



**Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica**

**Unidade curricular: Tecnologias Laboratoriais em Anatomia Patológica II**

# **Fixação de Insectos: Estudo comparativo entre Formol Tamponado a 10%, Líquido de Bouin e Bouin Holland**

Ana Rita Rocha<sup>1</sup>, Bruno Santos<sup>1</sup>, Cátia Medeiros<sup>1</sup>, Patrícia Carreira<sup>1</sup>, Ana Paula Casimiro<sup>1,2</sup>, Carina Ladeira<sup>1,3</sup>

1 – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

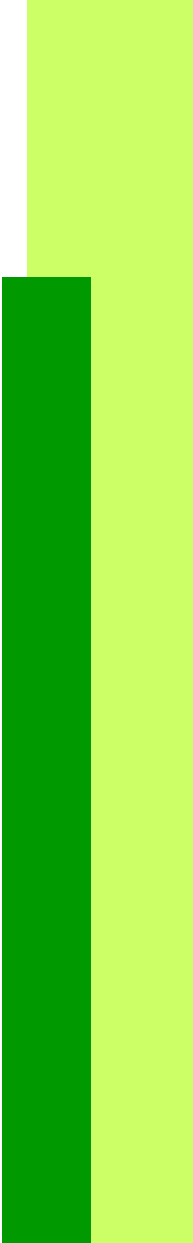
2– Hospital SAMS do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas

3 – CIESP – Centro de Estudos e Investigação em Saúde Pública

*Maio, 2010*

# Sumário

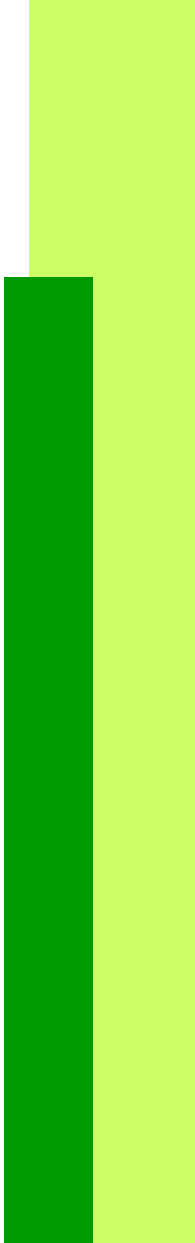
- Introdução
- Objectivos
- Material e Métodos
- Resultados e Conclusão
- Limitações
- Estudos Futuros...



# Introdução

- Actualmente, é notável um interesse crescente relativamente ao estudo de Insectos
  - Interesses agrícolas – controlo de pragas
  - Interesses forenses – Entomologia Forense
- A análise Histológica destes organismos visa completar os conhecimentos já adquiridos

**Qual será o fixador que permite uma melhor observação das estruturas, assumindo o processamento histológico de rotina?**



# Introdução

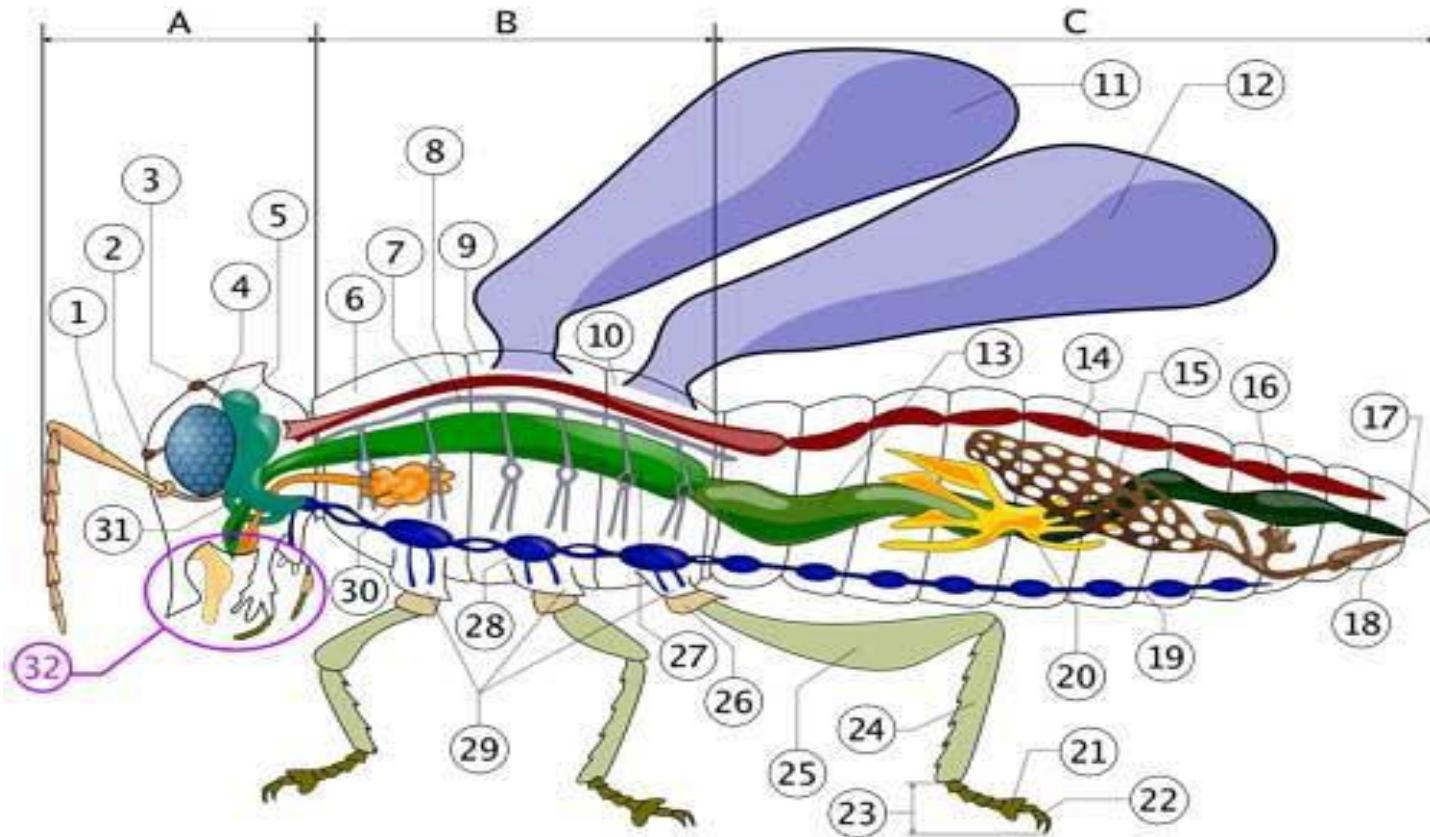


Figura 1 – Imagem esquemática de um insecto: A- Cabeça, B- Tórax, C- Abdómen

# Introdução

- ***Musca domestica*** é um dos Insectos mais comuns e com maior dispersão no mundo
- É responsável por
  - Transmitir alguns agentes causadores de patologias, como a *Salmonella*, o Antrax e o Polio
  - Milhares de mortes em crianças nos países em desenvolvimento, por Cólera e Baceira
- Vantagens
  - Informações sobre o tempo decorrido desde a morte de uma pessoa
  - Clínica
  - Pesca Rudimentar



Figura 2 – *Musca domestica*

# Introdução

- Os *Aphis spp.* não provocam danos em plantas individualmente, mas em pragas podem provocar prejuízos graves
- Encontram-se nas folhas ou caules
- Têm forma de pêra com dimensões muito pequenas, podendo apresentar inúmeras cores, sendo verde, preto, branco ou cinzento as mais comuns
- Podem ser identificados por um Estilete utilizado para se alimentarem da seiva



Figura 3 – *Aphis spp*



Figura 4 – Colônia de *Aphis spp*

# Introdução

## ■ Segundo bibliografia consultada

- Fixação em Líquido de Bouin ou Bouin Holland por 24h
- Desidratação em soluções de Etanol com concentração crescente (70, 96 e 100%)
- Banhos rápidos de Xilol
- Impregnação em Parafina
- Cortes com 5 $\mu$ m
- Remoção da parafina da lâmina passando por Xilol e banhos de Etanol em concentrações decrescentes
- Coloração com Heidenhain's Blue
- Montagem com Entellan

# Objectivos

## ■ Gerais

- Obter lâminas histológicas de Insectos

## ■ Específicos

- Determinar qual o fixador mais adequado, centrando as opções no Formol Tamponado a 10% (FT), Líquido de Bouin (LB) e Bouin Holland (BH)
- Verificar se o Processamento Histológico de rotina se aplica ao estudo de Insectos

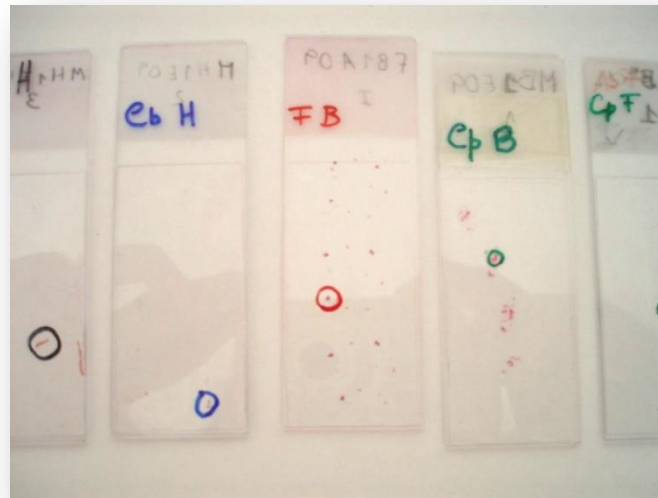


Figura 5 – Lâminas histológicas



# Material e Métodos

## Tipo de estudo

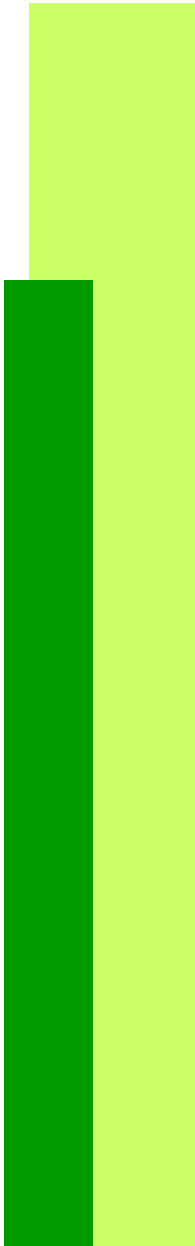
- Estudo do tipo Exploratório

## Local do estudo

- Laboratório de Histopatologia (2.73) da ESTeSL
- Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital SAMS

## Amostragem

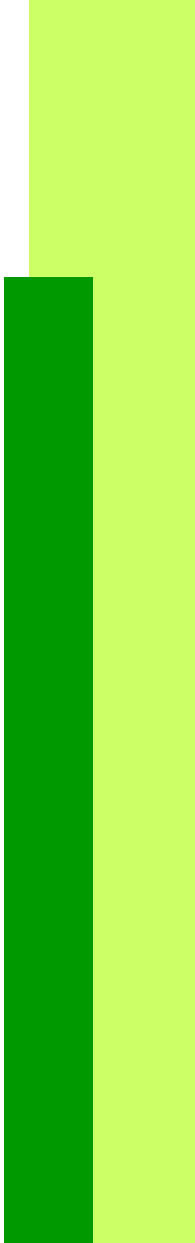
- 20 Moscas – *Musca Domestica* – provenientes da região de Leiria
- 83 Piolhos da Faveira e do Trigo – *Aphis spp.* - cedidos pela EAN



# Material e Métodos

## Plano de Acção

- Preparação das 3 soluções fixadoras
  - 500+500 mL de FT
  - 500+244 mL de LB
  - 500+451 mL de BH
- Recolha dos *espécimens* e respectiva fixação
  - 48h para o FT, e 24h para o LB e BH
- Permanência em Álcool a 70%
  - Até que todos estivessem em condições de seguir o mesmo processamento



# Material e Métodos

## Plano de Acção

- Entradas
  - Algumas moscas foram seccionadas
  - Foram colocados vários piolhos por envelope de modo a não se perderem no processamento
  - 47 cassetes



Figura 6 – Fragmentação das moscas



Figura 7 – Colocação dos piolhos no envelope

# Material e Métodos

## Plano de Acção

- Processamento
  - Etanol/Xilol/Parafina
- Inclusão em parafina
  - Várias posições
  - 48 blocos



Figura 8 – Inclusão

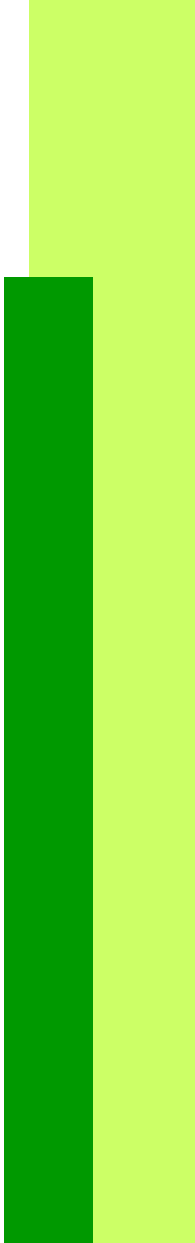


Figura 9 – Blocos

# Material e Métodos

## Plano de Acção

- Corte em Micrótopo Híbrido e de Corrediça
  - Espessura adaptada – 3 a 5  $\mu\text{m}$
- Coloração
  - Hematoxilina-Eosina (H&E)
- Montagem com *Entellan*
- *Screening*
  - Marcação das áreas a observar pelo avaliador – 16 lâminas



# Material e Métodos

Parâmetro	Critério	Valor	FP
Qualidade da Coloração	Subcoloração ou sobrecoloração que impossibilita a distinção das estruturas celulares	0	2,5
	Coloração moderada que permite a distinção das estruturas celulares	1	
	Coloração óptima que permite a distinção das estruturas celulares	2	
Morfologia Geral	Estruturas distorcidas que comprometem a observação	0	3,5
	Estruturas distorcidas que não comprometem a observação	1	
	Estruturas íntegras	2	
Detalhe Celular	Limites celulares irregulares e mal definidos	0	2
	Limites celulares com alguma irregularidade e/ou pouca definição	1	
	Limites celulares regulares e bem definidos	2	
Detalhe Nuclear	Observação comprometida	0	2
	Observação dificultada por perda da definição e/ou detalhe	1	
	Observação completa	2	

Quadro 1 – Parâmetros avaliados

# Material e Métodos

$$IQ = \sum (Valor \times FP)$$

Intervalo	Classificação
[0; 10[	Não satisfaz
[10; 13,5[	Satisfaz
[13,5; 16,5[	Boa
[16,5; 20[	Muito Boa
20	Excelente

Quadro 2 – Índice de Qualidade dos Fixadores

# Material e Métodos

## Variáveis em estudo

- Independentes
  - Fixadores utilizados – FT, LB e BH
- Dependentes
  - Índice de qualidade de fixação
- Estranhas
  - Inexperiência dos investigadores
  - Subjectividade do avaliador na observação das lâminas
  - Falta de literatura sobre o tema



Figura 10 – Fixação das moscas



Figura 11 – Fixação dos piolhos



# Resultados e Conclusão

Anatomia Parâmetros	Abdómen			Cabeça			Tórax			Patas			Faveira			Trigo		
	Formol	Bouin	Bouin Holland	Formol	Bouin	Bouin Holland	Formol	Bouin	Bouin Holland	Formol	Bouin	Bouin Holland	Formol	Bouin	Bouin Holland	Formol	Bouin	Bouin Holland
Fixadores																		
Qualidade da Coloração	1	-	2	2	2	2	1	2	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1
Morfologia Geral	1	-	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	2	1	1	2	2
Detalhe Celular	0	-	1	0	0	1	0	1	0	0	1	-	0	1	0	0	1	1
Detalhe Nuclear	0	-	1	0	1	1	0	1	0	1	0	-	0	1	0	1	1	1

Quadro 3 – Resultados da avaliação das lâminas

# Resultados e Conclusão

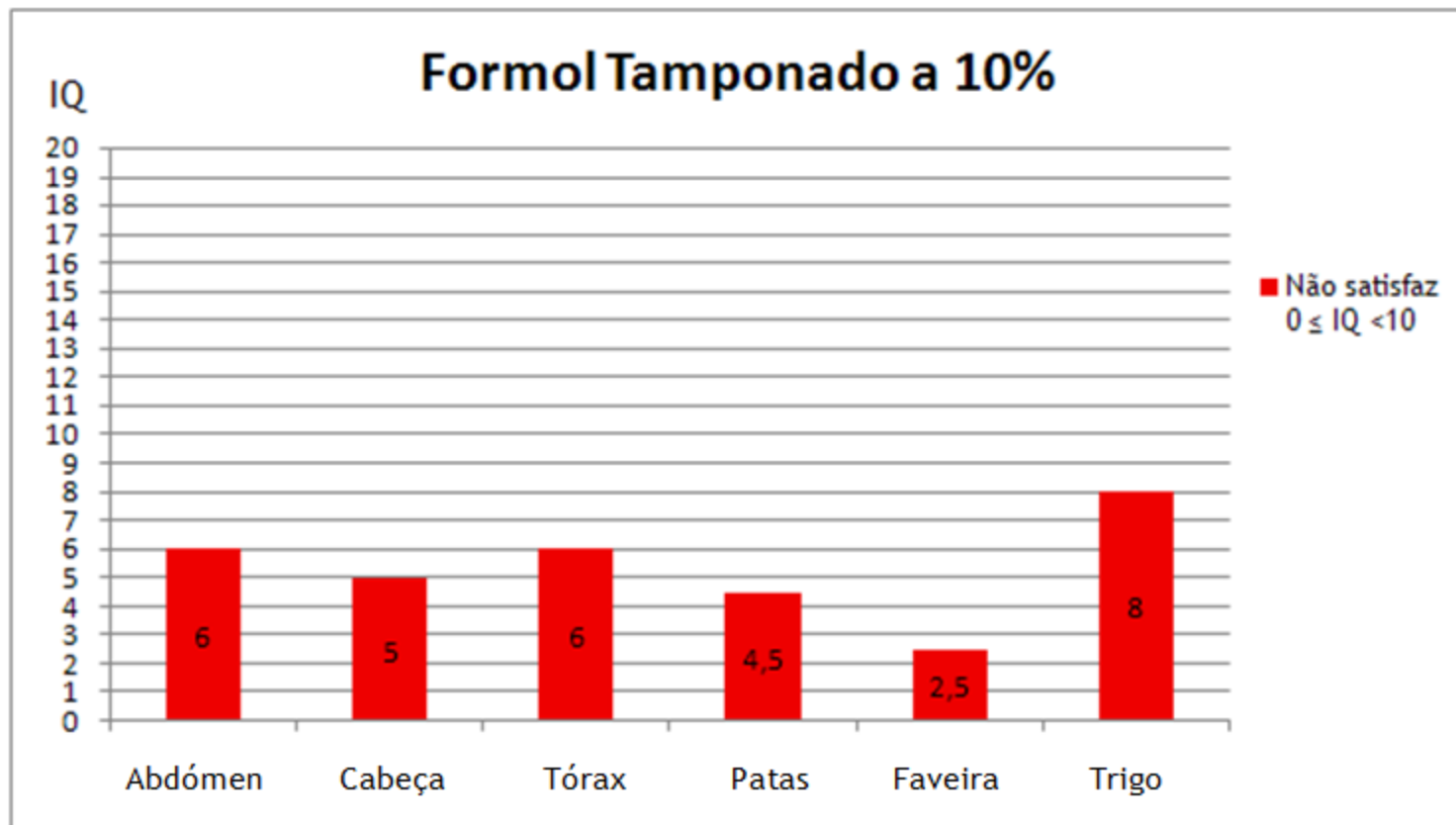


Gráfico 1 – Índices de Qualidade, das diferentes estruturas analisadas, para o Formol Tamponado a 10%

# Resultados e Conclusão

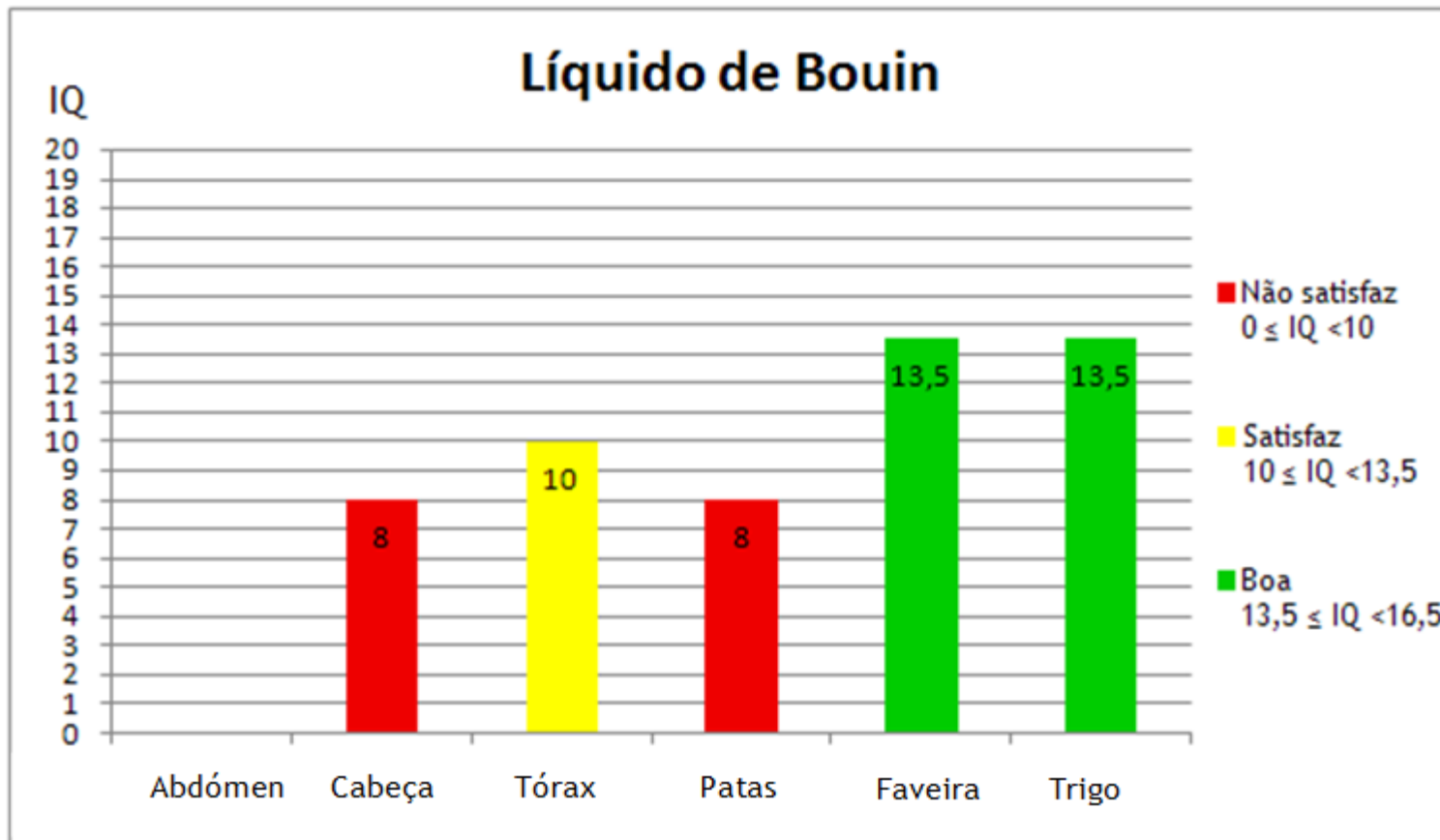


Gráfico 2 – Índices de Qualidade, das diferentes estruturas analisadas, para o Líquido de Bouin

# Resultados e Conclusão

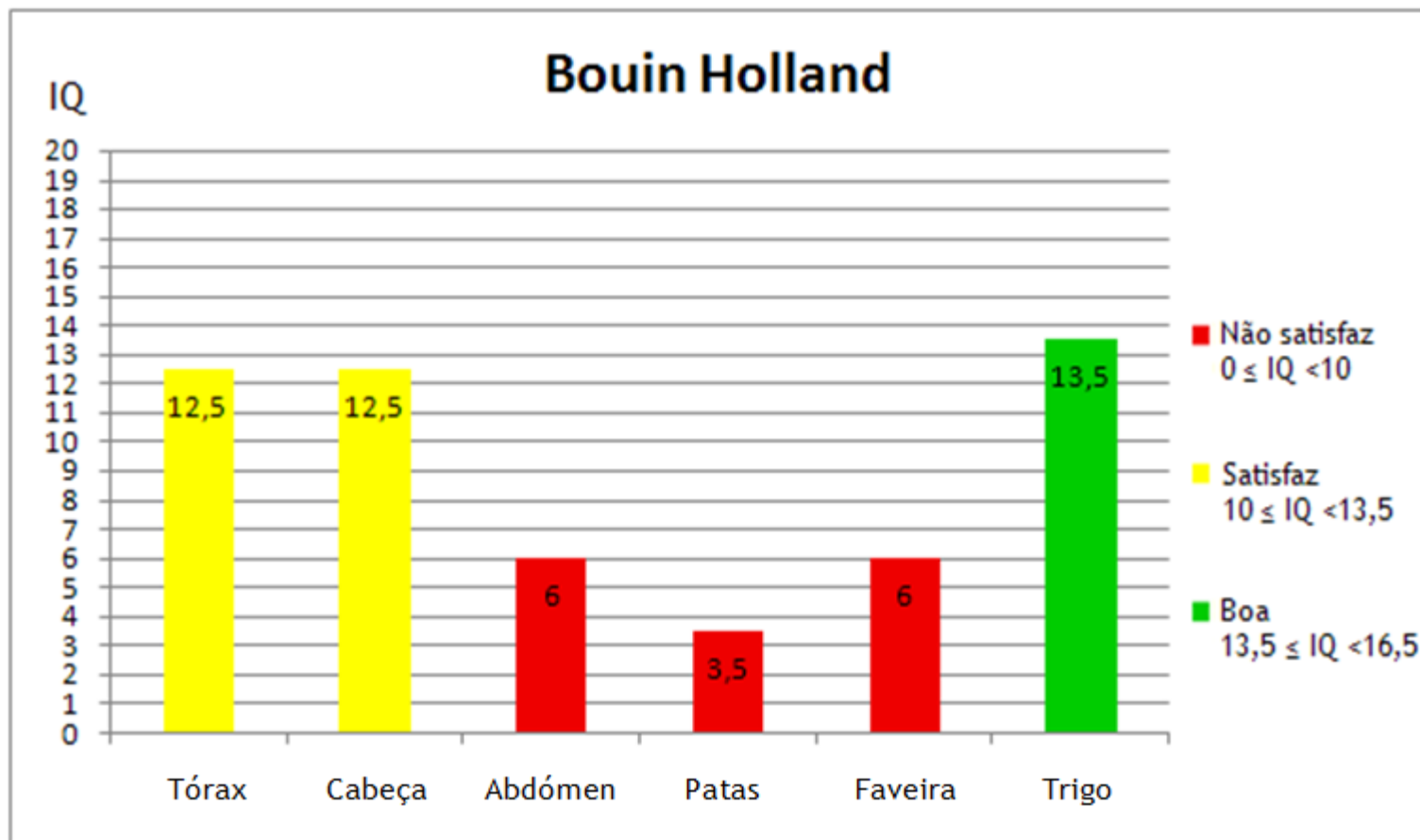
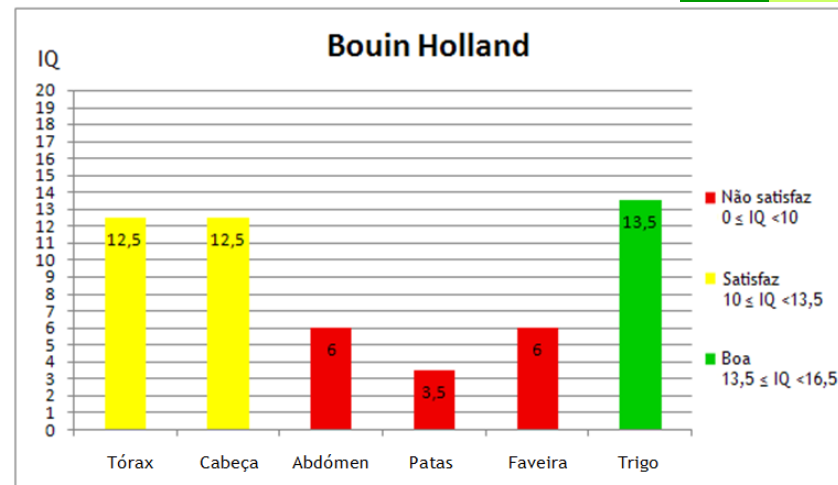
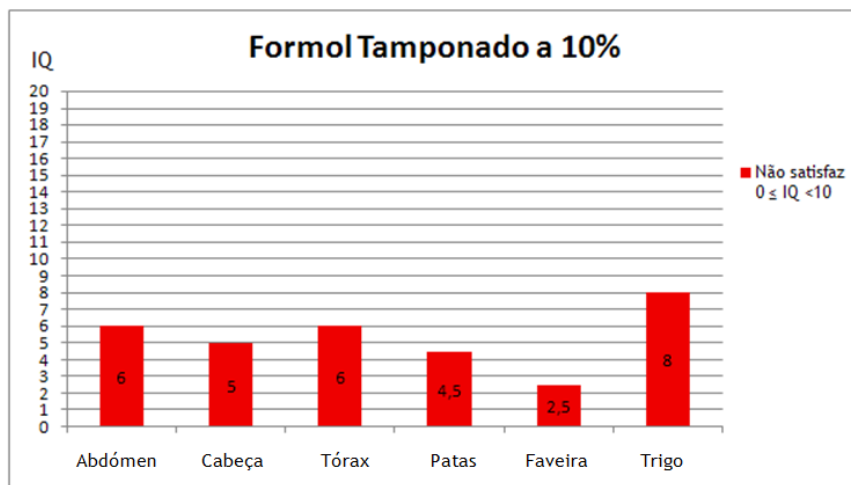
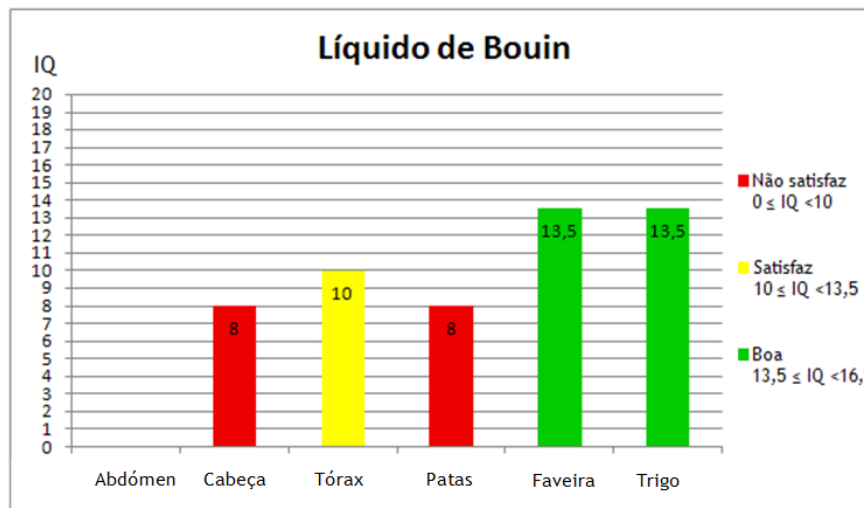


Gráfico 3 – Índices de Qualidade, das diferentes estruturas analisadas, para o Bouin Holland

# Resultados e Conclusão

## Score

- FT – 5.33
- LB – 10.6
- BH – 9



# Resultados e Conclusão

## Abdómen da Mosca

- BH apresenta, no geral, melhores resultados em comparação com o FT
- Quanto ao LB, este foi excluído do estudo, uma vez que não foi possível identificar esta estrutura íntegra em nenhum dos cortes obtidos

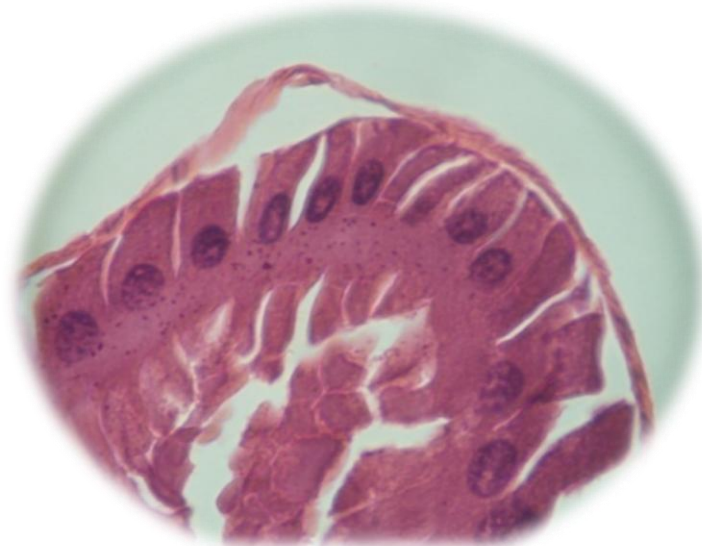


Figura 12 – Abdómen de Mosca fixada em BH, coloração de HE

# Resultados e Conclusão

## Cabeça da Mosca

- Apresenta resultados muito semelhantes, aos descritos para o Abdómen, sendo novamente o BH a ostentar melhores resultados

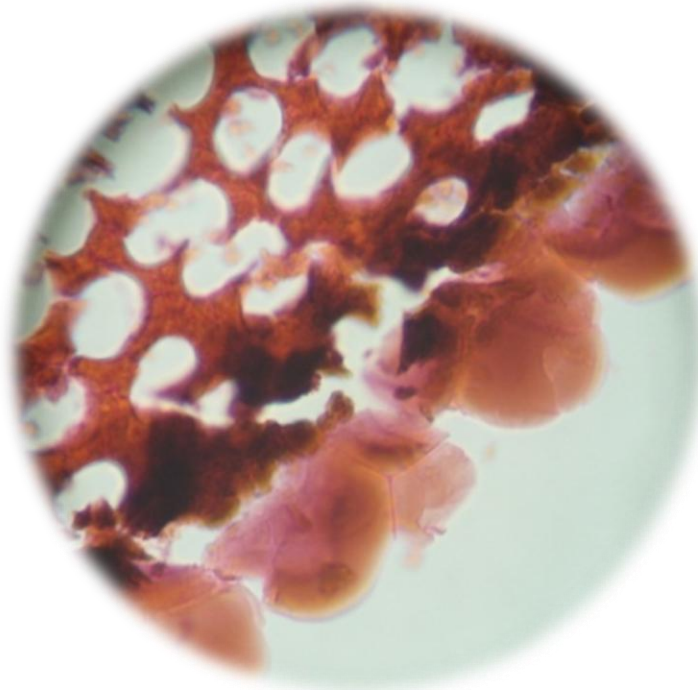


Figura 13 – Cabeça de Mosca fixada em BH, coloração de HE

# Resultados e Conclusão

## Tórax da Mosca e Patas

■ Observação desta estrutura do Tórax da Mosca apresentou melhores resultados para o LB, tal como as Patas do mesmo Insecto

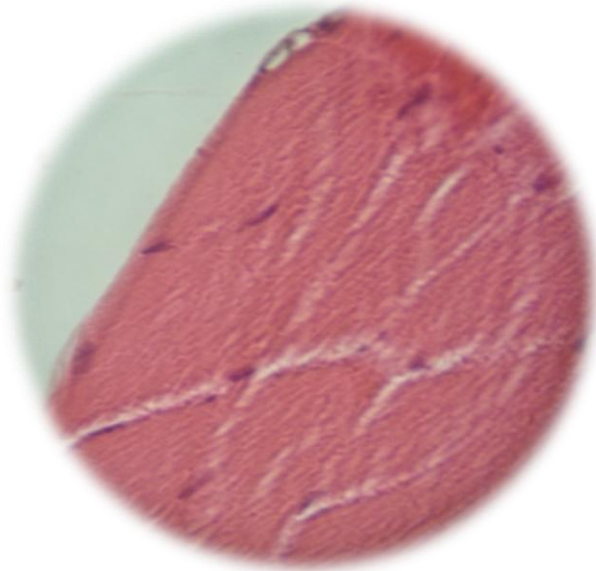


Figura 14 – Tórax de Mosca fixada em LB, coloração de HE

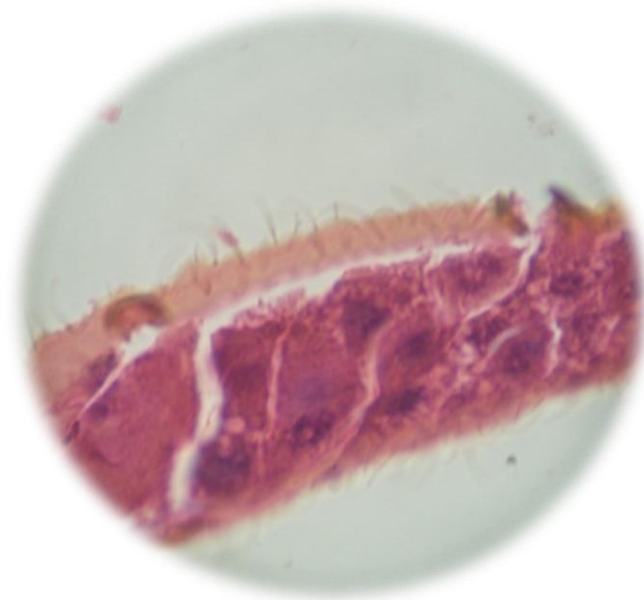


Figura 15 – Pata de Mosca fixada em LB, coloração de HE



# Resultados e Conclusão

## Piolhos do Trigo e da Faveira

■ Pode-se observar que, para os primeiros, os resultados favorecem o LB, sendo que para os segundos os resultados são semelhantes quer para o LB, quer para o BH

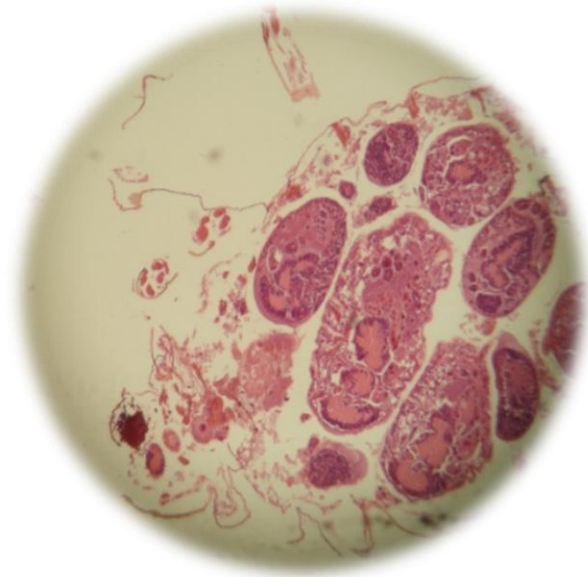


Figura 16 – Piolho da Faveira fixado em LB, coloração de HE

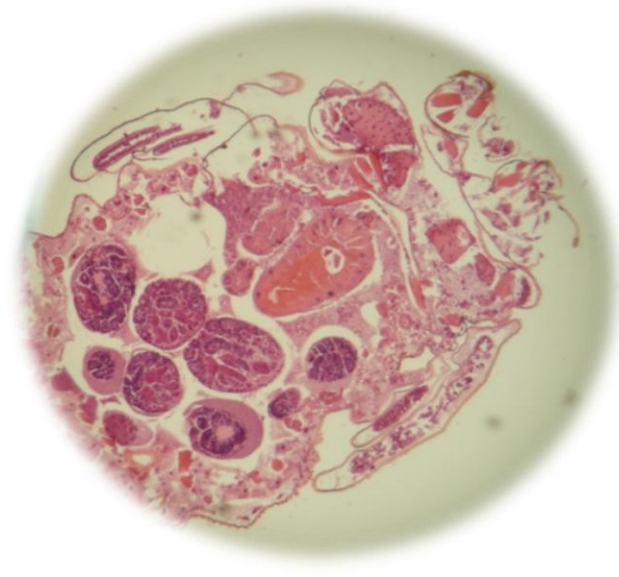


Figura 17 – Piolho do Trigo fixada em LB, coloração de HE

# Resultados e Conclusão

A imagem que se segue têm o intuito de elucidar acerca da má qualidade das amostras fixadas em FT

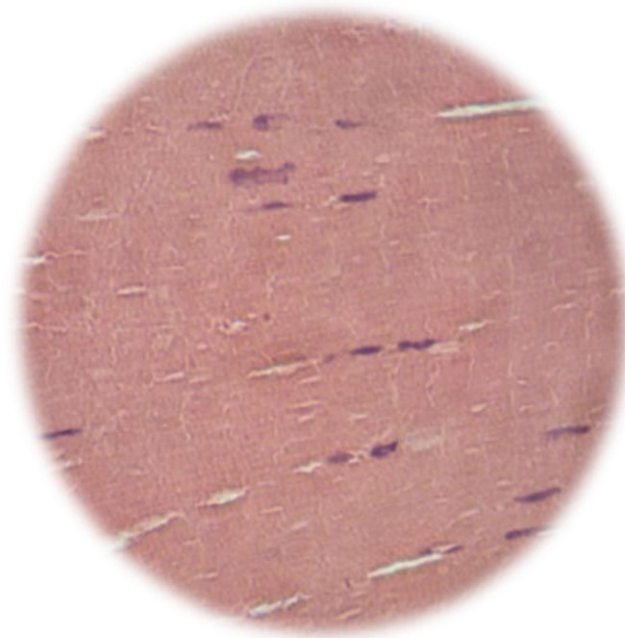


Figura 18 – Mosca fixada em Formol, coloração de HE

# Resultados e Conclusão

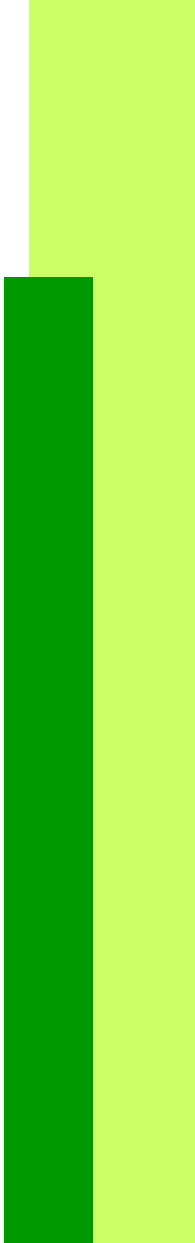
- O Formol Tamponado a 10% não é aconselhado para a Fixação de insectos, uma vez que é aquele que apresenta resultados com menor qualidade para todos os parâmetros avaliados
- A melhor opção é o Líquido de Bouin ou o Bouin Holland
  - Devido ao reduzido número de lâminas avaliadas, não é possível generalizar os resultados nem afirmar qual o Fixador mais apropriado
- Pode aplicar-se a técnica Histológica de rotina a insectos obtendo bons resultados, apesar de não ter permitido saber se será, de facto, a melhor a opção

# Limitações

- Ausência de literatura disponível para determinar se o processamento de rotina e a coloração de HE são os mais adequados para Insectos
- Durante o processamento algumas Patas conseguiram passar pelos orifícios das cassetes
- Características intrínsecas aos Insectos que podem ter sido responsáveis pela dificuldade no corte, das quais resultaram estruturas fragmentadas que podem não estar directamente relacionadas com a qualidade do fixador
- As Asas não foram avaliadas, uma vez que não se conseguiram obtê-las inteiras para todos os fixadores

# Limitações

- Dificuldade em orientar de igual forma os Insectos e obter cortes das mesmas estruturas nas mesmas posições para todos eles
- Escasso conhecimento da Anatomia e Histologia dos insectos tornou difícil seleccionar as melhores lâminas
- Pouco tempo para a conclusão do projecto, nomeadamente pela dificuldade em conjugar o horário escolar dos investigadores com as necessidades do trabalho
- Também a colaboração de mais avaliadores no projecto seria benéfica para que os resultados pudessem ser mais fidedignos (risco da subjectividade)

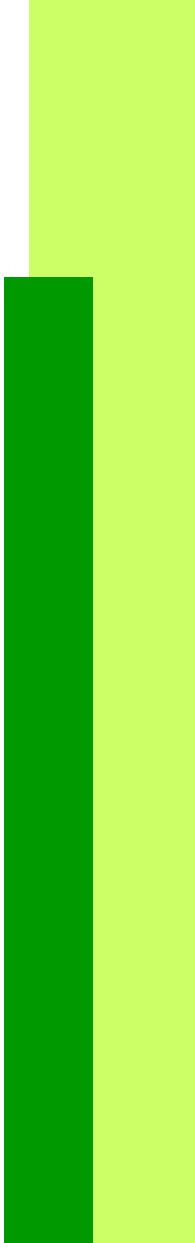


# Estudos Futuros...

- Passar os Insectos por ácido acético antes de os fixar para facilitar a penetração do fixador nos mesmos
- Fixar os Insectos previamente fragmentados ou injectar fixador no seu interior
- Aplicar a Técnica Histológica a outros Insectos
  - Verificar até que ponto se pode universalizar a mesma
- Testar outros fixadores, como por exemplo o Duboscq-Brasil, uma vez que, por ter Álcool na sua composição penetra melhor do que o LB
- Utilizar um processamento diferente daquele utilizado na rotina de forma a verificar qual o mais eficaz

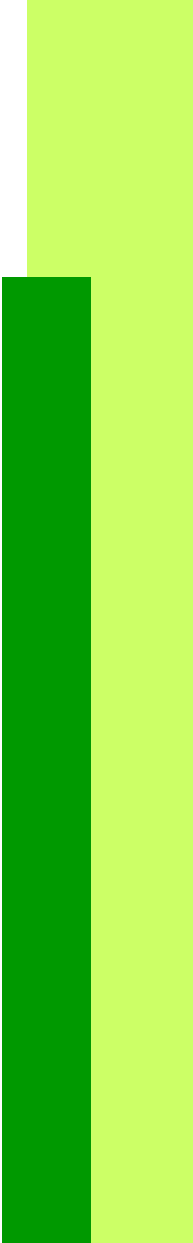
# Estudos Futuros...

- Experimentar a realização de cortes de maior espessura para as estruturas mais frágeis e quebradiças (ex. asas)
- Recorrer a outras colorações, nomeadamente a coloração de Heidenhain's Azan
- Observar mais lâminas e ter mais avaliadores para poder generalizar os resultados
- Fazer pequenas variações aos procedimentos utilizados com o objectivo de os otimizar



# Agradecimentos

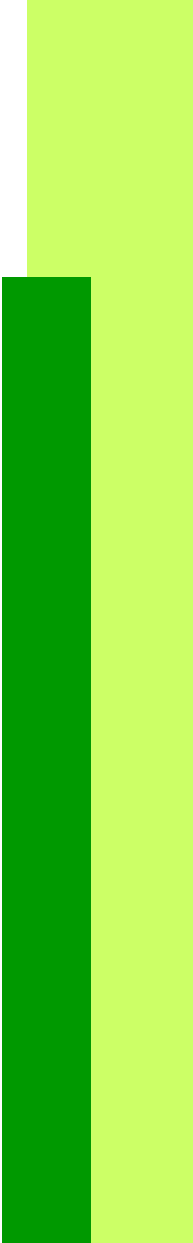
- Doutor José Carlos Franco
- Doutora Célia Mateus
- Engenheira Arminda Cecílio
- Equipa do serviço de Anatomia Patológica do Hospital dos SAMS
- Professora Carina Ladeira
- Professor Mário Matos
- Professora Paula Casimiro





**“Para expor o mínimo projecto, os Portugueses  
têm o hábito de se perder em considerações  
inúteis.”**

António de Oliveira Salazar



# Bibliografia

- Azevedo, M. (2004). *Teses, Relatórios e Trabalhos Escolares: Sugestões para a estruturação da escrita* (4.ª ed.). Lisboa: Universidade Católica Editora.
- Bancroft, J., Gamble, M. (2008). *Theory and Practice of Histological Techniques* (5.ª ed.). Londres: Churchill Livingstone.
- Barth, R. (1953). Métodos de trabalho na anatomia e histologia entomológica. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 51, 95-139.
- Borges-Ferro, A. (2008). *Investigação Aplicada em Anatomia Patológica*. Recuperado a 12 de Junho de 2009 do site - Amadeu Borges Ferro – Docente da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa: <http://www.amadeuferro.pt.vu/>
- Carson, F. L. (1996). *Histotechnology: A Self-Instructional Text* (2.ª ed.). Hong Kong: ASCP Press
- Citador (s.d.). *Albert Einstein*. Recuperado a 25 de Abril de 2009 do site: [http://www.citador.pt/citacoes.php?Albert Einstein=Albert Einstein&cit=1&op=7&author=81&firstrec=10](http://www.citador.pt/citacoes.php?Albert+Einstein=Albert+Einstein&cit=1&op=7&author=81&firstrec=10)
- Citador (s.d.). *Citações que contêm a expressão “projecto”*. Recuperado do site a 23 de Abril de 2009 do site: [http://www.citador.pt/citacoes.php?cit=1&op=6&search\\_query=projecto&firstrec=10](http://www.citador.pt/citacoes.php?cit=1&op=6&search_query=projecto&firstrec=10)
- Fortin, M. (2003). *O Processo de Investigação: Da concepção à realização* (3.ª ed.). Loures: Lusociência.

# Bibliografia

- Hadorn, E., Wehner, R. (1987). *Zoologia Geral* (4.ª ed.). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Knaak, N., Fiuza, L. M. (2005). Histopathology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera; Noctuidae) treated with Nucleopolyhedrovirus and *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(2), 196-200. Recuperado a 12 de Junho de 2009 do site: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-83822005000200017&lng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822005000200017&lng=en)
- Ladeira, C. (2008). *Textos de apoio da Disciplina de Tecnologias Laboratoriais em Anatomia Patológica I – Fixação*. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Área Científica de Anatomia Patológica. ISBN: 978-989-8077-15-8
- Llewellyn, B. (2006). *Stains File: Heidenhain's Azan Trichrome for Muscle and Collagen*. Recuperado a 12 de Junho de 2009 do site: [http://stainsfile.info/StainsFile/stain/conektv/tri\\_heidenhain.htm](http://stainsfile.info/StainsFile/stain/conektv/tri_heidenhain.htm)
- McManus, C. (s.d.). *Insect Processing Tips*. Recuperado a 12 de Junho de 2009 do site: <http://www.histosearch.com/histonet/Apr01A/Insectprocessingtips---lo.html>
- Morton Arboretum (s.d.). *Aphids (Aphids spp.)*. Recuperado a 20 de Junho de 2009 do site: <http://www.mortonarb.org/tree-plant-advice/article/759/aphids-aphis-spp.html>
- Muedra, V. (1998). *Atlas Temático: Anatomia animal*. Lisboa: Marina Editores, Lda.
- Sampieri, R. H., Collado, C. F., Lúcio, P. B. (2006). *Metodologia de Pesquisa*. São Paulo: McGraw-Hill.

# Bibliografia

- Santos, A., Lampreia, L., Perdigão, S. (2008). *Contaminação Fúngica em Piscinas e Ginásios: Estudo de incidência fúngica e técnicas histoquímicas específicas*. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica.
- Silvestre, A. R., Matos, J., Venâncio, V. (2007). *Fixação de tecidos: Estudo comparativo entre protocolos de fixação por microondas e fixação convencional por formol*. Texto inédito. Lisboa: Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica.
- Wikipédia (s.d.). *Aphis*. Recuperado a 20 de Junho de 2009 do site: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Aphis>
- Wikipédia (s.d.). *Inseto*. Recuperado a 5 de Junho de 2009 do site: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Inseto>
- Wikipédia (s.d.). *Mosca-doméstica*. Recuperado a 20 de Junho de 2009 do site: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Mosca-dom%C3%A9stica>
- Wildscreen (s.d.). *House fly (Musca domestica)*. Recuperado a 20 de Junho de 2009 do site: <http://www.arkive.org/house-fly/musca-domestica/glossary-and-references.html>