. Depois de bem solidificado e arrefecido desenforma-se o bloco e coloca-se num tabuleiro alto forrado com papel. No dia seguinte os blocos são guardados no frigorífico onde ficam até à véspera de serem cortados, altura em que devem ser colocados no congelador.

7. Corte dos Blocos

- Os blocos são cortados no micrótopo rotativo. A primeira coisa é verificar se a faca descartável está em condições. Mudar a faca sempre que o micrótopo não é utilizado há algum tempo. Depois regula-se a espessura para 20 μm para se proceder ao desbaste (retirar o excesso de parafina e obter um corte inteiro da secção). Fazem-se cortes de espessura decrescente até se chegar à espessura pretendida: normalmente entre 5 e 3 μm . Os cortes vão saindo seriados (em ténia). Tenta-se cortar uma série de 3 ou 5 cortes conforme se queiram fazer 1

ou 2 lâminas. Para que as ténias sejam contínuas e não tenham rugas é necessário que a temperatura ambiente seja adequada. Se a temperatura for muito baixa o bloco retirado do congelador está duro demais e os cortes enrolam-se e não formam ténia. Pode-se então aquecer com a cabeça do polegar ou bafejar. Se a temperatura for muito alta o bloco rapidamente aquece amolecendo a parafina e as pregas nos cortes tornam-se permanentes. Por isso é essencial que o ar condicionado esteja a funcionar no quente ou no frio conforme os casos.

- Os cortes retiram-se com um pincel ou uma pinça, sempre com o cuidado de não danificar o corte e colocam-se num banho de água destilada (que deve estar limpa) a uma temperatura que pode variar entre os 38° e 42°C, dependendo da temperatura ambiente, da espécie e estado de maturação da gónada com que se está a trabalhar. As pregas, se existirem, vão desaparecer. Passa-se depois a lâmina sob o corte para o recolher. O corte adere à lâmina e retira-se tudo da água. Deixa-se secar um pouco a lâmina no bordo da tina do banho-maria.
- Escreve-se a informação das cassetes nas lâminas que são colocadas num suporte para lâminas. Os suportes são colocados na estufa de um dia para o outro de forma a acabar de secar e de iniciar a desparafinação.
- Colocam-se os blocos cortados em tabuleiros e depois ao fim de algum tempo vão-se guardando em sacos de plástico com a identificação das amostras que contêm. Os sacos, depois de todo o trabalho concluído e verificado são guardados em caixas ou caixotes que ou são entregues aos responsáveis do trabalho ou guardados no armazém.

8. **Coloração das Lâminas**

- No dia seguinte retiram-se os suportes da estufa. Se não se fizerem as colorações de imediato tapam-se os suportes com papel de laboratório para que as lâminas não apanhem pó. O ideal é fazer logo as colorações.
- A máquina de coloração automática consiste em vários recipientes com uma série de reagentes e um braço automático que vai fazer passar as

lâminas por esses reagentes pela ordem e tempos previamente programados. Existem uns suportes próprios para colocar as lâminas e o braço automático vai movimentando esses suportes. Como nem todas as espécies são iguais cada uma tem um programa (anexo).

- A primeira coisa a fazer é verificar os níveis dos reagentes. Cada recipiente tem três traços: máximo, normal e mínimo. Sempre que estiver a chegar ao mínimo é necessário acrescentar o respectivo reagente. É necessário também verificar a saturação dos reagentes e trocá-los sempre que necessário. A Hematoxilina tem de ser filtrada com frequência.
- Os suportes da máquina têm uma capacidade de 30 lâminas cada mas como se preenchem com um intervalo de um espaço entre cada lâmina só se coram 15 lâminas em cada suporte. Selecciona-se o programa que se quer utilizar de acordo com a espécie e inicia-se a coloração. Quando o processo da coloração termina a máquina apita. Retira-se então o suporte para um recipiente igual aos da máquina que serve para transportar as lâminas para a hot e onde estas ficam até serem montadas. Este recipiente tem xilol cujo nível também tem de ser verificado para que as lâminas não sequem até serem montadas (Anexo).

9. **Montagem das Lâminas**

- A montagem consiste em colocar os cortes num meio conservador e cobrir com uma lamela.
- Com uma pinça retira-se a lâmina do suporte tendo o cuidado de pegar só pela parte baça. Seca-se a lâmina por trás e à volta do corte com um pouco de papel higiénico. Coloca-se uma gota de entellan (não pôr muito para que não saia dos limites da lamela) e cobrir a preparação com uma lamela com cuidado para não deixar penetrar bolhas de ar: encostar um dos bordos da lamela ao lado esquerdo da gota de entellan e com o dedo da mão esquerda impedir que a lamela escorregue, enquanto que com a mão direita se segura com a pinça ou uma agulha o outro bordo. Baixar lentamente a ponta da pinça ou da agulha para deixar assentar a lamela

sobre a gota de entellan que se estende numa camada homogénea sem ter bolhas. Lentamente retira-se a pinça ou a agulha.

- A montagem é feita sobre uma cartolina preta porque ajuda a detectar bolhas que têm de ser retiradas: deslizar suavemente e sem exercer muita pressão a agulha ou a pinça pelos espaços que existem à volta dos cortes.
- As lâminas são depois colocadas em tabuleiros baixos, forrados com papel. O tabuleiro fica na hot de um dia para o outro.
- No dia seguinte verifica-se se é necessário limpar o excesso de entellan: raspar com uma lâmina de barbear o entellan seco que saiu para fora dos limites da lamela. Passar a lâmina por álcool a 70% e secar com um pouco de papel higiénico.
- Verifica-se ainda se nenhuma lâmina ficou com bolhas. Se alguma tiver bolha coloca-se no suporte de corar manualmente e ficam numa caixa de vidro de coloração até que a lamela se desprenda e volta-se a montar.

10. **Arquivo das Lâminas**

- As lâminas são arquivadas em caixas próprias. As caixas tem de ter a identificação das lâminas que contêm.
- Ordena-se as lâminas primeiro por porto ou estação e depois por número de observação. À medida que se colocam nas caixas vai-se assinalando nas folhas de controlo do trabalho, verificando se está tudo correcto de acordo com as folhas.
- Depois de todas as lâminas correspondentes a um pedido de trabalho estarem terminadas entregam-se as caixas ao responsável por esse trabalho juntamente com uma cópia da folha de controlo do trabalho.

11. Outros Assuntos

- **Manutenção do stock de reagentes**
 - ✓ Ao longo dos vários processos são utilizados uma série de reagentes que têm de ser preparados no Laboratório. A manutenção de uma quantidade mínima é crucial, por exemplo quando é necessário repôr reagentes nas máquinas porque se não existirem perde-se sempre mais tempo.
 - **Álcool a 70%**: Prepara-se com 70ml de álcool comercial e 30 de água destilada. Verifica-se o grau com um alcoómetro.
 - **Álcool a 80%**: Prepara-se com 80ml de álcool comercial e 20 de água destilada. Verifica-se o grau com um alcoómetro.
 - **Álcool a 90%**: Prepara-se com 90ml de álcool comercial e 10 de água destilada. Verifica-se o grau com um alcoómetro.
 - **Álcool a 95%**: Prepara-se com 95ml de álcool comercial e 5 de água destilada. Verifica-se o grau com um alcoómetro.
 - **Álcool clorídrico**: Prepara-se com 1l de álcool a 70% e 1,2 ml de ácido clorídrico.
 - **Formol**: Utilizam-se actualmente 2 concentrações diferentes, consoante a espécie com que se está a trabalhar: a 4% e a 10%. Além disso é necessário tamponizar o formol de modo a obter um ph neutro. Para isso utilizam-se dois fosfatos. Para se fazerem 5 litros de formol tamponado a 4% dissolvem-se 20.340g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 40.947g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 4,450 L de água destilada e por fim junta-se 0.550 L de formol a 37%. Para se fazerem 5 litros de formol tamponado a 10% dissolvem-se 20.340g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 40.947g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 3,650 L de água destilada, e por fim junta-se 1.350 L de formol a 37%. Para facilitar o trabalho procede-se do seguinte modo: numa proveta graduada coloca-se 1L de água destilada; pesam-se os sais, um de cada vez, e colocam-se dentro da proveta, onde se colocou também um agitador magnético e mexe-se com uma vareta de vidro. Coloca-se a proveta numa placa com

agitador e deixa-se dissolver bem os sais. Despeja-se esta solução para o contentor onde se pretende guardar a solução de formol e acrescenta-se o restante volume de água destilada. Finalmente junta-se o correspondente volume de formol a 37% necessário para obter a concentração final pretendida e agita-se.

- **Eosina:** Dilui-se 1 g de Eosina amarela num litro de água destilada e junta-se 0,5 g de ácido acético. Pode-se utilizar uma concentração maior diluindo 10g de eosina para um litro de água destilada, no entanto todos os nossos programas de coloração têm em conta a concentração de 1:1000.
- **Água destilada:** Antes de ligar o aparelho verificar se a serpentina está coberta de água. Depois liga-se a torneira de entrada, coloca-se o garrafão e liga-se o aparelho. Um garrafão leva cerca de 5 horas a encher.

Por vezes, é necessário limpar o aparelho (sempre que a serpentina estiver suja) por causa da acumulação de calcário. Prepara-se uma solução de ácido acético a 10% (100ml de ácido para 1000ml de água destilada). Coloca-se o aparelho de modo que o tubo de saída de água interna esteja virado para o lavatório. Abre-se a torneira para despejar a água do interior do aparelho. Fecha-se a torneira. Com um funil introduz-se a solução de ácido acético – com muito cuidado para não verter porque pode danificar o aparelho. A Solução deve cobrir por completo a serpentina. Fica assim de um dia para o outro. No dia seguinte abre-se a torneira para que a solução de ácido saia. Fecha-se a torneira. Abre-se a torneira da rede e enche-se até começar a correr pelo tubo de borracha. Despecha-se esta água. Repete-se esta operação quatro vezes. Numa quinta vez deixa-se encher, não se fecha a torneira da rede e liga-se o aparelho como se fosse para destilar. Quando começar a “borbulhar” deixa-se funcionar durante uns minutos. Depois desliga-se o aparelho e aguarda-se cerca de 15 a 20 minutos. Fecha-se a torneira da entrada de água e abre-se a de saída. Se a água estiver muito quente espera-se mais um pouco.

- **Armazéns**

Existem vários locais onde estão armazenados materiais do laboratório de fecundidade:

1. Armazém junto à casa das máquinas do elevador – Estão lá guardadas gónadas já processadas e gónadas por processar. Estão também guardados garrafões de álcool comercial, bem como outros reagentes de outras espécies, mais especificamente dos recursos de profundidade. Assim, é normal que as pessoas desse grupo peçam a chave emprestada.
2. Armário de metal junto às casas de banho – Material de papelaria, caixas de luvas, paraclear, esfregões, sacos transparentes e do lixo.
3. Armário nº 189, embutido na parede – Lâminas de carapau, lâminas de vidro novas, cassetes, pinças, tesouras, bisturis, caixas arquivadoras de lâminas e parafina.
4. Casa das caldeiras no laboratório de crescimento – Frascos novos, garrafões de álcool comercial para reciclar. Aqui ainda há bastante espaço e podem ser guardadas coisas que não envolvam reagentes.


As chaves destes locais estão guardadas no chaveiro na última gaveta do lado direito da secretária do microscópio. As chaves dos cadeados estão com os responsáveis do Laboratório.

- **Fornecer formol e frascos para recolha de gónadas**

Tem sido prática fornecer frascos aos diferentes grupos para recolha de gónadas. É necessário verificar se os grupos de trabalho vão requisitando este material que depois pode ficar armazenado por nós. Também tem sido habitual preparar formol para estas recolhas. É necessário que os responsáveis pelas amostragens avisem com tempo, 2 ou 3 dias no mínimo, que vão precisar de formol para que haja tempo

para o preparar, uma vez que não se prepara muita quantidade a não ser quando se trata de grandes recolhas (por exemplo para os cruzeiros).

12. Anexos

- **Processador de tecidos** – Liga-se no botão atrás da máquina – canto inferior direito. Carrega-se na seta para cima ↑ para levantar o carrossel. Verificar os níveis e estado dos reagentes. Colocar o cesto com as cassetes no suporte que tem uma marca vermelha. Posicionar o cesto no recipiente do álcool a 70% (1) girando o carrossel com a tecla  . Carregar na Tecla Start. É chamado o último programa que foi utilizado. Actualmente usa-se o P4 que permite ter as amostras prontas para fazer os blocos às 10h da manhã do dia seguinte. Para pôr a funcionar carregar outra vez no Start. Existe junto à máquina um memorando de instruções rápido que explica outro tipo de operações tais como programação e outras operações manuais.
- **Máquina de inclusão em parafina** – Liga-se no botão preto do lado esquerdo. Está programada para trabalhar entre as 7h30 e as 16h30. Acertam-se as temperaturas. Ligando de véspera, às 10h da manhã a parafina está líquida e pronta para fazer os blocos. Para a saída da parafina pressiona-se o clip (uma plaquinha vertical) e regula-se o fluxo com a torneira. As temperaturas do reservatório da parafina devem estar entre 55° e 60°C. Quando por esquecimento não se liga a máquina de véspera pode-se utilizar um modo de aquecimento rápido que activado de manhã permite fazer os blocos à tarde. As cassetes deixam-se no carrossel até a parafina estar líquida. Para activar este modo carregar nas teclas mais e menos em simultâneo até que as quatro temperaturas referentes ao reservatório da parafina estejam acesas. Ficam depois a piscar até a parafina estar fundida (entre 2h30m a 4h). Existe junto à máquina um memorando com as instruções das operações mais utilizadas.

- **Máquina de coloração automática** – Liga-se no botão vermelho. No visor aparecem várias operações. Depois de verificados os níveis e estado dos reagentes carregar no F1 que corresponde à opção de corar (Stain). Escolher o programa com as setas ↑ e ↓ (P1 – Sardinha, P2 – Carapau, P6 – Pescada). Colocar o suporte de lâminas no primeiro recipiente e carregar na tecla load à frente no lado direito da máquina. A luz apagar-se-á. Verificar se a tecla à frente do lado esquerdo da máquina se encontra apagada, senão carregar nela. O braço automático virá buscar de imediato o suporte das lâminas. Pode-se carregar de imediato novo suporte. Na primeira estação as lâminas demoram 15 minutos, por isso de 15 em 15 minutos pode-se carregar novo suporte assegurando que se vai retirando sempre quando termina o processo. Quando nos temos que ausentar (hora de almoço, outros trabalhos fora do laboratório, etc.) pode-se deixar na máquina no máximo 3 suportes a corar pois ficarão nas 3 últimas estações que têm xilol e por isso não há problema. Findo o processo retira-se o suporte e carrega-se na tecla à frente do lado esquerdo. No final do trabalho colocam-se as tampas no visor carrega-se no pause e desliga-se a máquina no botão vermelho do lado direito da máquina.



Av. de Brasília ● 1449 - 006 Lisboa ● Portugal
Tel: 213 027 000 Fax: 213 015 948