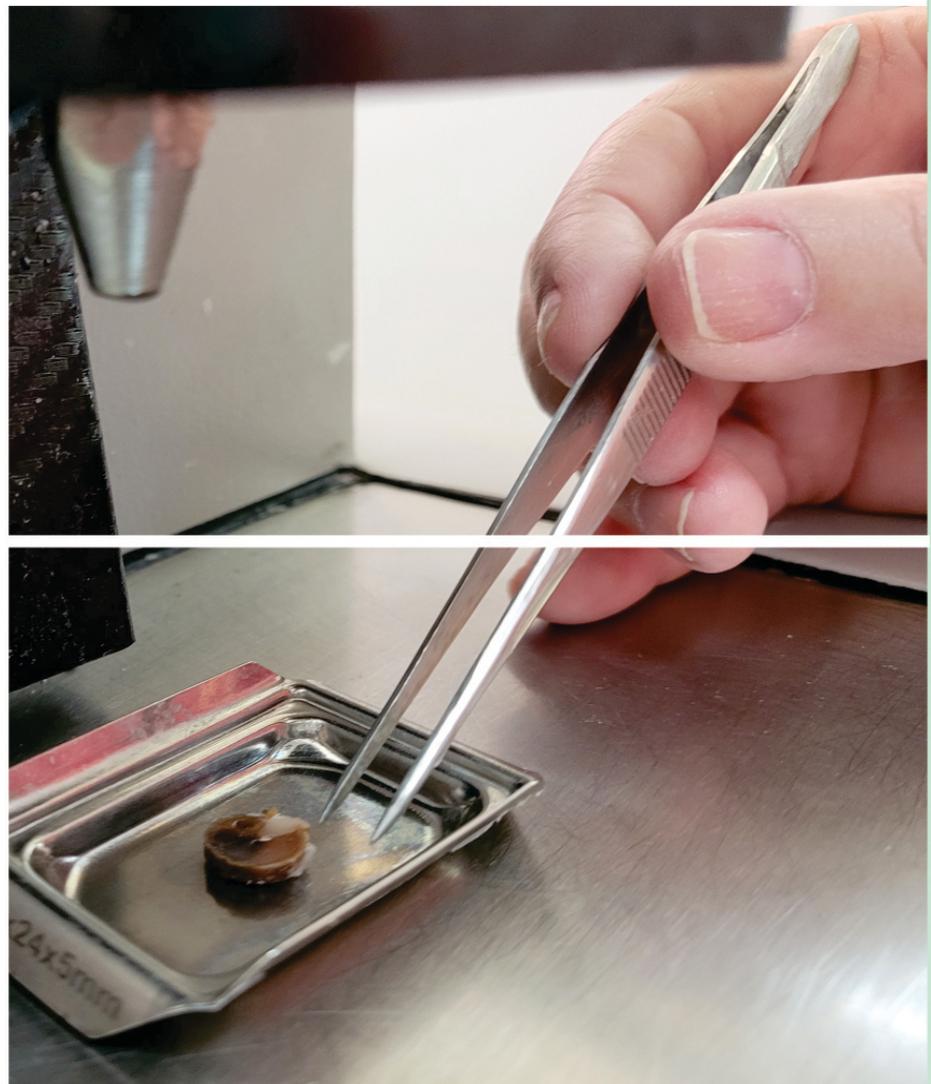


Coleção Conhecendo

Lycia de Brito Gitirana

Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos



Lycia de Brito Gitirana

Autora

Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos

Copyright© 2024 Lycia de Brito Gitirana

Título Original: Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos

Gitirana, Lycia de Brito

Técnica histológica [livro eletrônico]:

Conceitos básicos / Lycia de Brito Gitirana. --

Rio de Janeiro: Ed. da Autora, 2024. --

(Coleção Conhecendo)

PDF

ISBN 978-65-01-02344-1

1. Histologia – Técnica 2. Histologia Patológico –

Técnica. I. Título. II. Série

24–206761

CDD–611.018

Ficha catalográfica elaborada por: Cibele Maria Dias –
Bibliotecária – CRB8/9927

Agradecimento

O livro “Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos” teve como objetivo proporcionar uma base sólida sobre os fundamentos da técnica histológica.

A redação, na língua portuguesa, tornar a leitura mais fácil e acessível aos profissionais interessados pelas técnicas histoquímicas aplicadas à pesquisa e no diagnóstico histopatológico.

Apresentação

O livro “Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos” foi concebido com o objetivo de oferecer uma base sólida sobre os fundamentos da técnica histológica. No livro, são incluídos conceitos fundamentais baseados em estudos científicos e obras clássicas. Nele, o leitor encontrará técnicas histológicas aperfeiçoadas ao longo da trajetória acadêmica.

Nosso objetivo é apresentar, em uma única fonte, os princípios básicos, incluindo métodos elaborados para preparação de amostras a serem analisadas pela microscopia de luz. Além de instruções sobre o preparo de soluções, o leitor também poderá acessar conceito e protocolo básico da técnica de imuno-histoquímica e histoquímica com lectinas.

Os leitores encontrarão métodos que podem ser incorporados ao cenário da técnica histológica utilizada na pesquisa e para o diagnóstico histopatológico. As informações são apresentadas com linguagem acessível e de fácil compreensão, com o objetivo de tornar o tema mais simples e instigante.

Sumário

Introdução	1
Capítulo 1	
Infraestrutura laboratorial	6
Capítulo 2	
Noções básicas para o preparo de soluções	10
Capítulo 3	
Etapas da técnica histológica. Fixação	24
Capítulo 4	
Procedimento para inclusão em parafina	52
Capítulo 5	
Microtomia	81
Capítulo 6	
Coloração	94
Capítulo 7	
Meios de montagem	173
Capítulo 8	
Imuno-histoquímica e histoquímica com lectina	175
Anexo	
Imagens histológicas	188
Literatura	204

Sumário Expandido

Introdução,	1
Infraestrutura laboratorial,	6
Noções básicas para o preparo de soluções,	10
Concentração,	10
Diluição de soluções,	12
Molaridade e normalidade,	13
Soluções fisiológicas,	16
Solução de Ringer-Locke,	16
Solução de Ringe para anfíbios,	17
Solução fisiológica para animais endotérmicos,	17
Soluções tampão,	17
Tampão fosfato,	20
Tampão fosfato salina,	21
Tampão acetato de sódio 0,1M,	21
Tampão citrato 0,1M,	21
Tampão citrato de sódio 0,1M,	22
Tampão Sörensen 0,1M,	22
Tampão Tris-HCl 0,05M,	22
Tampão Tris salino 0,05M,	23
Tampão Tris-EDTA 0,05M,	23
Etapas da técnica histológica,	24
Fixação,	24
Métodos de fixação,	25
Fatores que interferem na fixação,	26

Tipos de fixadores, 27
Classificação dos fixadores, 29
Tipos de fixação, 39
Preparo de alguns fixadores, 41
Solução de formol a 10%, 41
Solução de formol neutro tamponado a 10%, 42
Solução de formol à 10% - acetato de sódio, 42
Solução de formol – brometo de amônio, 42
Solução de formol – álcool etílico - ácido acético, 43
Solução de formol – cálcio, 43
Solução de formol neutro 10% em tampão fosfato, 44
Líquido de Bouin, 45
Líquido de Gendre, 46
Líquido de Helly, 47
Líquido de Zenker, 47
Solução de Carnoy, 48
Solução de formol-cálcio de Baker, 48
Fixador Saint'Marrie, 48
Solução de ALFAC, 49
Fixador para raiz de cebola, 49
Clivagem, 50
Procedimento para inclusão em parafina, 52
Desidratação, 57
Diafanização, 60
Impregnação e emblocamento em parafina, 62
Protocolo para inclusão em parafina, 68

Processamento de material mineralizado, **71**

Desgaste, **72**

Descalcificação, **73**

Substâncias descalcificadoras, **73**

Descalcificação eletrolítica, **77**

Microtomia, **81**

Tipos de micrótomo, **81**

Micrótomo rotatório, **82**

Micrótomo de corrediça, **83**

Micrótomo de congelação, **84**

Criostato, **84**

Ultramicrótomo, **85**

Confecção dos cortes, **85**

Preparo de lâminas com substâncias adesivas, **88**

Procedimento de lavagem das lâminas com detergente, **89**

Substâncias para adesivação de lâminas, **89**

Adesivação com silano, **90**

Adesivação com poli-L-lisina, **90**

Dificuldades na obtenção dos cortes, **91**

Acessórios para realização de corte, **92**

Coloração, **94**

Estrutura geral do corante, **96**

Classificação dos corantes, **97**

Classificação das colorações, **99**

Afinidade tintorial, **101**

Coloração pela Hematoxilina e Eosina, **101**

Hematoxilina: tipos, **104**
Hematoxilina de Harris, **105**
Hematoxilina-Alúmen de Mayer, **106**
Hematoxilina de Delafield, **107**
Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory, **107**
Hematoxilina férrica de Weigert, **108**
Hematoxilina férrica de Regaud, **108**
Eosina, **109**
Solução aquosa de eosina, **109**
Solução alcoólica de eosina, **109**
Solução alcoólica de eosina-floxina, **110**
Organização dos reagentes na coloração, **110**
Métodos gerais de coloração, **111**
Coloração pela Hematoxilina-Eosina, **111**
Tricrômico de Gömöri, **112**
Tricrômico de Mallory, **114**
Tricrômico de Masson, **115**
Métodos especiais de coloração, **117**
Método de Van Gieson, **117**
Coloração pelo picrossírius red, **118**
Coloração seletiva pela Orceína, **119**
Coloração simultânea Orceína e picrossírius red, **119**
Método de Weigert, **120**
Método de hematoxilina férrica (Verhoeff), **122**
Método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS), **121**
Método do Alcian blue (AB) pH 2,5, **125**

- Método do Alcian blue (AB) pH 1,0, **125**
- Método do Alcian blue (AB) pH 2,5 + PAS, **125**
- Coloração do Paraldeído-Fucsina (PAF), **127**
- Métodos de Violeta de cresil (de Vogt), **129**
- Método de Kluver – Barrera, **129**
- Coloração com efeito metacromático, **131**
 - Coloração pelo azul de toluidina, **131**
- Métodos para demonstrar lipídeos, **132**
 - Método de coloração pelo oil red O, **132**
 - Método de coloração pelo Azul do Nilo, **134**
 - Método do tetróxido de ósmio, **134**
- Impregnações metálicas, **135**
 - Método de reticulina de Gömöri, **136**
 - Método de Bodian, **138**
 - Método de Grimelius, **139**
 - Método de Nonidez, **140**
 - Método de Gless, **141**
- Colorações para elementos figurados do sangue, **142**
 - Coloração de May-Grünwald, **143**
 - Coloração de Giemsa, **144**
 - Coloração May-Grünwald Giemsa, **145**
 - Coloração de May-Grünwald Giemsa (soluções comerciais), **146**
 - Coloração de Wright, **147**
 - Método de Giemsa para cortes histológicos, **148**
 - Método de May-Grünwald Giemsa para cortes histológicos, **149**
 - Método do vermelho do congo para eosinófilos, **151**

Detecção de elementos orgânicos e inorgânicos, **152**

- Método de violeta de metila para amiloide, **152**
- Método de vermelho do congo para amiloide, **153**
- Método de vermelho do congo para amiloide à luz polarizada, **154**
- Método de Schmorl para lipofuscina, **155**
- Método de impregnação de pigmento melânico, **156**
- Método de Desmelanização, **157**
- Método para remoção do pigmento formólico, **158**
- Método de azul de Turnbull para hemossiderina, **159**
- Método de azul da Prússia para hemossiderina, **160**
- Método de Perls para hemossiderina, **161**
- Remoção de precipitado de mercúrio, **161**
- Método de von Kossa para depósitos de cálcio, **162**

Detecção de micro-organismos, **163**

- Método de Grocott para fungos, **163**
- Método de Ziehl-Neelsen para bacilos, **165**

Método para citologia cervical, **165**

- Método de Coloração de Papanicolaou, **166**

Coloração de fundo, **168**

- Solução aquosa de eosina 1%, **168**
- Solução alcoólica de eosina 1%, **169**
- Nuclear fast red (vermelho rápido nuclear) 0,2%, **170**
- Safranina O a 1%, **170**
- Cristal violeta a 0,1%, **170**
- Verde luz a 1%, **170**

Meios de montagem, **171**

Meios de montagem naturais, **172**
 Bálsamo do Canadá, **172**
 Goma de Damar, **173**
Meios de montagem acrílicos, **173**
 Xarope, **173**
Meios de montagem aquosos, **173**
 Gelatina-glicerina, **173**
 Glicerina-de Jelly. **174**
 Polivinilpirrolidona, **174**
Imuno-histoquímica, **175**
Protocolo para cortes em parafina (método indireto), **181**
Histoquímica com lectinas, **184**
Protocolo para marcação com lectina em cortes em parafina, **186**
Imagens histológicas, **188**
Literatura, **204**

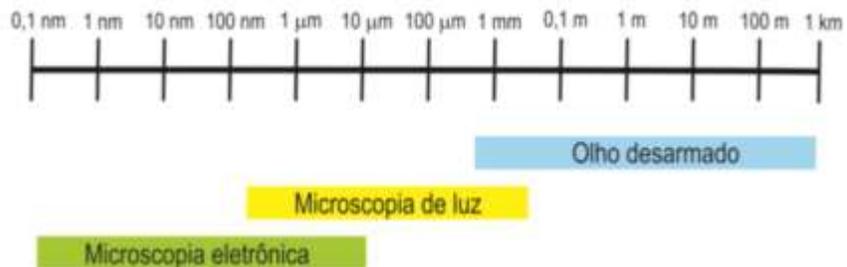
Introdução

A Histologia, uma especialidade das Ciências Biológicas e Biomédicas, estuda a organização e a inter-relação entre os componentes teciduais de um organismo, com a finalidade de compreender as funções desempenhadas pelos órgãos/tecidos.

Na análise dos tecidos é importante considerarmos as dimensões dos seus elementos constituintes.

Ao olho desarmado (desprovido de acessório, como os óculos), é possível a visualização de estruturas com dimensões maiores que 1 mm de diâmetro (Fig. 1).

Fig. 1: Escala mostrando as diversas unidades de medição, indicando as dimensões de estruturas que podem ser visualizadas ao olho desarmado e àquelas que necessitam de equipamentos especiais, como o microscópio de luz e os microscópios eletrônicos.



Como as dimensões dos constituintes teciduais são inferiores ao poder de resolução do olho humano, o desenvolvimento de equipamentos que permitiram a visualização de pequenas estruturas foi fundamental. É importante também considerar o objetivo da investigação, uma vez que diferentes objetivos remandam procedimentos distintos. Por exemplo, o processo de preparação da amostra para

análise pela microscopia de luz segue uma sequência de reagentes distinta daquela utilizada para a análise ao microscópio eletrônico.

Além da escolha dos equipamentos destinados à visualização dos constituintes teciduais, como células e elementos da matriz extracelular, há a necessidade de estabelecer métodos de análise e técnicas específicas a serem empregadas. A análise da estrutura morfológica dos diversos tecidos/órgãos não é simples e, de acordo com a abordagem do estudo, as amostras precisam ser submetidas a tratamentos com substâncias específicas.

Na análise histológica ao microscópio de luz, o material proveniente de necropsia ou de pequenas biópsias é submetido a tratamentos que podem variar de acordo com o tipo de tecido ou órgão, uma vez que a preservação tecidual é fundamental para revelar as características normais quanto as lesões patológicas. Nesse contexto, após a remoção da amostra (órgão/biópsia) do organismo, esse material passa por uma sequência de tratamentos com substâncias com o objetivo primordial de preservar a estrutura tecidual. Esta sequência de tratamentos, usualmente denominada “etapa”, inclui procedimentos que se iniciam com a fixação da amostra até a sua inclusão em resina, incluindo também a microtomia e a coloração (ver adiante). A análise ao microscópio de luz também é relevante; portanto, a determinação do tipo de coloração a ser utilizada para análise do material é fundamental.

Ressalte-se que, ao iniciar o manuseio do material com vistas à análise microscópica, também é importante considerar o aspecto macroscópico do espécime e registrá-lo em livro próprio. A coloração e a textura da maioria dos órgãos podem fornecer importantes informações que auxiliam no diagnóstico histopatológico, o qual auxiliará na análise histológica.

Nesse contexto, o manuseio de material deve ser realizado com cuidado para evitar distorções e preservar as características anatô-

micas originais. A manipulação inadequada durante qualquer etapa da técnica histológica pode resultar em consequências graves, como a ruptura tecidual e a formação de artefatos, conduzindo à uma interpretação equivocada da estrutura tecidual.

Este livro pretende apresentar as etapas a serem adotadas no preparo convencional de material biológico destinado à inclusão em parafina, visando à análise pela microscopia de luz. Para tanto, o material é submetido a uma sequência de procedimentos, abrangendo a coleta do material, fixação, impregnação e emblocamento em parafina, microtomia e a coloração.

Frise-se que, antes do início de qualquer procedimento, é fundamental que o técnico e/ou pesquisador assegurem-se de que a proposta da análise está em conformidade com a legislação vigente. Além disso, é importante verificar os materiais de apoio usados na dissecação, assim como as características das substâncias, como qualidade, validade, entre outras.

Outro ponto que não deve ser subestimado é o método de análise, ou seja, se a avaliação tecidual será realizada usando métodos convencionais ou especiais de coloração, ou ainda, se o material será submetido à análise pela imuno-histoquímica ou qualquer outro método de análise.

Também é importante considerar a disponibilidade de materiais e equipamentos de proteção, como jalecos, luvas, óculos de proteção, entre outros estão disponíveis no ambiente de trabalho. É essencial que o laboratório esteja equipado com capela de exaustão de gases em condições operacionais adequadas, uma vez que a manipulação dos materiais e reagentes deve ser realizada com segurança para o operador. Além dessas considerações, independentemente da técnica ou o método usado, o laboratório deve ser mantido sempre limpo e em conformidade com as normas de biossegurança e as boas práticas laboratoriais.

Ocasionalmente, em experimentos envolvendo animais, surgem situações específicas em que o uso de substâncias anestésicas deve ser evitado para não interferir ou alterar a estrutura do tecido ou órgão. Nesses casos, a insensibilização de animais sem uso de substâncias químicas é permitida pela legislação vigente. Por exemplo, a descerebração é uma técnica aceitável para insensibilização de animais de pequeno porte. Essa prática tem sua base normativa na Resolução nº 714 de 20 de junho de 2002, a qual foi promulgada pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária, conforme atribuição pelo art. 16, alínea “f” da Lei nº 5.517/86 de 23 de outubro de 1968.

A Lei 11.794/08 também estabeleceu o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) com a finalidade de regulamentar as pesquisas envolvendo vertebrados. Além disso, essa lei determinou a criação do cadastro das instituições de pesquisa e do próprio pesquisador. A lei também estabeleceu que todas as instituições envolvidas com atividades de ensino e/ou pesquisa devem instituir uma Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) interdisciplinar para avaliar se todos os procedimentos do projeto estão em conformidade com as normas vigentes. Em outras palavras, a CEUA analisa os protocolos de experimentação usados tanto na pesquisa e no ensino que envolvam animais.

Em suma, o emprego da técnica histológica deve estar em consonância com a legislação vigente e adequada aos procedimentos aos quais o material será submetido, com a finalidade de analisar a estrutura tecidual de forma ética e legalmente aceitável.

Coleta de Material e a Legislação

Para a realização da prática de fixação é importante considerar o tipo material biológico destinado ao diagnóstico histopatológico. Também é importante o manuseio de animais usados em projetos de pesquisa, sejam esses animais provenientes de coleta ambiental e provenientes de biotérios, onde são submetidos às diferentes condições experimentais. Seja qual for a sua origem, há legislações que normatizam a utilização de animais em aulas práticas ou na pesquisa científica.

A primeira legislação que determinou normas para a vivissecção de animais foi a Lei nº 6.638 de maio de 1979 (artigo 3º).

Em 2008, a Lei 11.794 revogou a lei anterior (Lei 6.638/79) e estabeleceu normas para uso de animais.

O Art. 1º, §1º da Lei 11.794/08 define que a utilização de animais em atividades educacionais fica restrita aos incisos:

I – Estabelecimentos de ensino superior;

II – Estabelecimentos de educação técnica profissional de nível médio da área biomédica.

Capítulo 1

Infraestrutura laboratorial

A instalação de um laboratório destinado ao emprego da técnica histológica demanda cuidadoso planejamento. É necessário refletir sobre a organização da área física para a implementação do laboratório, incluindo os espaços específicos para a realização das diversas etapas da técnica histológica.

Além da destinação do espaço físico, a infraestrutura do laboratório deve atender às normas técnicas estabelecidas. É importante considerar a criação de um espaço específico, como um almoxarifado, tanto para armazenamento de substâncias/reagentes quanto para acondicionamento dos resíduos gerados.

É importante destacar que a gestão dos resíduos deve ser realizada por empresas especializadas, garantindo que o manuseio do material seja realizado de modo a não causar danos ambientais, nem riscos para a saúde humana.

Como a técnica histológica envolve uma série de etapas distintas, recomenda-se que o laboratório esteja organizado em “setores” em consonância com as etapas da técnica histológica (ver adiante). Portanto, o planejamento da unidade laboratorial é fundamental e planejado desde o início da escolha do espaço para instalação dos equipamentos.

O planejamento também abrange a verificação da **iluminação** do ambiente, as condições de **ventilação** e a **renovação do ar**, bem como a verificação da **segurança** do ambiente para os usuários e sua adequação para a realização de atividades em **condições higiênicas**.

Em suma, o planejamento do laboratório deve abranger não apenas a adequação da sua área para instalação de equipamentos e mobiliário, mas também:

- Área física disponível;
- Possibilidade de organização das áreas em função dos setores/etapas da técnica histológica;
- Condições ambientais que permitam a realização das atividades laborativas do técnico/pesquisador, tais como ventilação, iluminação, circulação dos profissionais adequadamente, dentre outras.
- Almoxarifado (local para acondicionamento de substâncias).
- Local para acondicionamento de material para posterior descarte.

Devido à complexidade envolvida na instalação de laboratórios, independentemente da sua especialidade, recomenda-se fortemente que o planejamento da área seja conduzido por uma equipe multidisciplinar.

O planejamento deve iniciar com consulta a profissionais especializados em instalação ou readequação da rede hidráulica e elétrica. Ressaltamos a importância da estrutura elétrica, pois é essencial que sua capacidade deve ser suficiente para alocar equipamentos laboratoriais e ar-condicionado, inclusive considerando a possibilidade de aquisição de novos equipamentos.

Sugere-se que essa equipe inclua um especialista em histotecnologia, que possua conhecimento abrangente de todas as etapas, desde o recebimento da amostra biológica até a emissão do diagnóstico histológico. Além disso, é importante ter o apoio de uma assessoria de um especialista em segurança laboratorial com conhecimento dos procedimentos básicos em situações de emergência.

O laboratório deve ser equipado com capela de exaustão de gases¹ para a manipulação de material biológico e de substâncias por ser uma instalação básica de proteção. O mobiliário também inclui geladeiras, estufas², balança, destilador de água, além de estantes para acondicionamento de vidraria e/ou reagentes³.

Caso o laboratório possua local destinado para armazenamento de substâncias/reagentes (almoxarifado), esse local deve ser equipado com um sistema de exaustão de gases que permaneça em funcionamento constante, evitando-se o acúmulo de gases tóxicos no laboratório.

Dentre os equipamentos básicos, sugere-se que o laboratório possua, pelo menos, duas estufas: uma estufa para secagem de material, como vidraria e outros utensílios de uso cotidiano; e outra estufa exclusiva para realização dos procedimentos para preparação material a ser impregnado e incluído em parafina (caso não haja disponibilidade de equipamento de processamento de material). Considerando que algumas reações histoquímicas exigem controle de temperatura, é interessante que o laboratório possua uma terceira estufa para esta finalidade específica.

As geladeiras⁴ também são equipamentos fundamentais em um laboratório, uma vez que a grande maioria das soluções e substâncias deve ser acondicionadas em temperatura abaixo de 5°C. Geladeiras com congelador e/ou freezer são importantes para reagentes que devem ser condicionados congelados.

¹ Evitar capelas de exaustão de gases construídas a partir de material plástico.

² Destinar uma estufa para secagem de vidraria e outra para realização de técnicas histoquímicas.

³ Os reagentes mais usados no cotidiano podem ser acondicionados em estantes. Todavia, recomenda-se acondicioná-los em armários especiais de metais (ou construídos) com saída de exaustão de gases.

⁴ As geladeiras podem ser de modelos de uso doméstico.

Além dos equipamentos essenciais, é importante o registro de material em livro próprio. Esse registro deve incluir registrado a entrada do material biológico, sua procedência, o tipo (material humano ou animal) e quaisquer outras informações necessárias. Esses registros são de grande importância, principalmente durante a inspeção por agências fiscalizadoras.

No caso do material de origem humana e destinado ao diagnóstico histopatológico, é recomendado registrar do número do prontuário do paciente, seguindo as normas éticas aplicáveis. Caso o material seja proveniente de pesquisa científica, é fundamental registrar o número da aprovação do projeto de pesquisa fornecido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)⁵ com seres humanos. No caso de pesquisa experimental com animais, o registro deve ser realizado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição. O livro de registro também pode conter informações sobre os aspectos macroscópicos do material, auxiliando o diagnóstico histológico.

Ressalte-se que o número de registro atribuído deve acompanhar o material ao longo do procedimento, até a confecção do preparado histológico permanente (lâmina contendo material já corado).

⁵ O procedimento para se registrar um projeto no Comitê de Ética em Pesquisa pode ser obtido em <https://conselho.saude.gov.br/>. Usualmente, cada Instituição pública possui o seu comitê.

Capítulo 2

Noções básicas para o preparo de soluções

A preparação das soluções baseia-se em alguns conceitos fundamentais que serão apresentados a seguir.

Concentração

As soluções são constituídas por uma substância (**soluto**), dissolvida em um **solvente**, que é a substância que dissolve o soluto.

A concentração de uma substância em solução é a expressão da massa (m) de uma determinada substância (soluto) dissolvida em determinado volume (V) de um solvente, geralmente expressa em porcentagem (%).

$$C = \frac{m}{V}$$

C = concentração;

m = massa da substância (soluto);

V = volume do solvente

Há de se considerar que o cálculo da concentração de uma solução varia conforme a substância, ou seja, se a substância é líquida ou sólida.

Cálculo da porcentagem a partir de uma substância sólida

Para calcular a concentração, a substância sólida é dissolvida na quantidade de líquido (solvente) desejado.

Exemplo: solução fisiológica (cloreto de sódio a 0,9%).

Para preparar 100 mL da solução: pesar 0,9g de cloreto de sódio (NaCl) e dissolver em 100 mL de água destilada.

Cloreto de sódio	0,9 g
Água destilada	100 mL

Caso se deseje preparar 1 litro (1L = 1000 mL) da solução, deve-se aumentar proporcionalmente tanto a substância quanto o solvente para garantir que a concentração permaneça a mesma. Assim, para 1 litro:

Cloreto de sódio	9 g
Água destilada	1.000 mL

Cálculo da porcentagem a partir de uma substância líquida

Para preparar uma substância líquida, o cálculo é essencialmente o mesmo; entretanto, ao volume da substância (soluto) adiciona-se o solvente até o volume final desejado.

Exemplo: solução de ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) a 1%.

Para preparar 100 mL da solução, colocar 1 mL de ácido acético glacial⁶ (pipetar com o auxílio de um pipetador; **nunca** pipetar diretamente com a boca!) em uma proveta graduada e elevar ao volume de 100 mL com água destilada.

Ácido acético glacial	1 mL
Água destilada	99 mL

No preparo de uma solução utilizando substâncias líquidas, a quantidade da substância (soluto) é completada com o solvente até o volume final da solução.

⁶ Ácido acético glacial é a forma pura da substância, sem água (anidro); ácido acético é a solução aquosa do ácido, ou seja, que contém água.

Diluição de soluções

Eventualmente, há a necessidade de se preparar uma solução a partir de uma solução preexistente. Nesse caso, é necessário adicionar o solvente, no qual a substância (soluto) está dissolvida, mantendo a quantidade do soluto inalterada.

O cálculo para preparar a nova solução a partir de uma preexistente é feito com o auxílio da seguinte fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2, \text{ onde:}$$

C_1 = concentração inicial da solução a ser diluída,

V_1 = volume inicial da solução a ser diluída,

C_2 = concentração final desejada,

V_2 = volume final retirado da solução inicial para ser diluído

Nesse cálculo, como a concentração dessas soluções é expressa em porcentagem, deve-se ficar atento para o volume desejado, ou seja, o valor obtido em V_2 deve ser elevado ao volume desejado (volume final).

Exemplo: Preparar uma solução aquosa a 2% a partir de 50mL de uma solução aquosa a 3%.

O cálculo deve ser baseado na fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, onde:

C_1 = é a concentração desejada (2%);

V_1 = é o que se deseja saber;

C_2 = é a concentração da solução inicial (3%);

V_2 = é o volume que deve ser retirado da solução estoque.

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$2 \times V_1 = 3 \times 50 \rightarrow V_1 = \frac{3 \times 50}{2} = 75\text{mL}$$

Segundo os cálculos baseados na fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, aos 50mL da solução a 3% adicionar 75 mL água destilada para que a solução esteja numa concentração de 2%.

Exemplo: Deseja-se preparar 50 mL de uma solução aquosa a 2%, a partir de uma solução estoque a 5%. Como proceder?

O cálculo deve ser baseado na fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, onde:

C_1 = é a concentração desejada (2%);

V_1 = é o volume da solução com a concentração desejada;

C_2 = é a concentração da solução estoque (5%);

V_2 = é o volume que deve ser retirado da solução estoque (5%).

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$2 \times 50 = 5 \times V_2 \rightarrow \frac{2 \times 50}{5} = V_2 \rightarrow V_2 = 20\text{mL}$$

Segundo os cálculos baseados na fórmula $C_1V_1 = C_2V_2$, aos 20mL da solução a 5% se adiciona água destilada até o volume final de 50 mL. Assim, a solução estará na concentração final de 2%.

Molaridade (M) e Normalidade (N)

As soluções tampões são preparadas a partir de substâncias-base expressas em Molaridade (M) ou Normalidade (N).

A seguir, encontram-se os cálculos da molaridade e normalidade de substâncias sólidas e líquidas. Para realizar o cálculo, é essencial consultar o peso molecular (PM) da substância. Essa informação geralmente está disponível no rótulo de todos os reagentes. Deste modo, ao acondicionar as substâncias no laboratório, é importante preservar as etiquetas dos reagentes.

Molaridade

Uma solução 1 (um) molar (M) corresponde ao peso molecular da substância, expresso em gramas, dissolvido em 1000 mL do solvente (normalmente água).

$$1\text{M} \longrightarrow \text{PM (g)} \longrightarrow 1000\text{mL}$$

Exemplo 1: Preparo de 1000 mL de NaOH (PM = 40g)

$$\begin{array}{l}
 1M \longrightarrow 40g \longrightarrow 1000mL \\
 0,1M \longrightarrow y \longrightarrow 1000mL \\
 y = \frac{0,1 \times 40}{1} \quad y = 4g
 \end{array}$$

A solução desejada (NaOH 1M) é obtida dissolvendo-se 4g de NaOH em 1000mL de água destilada.

Exemplo 2: Preparo de 500 mL de HCl 0,1M (PM = 37g)

$$\begin{array}{l}
 1M \longrightarrow 37g \longrightarrow 1000mL \\
 0,1 M \longrightarrow y \longrightarrow 1000mL \\
 y = \frac{0,1 \times 37}{1} \quad y = 3,7g \\
 \\
 0,1 M \longrightarrow 3,7g \longrightarrow 1000mL \\
 0,1 M \longrightarrow z \longrightarrow 500mL \\
 z = \frac{3,7 \times 500}{1000} \quad z = 1,85g
 \end{array}$$

A solução desejada é obtida dissolvendo-se 1,85g de ácido clorídrico em 500 mL de água destilada. Como o HCl é líquido, deve-se verificar qual a quantidade (em mililitros) equivalente à 1 g do soluto (veja quadro abaixo).

Reagente concentrado	Quantidade em mL equivalente à 1g do soluto puro
Ácido acético glacial	1 g = 0,96 mL
Hidróxido de amônio	1 g = 3,97 mL
Ácido clorídrico	1 g = 2,3 mL
Ácido nítrico	1 g = 1,01 mL
Ácido fosfórico	1 g = 0,7 mL
Ácido sulfúrico	1 g = 0,57 mL

No caso de uma solução de HCl:

$$\begin{array}{l} 1\text{g} \longrightarrow 2,3\text{mL} \\ 1,85\text{g} \longrightarrow Z \\ Z = \frac{1,85 \times 2,3}{1} \quad Z = 4,3\text{mL} \end{array}$$

A partir do cálculo acima, a solução de HCl 1N é obtida pipetando-se 4,3 mL de HCl e elevar ao volume de 500mL com água destilada. Frise-se que, no preparo de substâncias líquidas, medir as quantidades usando provetas graduadas.

Para preparar quantidades pequenas, utilizar pipetas; mas **atenção!** NUNCA pipetar usando a boca, sempre um pipetador.

Normalidade

Uma solução 1 (um) normal (N) corresponde ao “equivalente-grama (Eq-g) da substância, expresso em gramas, dissolvido em 1000 mL do solvente (normalmente água)”.

$$1\text{N} \longrightarrow \text{Eq-g (g)} \longrightarrow 1.000\text{mL}$$

O equivalente-grama (Eq-g) de uma substância corresponde ao seu “peso molecular (PM) expresso em gramas, dividido pela quantidade de H^+ ou OH^- da substância”.

$$\text{Eq-g} = \frac{\text{PM (g)}}{\text{H}^+/\text{OH}^-}$$

Exemplo: 1000 mL de NaOH 1N (PM = 40g)

$$\begin{array}{l} 1\text{N} \longrightarrow \text{Eq-g (g)} \longrightarrow 1000\text{mL} \\ 1\text{N} \longrightarrow 40\text{g} \longrightarrow 1000\text{mL} \end{array}$$

$$\text{Eq-g} = \frac{\text{PM (g)}}{\text{H}^+/\text{OH}^-} \Leftrightarrow \text{Eq-g} = \frac{40\text{g}}{1} = 40\text{g}$$

Assim, a solução de NaOH 1N é obtida dissolvendo-se 40g de NaOH em 1000 mL de água destilada.

OBS: Para substâncias como NaOH e HCl, o valor obtido para a molaridade é igual ao da normalidade, tendo em vista que liberam um radical hidroxila/hidrogênio. Assim, basta realizar o cálculo da molaridade. Entretanto, no cálculo da normalidade de substâncias como ácido sulfúrico (H_2SO_4), pois possuem dois hidrogênios ionizáveis (H^+) e, no cálculo do Eq-g, o PM deve ser dividido por 2.

Soluções fisiológicas

As soluções fisiológicas mantêm a integridade estrutural e funcional de um tecido por várias horas após sua remoção do organismo. Isso ocorre devido à semelhança da composição iônica dos fluidos extracelulares, assim como a pressão osmótica e o pH. Entretanto, as soluções fisiológicas não contêm os nutrientes necessários para sustentar a vida por um período prolongado ou para promover o crescimento *in vitro*.

No preparo das soluções salinas, cada ingrediente deve ser inicialmente e dissolvido em água destilada (em volume menor). Após a dissolução total, o volume deve ser completado com água destilada.

Para preparar as soluções, é importante usar uma proveta graduada para medir a quantidade de soluto (água) em uma solução. Apesar da proveta ter menor precisão que outros acessórios laboratoriais, seu uso é indicado para preparo de soluções de histologia.

Solução de Ringer-Locke (para mamíferos)

Cloreto de sódio (NaCl)	9 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,25g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,3 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,5 g
Glicose (C ₆ H ₁₂ CO ₃)	1g
Água destilada	1000 mL

Solução de Ringe (para anfíbios)

Cloreto de sódio (NaCl)	6,5 g
Cloreto de potássio (KCl)	0,25g
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,3 g
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	0,5 g
Água destilada	1000 mL

Solução fisiológica (para animais endotérmicos)

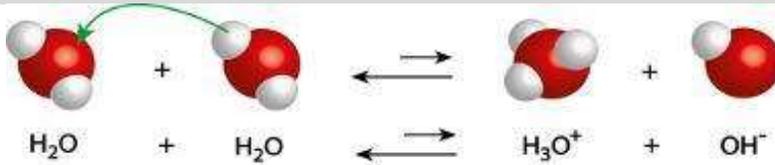
Cloreto de sódio (NaCl)	9 g
Água destilada	1000 mL

Soluções tampão

A água é uma substância anfótera, se comportando como ácido em certas situações e como base em outras. No entanto, a água é autoionizante, o que significa que é uma molécula pode receber um próton, formando o cátion hidrônio (H₃O⁺), e a outra molécula formar o ânion hidróxido (OH⁻) (Fig. 2).

No estado líquido, uma pequena parte da água se dissocia, originando íons H⁺ e OH⁻. Essas quantidades determinam o caráter ácido-base de uma solução.

Fig. 2: Ilustração da autoionização da água, mostrando o equilíbrio da água. Esse equilíbrio pode ser expresso de forma mais simples, como $\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{OH}^-$.



O pH (potencial hidrogeniônico) expressa o grau de acidez de uma solução. Quando a quantidade de $[\text{H}^+]$ é maior do que $[\text{OH}^-]$, a solução é considerada ácida. Uma solução é básica ou alcalina quando $[\text{OH}^-]$ é maior do que $[\text{H}^+]$.

A maioria dos tecidos biológicos possui pH⁷ próximo do neutro. Os melhores resultados são obtidos ao utilizar soluções tampão com pH entre 7,2 e 7,4, visto que as propriedades das moléculas biológicas sofrem variações significativas com pequenas mudanças dependendo do pH do meio. Para haver estabilidade de pH, se utilizam substâncias tampões.

A escolha de uma solução tampão para determinado processamento de material biológico leva em consideração:

- a) a eficácia do tampão na faixa requerida de pH;
- b) a ausência de componentes que possam agir de forma indesejada com outras substâncias da solução a ser tamponada.

Os tampões são soluções que mantêm o pH relativamente constante, não sofrendo alterações significativas mesmo quando outras substâncias são adicionadas à solução. Essa característica torna os tampões ideais para certas aplicações, como fixadores tamponados,

⁷ pH (potencial hidrogeniônico) expressa o grau de acidez de uma solução. Os valores de pH variam de 0 a 14. Na solução ácida, $[\text{H}^+]$ é maior que $[\text{OH}^-]$; na solução básica ou alcalina, o $[\text{OH}^-]$ é maior que $[\text{H}^+]$ em solução.

que proporcionam melhor fixação ao atuarem em pH semelhante ao pH fisiológico.

Devido à capacidade de resistir a mudanças significativas no pH, conhecida como característica tamponante, as soluções tampão são eficazes em manter o pH estável, mesmo quando outras substâncias (misturas) são adicionadas.

A solução tampão pode ser constituída por um ácido fraco (ácido conjugado) e seu sal (base conjugada) ou por uma base fraca (base conjugada) e seu sal (ácido conjugado).

Nos laboratórios, é comum o uso de soluções tampão. Geralmente, ao se preparar uma solução, utiliza-se soluções de hidróxido e sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) com diferentes normalidades (N) para se ajustar o pH de outra solução, seja para torná-la mais alcalina ou ácida.

A seguir, apresentamos as bases para calcular a molaridade e a normalidade de uma substância.

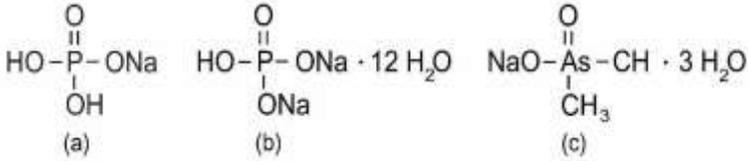
É importante destacar que algumas soluções utilizadas não devem ter seus pH “ajustados” usando soluções à base de NaOH (1N ou 0,1N) ou HCl (1N ou 0,1N). Por essa razão, recomendamos consultar a literatura especializada.

Muitas soluções tem sua atividade tamponante em determinado pH; portanto, é essencial que a verificação do pH da solução seja realizada utilizando um equipamento – o medidor de pH.

Em geral, os fixadores são diluídos em soluções tampão para manter o equilíbrio osmótico do material e garantir que o pH permaneça próximo ao pH fisiológico, que pode variar dependendo do grupo animal utilizado no estudo.

Entre tampões mais utilizados em microscopia de luz está o tampão fosfato de sódio 0,1M, preparado a partir do fosfato de sódio dibásico e do fosfato de sódio monobásico (Fig. 3).

Fig. 3: Fórmula química do fosfato de sódio monobásico (a) fosfato de sódio dibásico (b) e cacodilato de sódio (c)



Outros tampões são usados, como o tampão cacodilato de sódio 0,1M (Fig. 30). Essa solução tampão de cacodilato é usualmente empregada no processamento de material destinado à análise pela microscopia eletrônica.

A seguir, apresentamos o preparo de algumas soluções tampão.

Tampão fosfato (PB, phosphate buffer) 0,1 M (pH 7,3 – 7,4)

O tampão fosfato é recomendado devido à sua estabilidade em pH próximo ao neutro (pH 7,4); não é tóxico e possui custo relativamente baixo.

Quando comparado com os outros tampões e adicionado à solução com o glutaraldeído, o tampão fosfato promove pouca extração de proteínas e lipídeos. No entanto, é importante comentar que o tampão fosfato não pode ser usado na presença de íons metálicos (todos os cátions, exceto Na^+ , K^+ , NH^+) por poder precipitar na forma de fosfatos insolúveis.

Soluções:

Fosfato de sódio dibásico 0,2M	500 mL
Fosfato de sódio monobásico 0,2M	100 mL ⁸

⁸ Usualmente não se utiliza toda essa quantidade, uma vez que o fosfato de sódio monobásico é utilizado para acertar o pH da solução tampão.

Modo de preparo: Para preparar 1000mL da solução tampão, colocar 500 mL da solução fosfato de sódio dibásico 0,2M em um becker com capacidade de 1000 mL. Em seguida, utilizando a solução fosfato de sódio monobásico 0,2M acertar o pH para 7,3 ou 7,4. Após ajustar o pH, transferir a solução para uma proveta e elevar até 1000 mL com água destilada. Guardar em geladeira.

Tampão fosfato salina (PBS, phosphate buffer saline) a 0,1 M (pH 7,3 – 7,4)

Soluções:

Fosfato de sódio dibásico 0,2M	500 mL
Fosfato de sódio monobásico 0,2M	100 mL
Cloreto de sódio	9 g

Modo de preparo: Para preparar 1000 mL, colocar 500 mL da solução de fosfato de sódio dibásico em um becker de 1000 mL. Usando a solução de fosfato de sódio monobásico acertar o pH para 7,3 ou 7,4. Após ajustado o pH, adicionar o cloreto de sódio (NaCl). Após dissolver, transferir a solução para uma proveta e elevar até 1000 mL com água destilada. Manter em geladeira.

Tampão acetato de sódio 0,1M (pH 3,6 a 5,6)

Soluções:

Acetato de sódio 0,1M	500 mL
Ácido acético 0,1M	para acertar o pH

Tampão citrato 0,1M (pH 6,0)

Modo de preparo: Realizar o cálculo de molaridade (ver pág. 13). O pH da solução é ajustado com a solução de ácido clorídrico (HCl) 1M.

Tampão citrato de sódio 0,1M (pH 6,0)

Soluções:

Ácido cítrico 0,1M	257 mL
Fosfato de sódio dibásico 0,2M	243 mL
Água destilada	500 mL

Modo de preparo: Em um becker, colocar a solução de ácido cítrico. Em seguida, adicionar a solução de fosfato de sódio dibásico. Ajustar o pH com a solução de NaOH 1N. Levar a solução para uma proveta e, com água destilada, acertar o volume para 1 litro.

Tampão Sörensen 0,1M (pH 6,7)

Solução 1: Fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,2M

Solução 2: Fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) 0,2M

Modo de preparo: Para preparar 1000 mL da solução tampão, colocar 500 mL da solução fosfato de sódio dibásico em um becker com capacidade de 1 litro.

Com a solução fosfato de potássio monobásico acertar o pH para 7,3 ou 7,4.

Após ajustado o pH, transferir a solução para uma proveta e elevar até 1000 mL com água destilada. Guardar a solução tampão em geladeira.

Tampão Tris⁹-HCl 0,05M (pH 8,5) (solução de uso)¹⁰

Modo de preparo: Para preparar 1 litro desse tampão, realizar o cálculo de molaridade (ver página 13).

Em um becker, dissolver a quantidade (em gramas) de tampão tris em 700 mL de água. Em seguida, ajustar a solução até atin-

⁹ Tris = hydroximetil-aminometano

¹⁰ O tampão Tris-HCl é usado como tampão diluente para DAB diante o processo de revelação na técnica de imuno-histoquímica

gir o pH desejado com a solução de HCl 1N. Ao final, colocar a solução em uma proveta e completar até o volume final de 1 litro com água destilada.

Comumente, a solução Tris-HCl é preparada concentrada em 0,2M (solução estoque). Para uso, a solução é diluída de modo que a molaridade fique em 0,05M.

Tampão Tris salino 0,05M (pH 7,6) (solução de uso)

Modo de preparo: Realizar o cálculo de molaridade conforme indicado na página 13. Realize o cálculo para preparar 1 litro da solução.

Em um becker de 1000 mL, coloque a quantidade (em gramas) de Tris (resultado do cálculo de molaridade) acrescente cerca de 700 mL de água destilada. Em seguida, ajuste o pH com HCl 1N.

Para cada 1000 mL da solução tampão, adicionar 8 g de cloreto de sódio (NaCl). A seguir, coloque a solução em uma proveta e eleve ao volume final de 1000 mL com água destilada.

Tampão Tris-EDTA 0,05M (pH 9) (solução de uso)

Modo de preparo: Realizar o cálculo de molaridade (ver pág. 13). Em um becker, coloque a quantidade de Tris (resultado do cálculo de molaridade) acrescente cerca de 700 mL de água destilada.

Em seguida, ajuste o pH desejado com HCl 1N.

Para cada 1000 mL da solução tampão, adicionar 2 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético).

Capítulo 3

Etapas da técnica histológica

Antes de iniciar qualquer atividade relacionadas ao preparo do material incluído em parafina, recomenda-se que o manuseio cuidadoso do material.

Durante o manuseio, é importante não pressionar a amostra para evitar compressão da amostra, o que poderia comprometer a integridade da estrutura tecidual. Portanto, dependendo da fragilidade de cada órgão, recomenda-se o uso de instrumentos de dissecação delicados, como pinças e tesouras.

Fixação

A fixação é realizada mediante utilização de substâncias fixadoras, que tem por finalidade a preservação da estrutura do tecido/órgão e evitar a deterioração dos componentes teciduais durante as etapas subsequentes da técnica histológica.

A finalidade da fixação é a preservação dos elementos teciduais, como células e matriz extracelular, mantendo as estruturas íntegras, o mais próximo possível de quando *in vivo*, ao mesmo tempo que previne a autólise.

A fixação deve ser feita imediatamente após a coleta, evitando longos intervalos de tempo entre a necropsia e a imersão do material no fixador.

Métodos de fixação

A fixação do material biológico pode ser realizada utilizando substâncias (**método químico**) ou através do congelamento do material (**método físico**).

Método físico

Após retirar do organismo, a amostra é imediatamente congelada pela imersão em nitrogênio líquido (-150°C ou -170°C), sem o uso de substâncias químicas¹¹.

Método químico

Na fixação química, a estrutura tecidual é preservada usando **fixadores**. Os fixadores têm por finalidade a manutenção da integridade dos tecidos, mesmo após a morte do animal ou quando pequena porção do órgão é removida (biópsia).

Para que determinada substância, isolada ou em mistura com outras substâncias, atue como um bom fixador histológico, a substância ou a mistura fixadora revele:

- Rapidez de atuação;
- Bom poder de penetração;
- Promover boa preservação das estruturas teciduais;
- Possibilitar o emprego subsequente das técnicas de coloração.

Não existe fixação perfeita; entretanto, espera-se que o fixador cause o mínimo de alterações na estrutura do tecido. Não existe “fixador ideal”, uma vez que as substâncias fixadoras têm vantagens

¹¹ Em alguns casos, a amostra é por um fixador e posteriormente congelada para enrijecimento do material, permitindo a confecção de cortes.

e desvantagens. Portanto, a finalidade da fixação de material biológico deve:

- Evitar, ao máximo, as possíveis alterações celulares (autólise);
- Impedir a atividade e a proliferação de bactérias;
- Preservar as proteínas;
- Inativar enzimas proteolíticas;
- Enrijecer os órgãos de modo que os tecidos resistam às etapas subsequentes da técnica;
- Aumentar a afinidade das estruturas teciduais pelos corantes.

Fatores que interferem na fixação

Existem vários fatores que interferem no processo de fixação de determinado órgão. Dependendo do objetivo do estudo, a morfologia dos elementos teciduais pode ser alterada por fatores, tais como:

- Tamponamento: o pH da solução deve estar entre 6,0 e 8,0;
- Temperatura da solução de acondicionamento do material: deve se evitar temperaturas muito altas;
- Velocidade de penetração das substâncias fixadoras nos tecidos;
- O volume da peça¹² (órgão/fragmento do órgão) deve ser considerado, evitando-se peças muito grandes;
- Osmolaridade da solução fixadora (solução hipertônica/hipotônica), a qual pode afetar a osmolaridade do tecido da espécie animal analisada;
- Substâncias adicionais acrescentadas às misturas fixadoras;
- Concentração das substâncias fixadoras na solução;
- Tempo de fixação, que varia conforme o tipo de fixador.

¹² De um modo geral, a literatura especializada sugere que o volume do fixador deva ser vinte vezes o volume da peça; entretanto, na prática, é possível obter boa fixação com volumes menores da solução fixadora.

É importante notar que alguns fixadores penetram rapidamente, mas não são eficazes na preservação nos tecidos. Por outro lado, outras substâncias fixadoras penetram lentamente, mas preservam bem o material. Portanto, é aconselhável consultar a literatura especializada para verificar as vantagens e as desvantagens de cada substância contida na solução fixadora.

Na prática de fixação, geralmente são utilizadas misturas fixadoras, que consistem em soluções contendo substâncias fixadoras para promover a estabilidade da solução. O objetivo é conseguir que as vantagens de determinada substância se sobreponham às desvantagens de outras presentes na mistura.

Tipos de fixadores

Os fixadores podem ser de diversos tipos e atuar de forma distinta, dependendo do tecido.

É fato que não existe fixador perfeito; no entanto, ao escolher um fixador, é importante considerar o tipo de tecido, além de verificar as vantagens e desvantagens de cada substância presente na solução fixadora. Dessa forma, recomenda-se a utilização de misturas fixadoras e/ou a adição de substâncias na solução para melhorar a preservação do material.

Quando não se tem conhecimento ou acesso à informação sobre determinada substância/mistura fixadora, é recomendável realizar testes prévios com diferentes fixadores antes de iniciar qualquer estudo. Esses testes devem considerar também o tipo de tecido/órgão que se deseja analisar. Dessa forma, realizar testes com diferentes tipos de fixadores é importante para determinar qual fixador forneceu a melhor preservação do material.

As substâncias com ação fixadora podem ser utilizadas isoladamente (fixadores simples) ou combinada (misturas fixadoras).

Fixador simples

O fixador é classificado como simples quando a solução fixadora contém apenas um tipo de substância com propriedades de preservação dos elementos teciduais. Essa substância pode ser usada dissolvida em álcool (solução alcoólica) ou em água (solução aquosa). Exemplos de fixadores simples incluem o etanol, o formol, o tetróxido de ósmio, o ácido pícrico, o ácido acético, o ácido tricloroacético, entre outras substâncias.

Misturas fixadoras

Nas misturas fixadoras, diferentes substâncias fixadoras são combinadas com o objetivo de que as vantagens de uma substância compensem a desvantagem da outra substância.

Geralmente, as obras clássicas sobre histotecnologia fornecem informações sobre fixadores ou misturas fixadoras, visando auxiliar na escolha dos fixadores mais adequados que promovam os melhores resultados com determinado material biológico. De um modo geral, quando associam várias substâncias fixadoras são reunidas em uma mesma solução, bons resultados são obtidos.

Como exemplos de misturas fixadoras, pode-se citar:

- Líquido de Clarke: contém etanol e ácido acético;
- Líquido de Carnoy: contém etanol, clorofórmio e ácido acético;
- Líquido de Bouin: solução aquosa saturada de ácido pícrico, contendo formol e ácido acético;
- Líquido de Gendre: solução alcoólica saturada de ácido pícrico, contendo formol e ácido acético;
- Fixador de Zenker: solução aquosa contendo cloreto de mercúrio e dicromato de potássio;

- Líquido de Helly: semelhante ao fixador de Zenker (solução aquosa contendo cloreto de mercúrio e dicromato de potássio), mas difere por também conter formol.

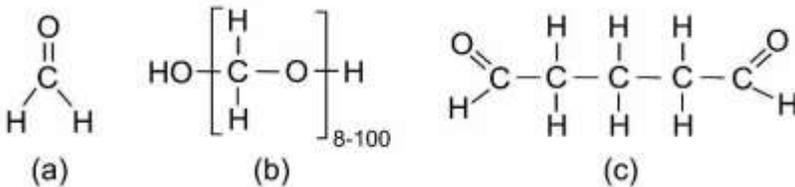
Classificação dos fixadores

Fixadores aldeídicos

Os fixadores aldeídicos são aqueles em que a substância fixadora estabelece ligações cruzadas com as proteínas teciduais, particularmente com os resíduos de lisina.

Exemplos fixadores aldeídicos incluem o formol, o paraformaldeído e o glutaraldeído (Fig. 4).

Fig. 4: Fórmulas química:
(a) formol, (b) paraformaldeído e (c) glutaraldeído.



Formol (formaldeído¹³, formalina)

O **formol** foi descoberto em 1867 pelo alemão August Wilhelm von Hofmann. Contudo, somente em 1897, Ferdinand Blum utilizou o formol na fixação de tecidos biológicos após descobrir que a solução aquosa de formol tornava a pele dos seus dedos enrijecida e ressecada como couro.

¹³ Formaldeído é um gás que, na forma líquida, é designado formol.

A propriedade do formol como fixador foi relatada pela primeira vez em 1892 por Trillat. Atualmente, o formol é usualmente utilizado para a preservação de material analisado ao microscópio de luz (Fig. 2a).

No preparo da solução de formol a 10%, 10 mL de formol são dissolvidos em água destilada até o volume da solução atingir 100 mL, ou seja, adiciona-se 90 mL de água destilada à quantidade de formol (10 mL).

É importante notar que a solução comumente referida como “solução de formol a 10%”, na realidade, contém o formol na concentração de 4%, uma vez que a concentração máxima do formol é de 40%, sendo comercialmente designado como formol P.A. (pró-análise¹⁴). Portanto, ao utilizar o formol P.A. no preparo da solução fixadora conforme mencionado acima, a concentração do formol é de 4%.

Alguns autores recomendam adicionar o metanol (na concentração de 10 a 15%) à solução de formol para prevenir a polimerização do formol, uma vez que o formol pode se oxidar em ácido fórmico ao longo do tempo de acondicionamento. No entanto, essa recomendação não é adotada na prática dos laboratórios de histologia.

Para prevenir a formação de ácido fórmico, a solução de formol deve ser preparada em um tampão¹⁵ (com pH em torno de 7,0). No

¹⁴ P.A. (Para Análise) é a denominação usada para reagentes com alto grau de pureza, sendo que esses reagentes provenientes de fábrica contêm em seus rótulos diversas informações, como a fórmula química, o grau de pureza, densidade, massa molecular, além de símbolos que indicam se o reagente é inflamável, irritante, tóxico, etc. As substâncias preparadas a partir de reagentes P.A. devem conter o nome da fórmula do reagente, assim como a concentração da solução comercializada.

¹⁵ Solução tamponada é uma mistura que não sofre variação de pH.

cotidiano, é comum utilizar o formol diluído em fosfato de sódio (solução tampão fosfato¹⁶).

Lillie (1965) recomenda o uso da solução de formol neutro tamponado a 10%. O uso de solução tampão associado ao formol previne a acidificação da solução fixadora, evitando possíveis danos aos tecidos. Segundo o autor, soluções que contenham cromatos e que são acondicionadas por longos períodos não devem conter formol.

É importante destacar que o material fixado em solução de formol não deve permanecer na solução por vários dias, uma vez que há risco de formação de pigmento formólico no tecido. Após a fixação (respeitando-se o tempo necessário), o tecido deve ser rapidamente lavado com água¹⁷ e transferido para solução de álcool etílico a 70%, onde pode permanecer por meses, ou até mesmo anos.

Embora atue relativamente devagar, o formol penetra e fixa bem o tecido. Portanto, o formol pode ser utilizado para fixar material destinado ao estudo com emprego de técnica de imuno-histoquímica¹⁸. Entretanto, o formol não é o fixador ideal para o estudo de carboidratos (glicocojugados).

Para promover a fixação de carboidratos, a literatura mais recente sugere a utilização de outros tipos de fixadores ou misturas fixadoras mais específicas. No entanto, caso não seja possível realizar testes com mais de um fixador ou não se tenha acesso à outras substâncias com propriedades fixadora, pode-se optar pela fixação com solução de formol neutro tamponado a 10%.

¹⁶ PB (tampão fosfato), solução tamponada com fosfato de sódio; Phosphate Buffer do inglês).

¹⁷ Pode-se utilizar água de torneira; não há a necessidade de lavar em água destilada.

¹⁸ Muitos estudos recomendam utilizar o formol preparado a partir do paraformaldeído. Entretanto, muitos estudos também revelam a fixação com formol.

Paraformaldeído

O **paraformaldeído** é o produto da polimerização do formol com 8 a 100 unidades, sendo também designado polioximetileno (conforme IUPAC¹⁹). O paraformaldeído é adquirido comercialmente na forma de um pó de colocação branca.

Preparo da solução à base de paraformaldeído

Para preparar a solução fixadora a partir do paraformaldeído, é necessário realizar um procedimento específico. Inicialmente, o paraformaldeído é dissolvido em água destilada sob agitação, devendo a solução ser aquecida a uma temperatura de 60 a 70°C²⁰. Recomenda-se utilizar um Erlenmeyer para o preparo dessa solução, uma vez que essa vidraria tem uma base larga e uma abertura estreita, o que reduz a liberação do gás e liberação do vapor d'água.

Por exemplo, para preparar 100 mL da solução do paraformaldeído, deve se utilizar um becker de 250 mL e, com o auxílio de um agitador magnético, observar que o paraformaldeído se dissolva na solução (Fig. 5).

No preparo dessa solução, o paraformaldeído é dissolvido enquanto a solução é aquecida sob agitação. Para isso, recomenda-se utilizar um Erlenmeyer, que é colocado em uma placa aquecedora²¹ com agitação uma vez que a dissolução do paraformaldeído ocorre melhor com agitação e temperatura alta (sem permitir que a solução entre em ebulição). A abertura do Erlenmeyer deve ser coberta com um vidro, como um becker pequeno, para evitar evapo-

¹⁹ IUPAC - Internacional Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada).

²⁰ Ao se elevar a temperatura próxima ao ponto de ebulição da água, todo o cuidado é necessário para não deixar a solução ferver.

²¹ A solução deve ser aquecida, levada à quase fervura, mas sem ferver.

ração da solução, o que poderia alterar a concentração final do paraformaldeído na solução.

Fig. 5: Disposição da vidraria para preparo da solução de paraformaldeído. Um becker deve ser colocado sobre a abertura do Erlenmeyer de modo a prevenir a evaporação da solução sem a necessidade de vedar o recipiente. É importante realizar todo o procedimento no interior de capela de exaustão de gases.



Todo o procedimento deve ser realizado dentro de capela de exaustão de gases uma vez que a liberação do vapor do paraformaldeído é extremamente tóxico.

Após a dissolução do paraformaldeído, a solução apresenta cor branca-opaca; no entanto, a solução final e pronta para uso deve ser transparente.

Para que a solução se torne transparente, quando começar a borbulhar, adiciona-se algumas gotas de NaOH 1N²².

Após a solução se tornar transparente, é importante deixá-la esfriar e, em seguida, filtrar. Esse procedimento também deve ser realizado em capela de exaustão de gases. Após filtração, a solução estará pronta para uso.’

²² Se a solução foi preparada corretamente, com 2 ou 3 gotas, a solução fica transparente.

Glutaraldeído

O **glutaraldeído** é usualmente usado na preparação de soluções fixadoras para amostras destinadas à análise pela microscopia eletrônica. O glutaraldeído promove boa fixação e reage primariamente com o grupamento amino das proteínas, causando deformação da estrutura em α -hélice das proteínas.

Apesar de fixar rapidamente, o glutaraldeído penetra lentamente e reage de modo irreversível com os grupamentos amino ($-\text{NH}_2$) dos aminoácidos²³ básicos, o que dificulta a coloração das estruturas teciduais. Entretanto, o glutaraldeído não é recomendado para amostras a que serão submetidas à técnica de imuno-histoquímica à microscopia de luz.

No estudo pela microscopia eletrônica, recomenda-se utilizar do glutaraldeído em soluções tampão, podendo-se adicionar outras substâncias, conforme a necessidade.

Fixadores mercuriais

O mecanismo exato de ação dos fixadores à base de mercúrio nos tecidos não é conhecido. No entanto, a literatura sugere que os fixadores mercuriais penetram lentamente na amostra, causando endurecimento e retração dos tecidos, além de precipitar proteínas.

No preparo de fixadores mercuriais, é importante manipular com muito cuidado o cloreto de mercúrio (HgCl_2) por ser uma substância corrosiva.

Fixadores contendo cloreto de mercúrio têm sido recomendados para fixação de tecido hematopoiético. No entanto, atualmente,

²³ Os aminoácidos são moléculas orgânicas com um grupamento funcional carboxila ($-\text{COO}^-$) e amino ($-\text{NH}_3^+$), ligados a um único carbono na posição alfa (carbono α).

evita-se o uso de fixadores mercuriais devido à alta toxicidade do mercúrio é que é um contaminante ambiental prejudicial à saúde, podendo ser absorvido pela pele e causar efeitos graves.

A inalação do vapor de cloreto de mercúrio causa irritação da garganta e pulmões, provocando tosse e dificuldade respiratória. Exposições frequentes ao cloreto de mercúrio podem causar edema pulmonar.

O líquido de Zenker é um fixador que contém cloreto de mercúrio na sua composição; portanto, é necessário ter todo cuidado com a sua manipulação. Atualmente, o líquido de Zenker não tem sido mais utilizado na histoquímica.

Fixadores alcoólicos

Os fixadores alcoólicos penetram lentamente na amostra, causando endurecimento, clareamento do material e desnaturam proteínas.

O álcool atua como agente desidratante, provocando retração do tecido e também causa alteração do citoplasma (distorção celular) e extração de lipídeos. Os fixadores alcoólicos são bons para estudo citológico por fornecer detalhes nucleares, sem interferir na coloração citoplasmática.

Exemplos de fixadores alcoólicos incluem o metanol e o etanol, os quais podem ser usados em diferentes concentrações, dependendo do estudo.

Agentes oxidantes

Dependendo dos objetivos do estudo, algumas substâncias com atividade oxidante podem ser adicionadas à solução fixadora. No entanto, é importante considerar a ação de tais compostos, uma vez

que muitos deles podem promover ligação cruzada com proteínas, causando desnaturação. Além disso, a penetração dessas substâncias no tecido é geralmente lenta.

O permanganato de potássio, o dicromato de potássio e o tetróxido de ósmio são exemplos de agentes oxidantes comumente utilizados nas misturas fixadoras.

O **permanganato de potássio** (KMnO_4) é um sal inorgânico de coloração violeta intensa, sendo forte oxidante em seu estado sólido e em solução aquosa. Por ser forte oxidante, o contato com glicerina, etanol e outras substâncias, além do ácido sulfúrico deve ser evitado. O permanganato de potássio também revela propriedade desinfetante, mas deve ser usado com toda precaução.

O **dicromato de potássio** ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) é uma substância cristalina de coloração laranja-avermelhada no estado sólido. O dicromato de potássio é solúvel em água e insolúvel em álcool, mas não é inflamável. No entanto, seu uso deve ser evitado devido à sua toxicidade, propriedade alergênica, provocar irritação ocular, além de apresentar efeitos nocivos para a via respiratória e ser cancerígeno. Para a manipulação com segurança, é essencial usar luvas, óculos de acrílico com proteção laterais, jaleco e máscara de proteção das vias respiratórias. No tecido, o dicromato de potássio pode danificar as nucleoproteínas, prejudicando a preservação da morfologia nuclear. Não se recomenda o seu uso de forma isolada devido ao seu potencial em provocar edema tecidual e dificultar os procedimentos subsequentes da técnica. No entanto, o dicromato de potássio é utilizado em misturas fixadoras, como no líquido de Zenker, por propiciar a fixação de lipídeos.

O **tetróxido de ósmio** (OsO_4) é um sólido volátil, cristalino e de coloração amarelo-acastanhado, mas é incolor quando puro e dissolvido em água. Por penetrar facilmente em materiais plásticos, o tetróxido de ósmio deve ser acondicionado em vidro e em locais fres-

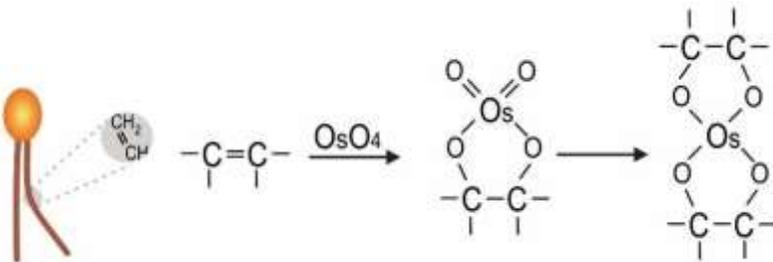
cos. Devido à sua alta toxicidade, sua manipulação deve ser cuidadosa, preferencialmente em capela de exaustão de gases e utilizando luvas. O vapor do tetróxido de ósmio pode causar edema pulmonar e lesões na córnea, podendo levar à cegueira.

O tetróxido de ósmio é indicado para a fixação de lipídeos, inclusive os fosfolipídeos da membrana plasmática. Inicialmente, o tetróxido de ósmio foi utilizado na identificação da bainha de mielina e de lipídeos. Atualmente, seu uso é priorizado para a fixação de material destinada à análise pela microscopia eletrônica.

Além de se ligar aos ácidos graxos insaturados, como os fosfolipídeos da membrana celular, o tetróxido de ósmio também atua como agente “contrastante”. Dessa forma, além de proporcionar melhor preservação da ultraestrutura, facilita a visualização das membranas.

No caso de certos componentes celulares, como inclusões lipídicas e membranas, o tetróxido de ósmio interage com as duplas ligações dos fosfolipídeos vizinhos de modo a estabilizá-los (Fig. 6).

Fig. 6: Interação do tetróxido de ósmio com a cadeia de glicerol dos fosfolipídeos de membrana.



Ao se ligar ao alceno²⁴, o tetróxido de ósmio forma um éster de osmato intermediário, que é rapidamente hidrolisado para produzir um diol vicinal²⁵.

Devido ao seu peso molecular (PM = 254,23), o tetróxido de ósmio se interpõe na passagem de luz (microscópio de luz), favorecendo a visualização das estruturas na cor preta por obstruir a passagem dos feixes de luz.

Além de atuar como fixador na microscopia eletrônica, o tetróxido de ósmio atua como agente contrastante, bloqueando a passagem de elétrons através da amostra. Essas estruturas, designadas eletron densas, são evidenciadas em preto.

Picratos

Apesar de não se compreender completamente o mecanismo de ação do ácido pícrico nos tecidos, sabe-se que ele forma picratos com proteína²⁶.

O ácido pícrico possui boa capacidade de penetração nos tecidos e facilita a coloração subsequente, sendo recomendado para a fixação de carboidratos nos tecidos, como o glicogênio hepático. No entanto, o ácido pícrico é ruim para a fixação de lipídeos nos tecidos.

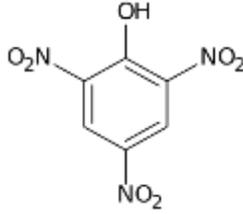
O ácido pícrico (Fig. 7) requer armazenamento úmido, ou seja, deve ser mantido em frasco com pequena quantidade de água, uma vez que a substância seca é explosiva.

²⁴ Hidrocarboneto com dupla ligação, também classificados como hidrocarbonetos alifáticos insaturados.

²⁵ Composto com dois grupos hidroxilas em carbonos vizinhos.

²⁶ Mitchel (1977) sugere que o ácido pícrico se associa seletivamente com a arginina.

Fig. 7: Fórmula do ácido pícrico



Para a utilização de fixadores à base de ácido pícrico, é recomendável que a permanência da amostra na solução por um período máximo de até 24 horas. Após fixação, é importante lavar a amostra em água de torneira²⁷ e, em seguida, em álcool a 70%²⁸, onde também deve ser mantido antes de prosseguir com os procedimentos da técnica histológica.

O líquido de Bouin e o líquido de Gendre são exemplos de fixadores que contêm o ácido pícrico em sua composição.

Tipos de fixação

Após eutanásia ou realização de biópsia, a fixação do material pode ocorrer pela simples imersão da amostra em solução fixadora (**fixação por imersão**) ou pela injeção da solução fixadora no corpo do animal experimental (**fixação por perfusão**).

Na **fixação por imersão**, o material retirado do organismo deve ser rapidamente imerso na solução fixadora. No entanto, é necessário

²⁷ Água de torneira é comumente referida nos livros de técnica como água corrente e se refere à água obtida diretamente da rede hidráulica (da torneira) e, após lavagem, deve ser acondicionada em recipiente próprio para descarte adequado.

²⁸ A lavagem em álcool pode ser feita também várias vezes para se remover o excesso do ácido pícrico e, seu resíduo deve ser acondicionado em recipiente próprio para descarte adequado.

considerar se o órgão (ou parte dele removido) é compacto ou se apresenta como uma estrutura tubular.

No caso de órgãos compactos, como o fígado, baço, entre outros, pode ser necessário reduzir as dimensões do órgão de modo a se obter fragmentos menores. Esses fragmentos devem ter espessura adequada para permitir a penetração da solução fixadora; recomenda-se que os fragmentos tenham até 5mm de espessura. O procedimento que tem por objetivo a redução da dimensão dos órgãos é designado **clivagem**.

Na **fixação por perfusão**, a proposta é que o fixador, ao ser injetado no animal, alcance a intimidade dos tecidos (Fig. 8).

Fig. 8: Na fixação por perfusão, o fixador penetra nos tecidos através dos vasos sanguíneos. Na perfusão, o fixador é injetado no coração via ventrículo. Esse método de fixação é especialmente útil para estudar animais com anatomia interna incomum, como é o caso de filhote de arraia (foto).



Nesse procedimento, a solução fixadora é injetada através do coração (via ventrículo) logo após eutanásia. Dessa maneira, o sistema vascular, composto por vasos sanguíneos, é utilizado na distribuição do fixador por todo o corpo do animal. Os vasos san-

guíneos desempenham o papel de “canais de distribuição” do fixador até a intimidade dos tecidos de modo a preservar todos os órgãos.

Preparo de alguns fixadores

Muitas substâncias que atuam como fixador podem ser utilizadas isoladamente (fixadores simples) ou combinadas com outras substâncias que possuam propriedades fixadoras (misturas fixadoras).

Devido à facilidade no preparo e o baixo custo, o formol é um fixador frequentemente utilizado na concentração de 10%.

Ressalte-se que todas as soluções fixadoras aqui mencionadas devem ser preparadas em capela de exaustão de gases; e o manuseio dos recipientes deve ser realizado preferencialmente com luvas de proteção.

OBS: A capacidade da vidraria (becker, Erlenmeyer ou proveta) está relacionada à quantidade de solvente²⁹ de solução que se presente preparar conforme indicado nas receitas.

Solução de formol a 10%

Formol PA (40%)	10 mL
Água destilada	90 mL

Tempo de fixação: De 6 à 24 horas, dependendo das dimensões do fragmento.

Modo de preparo: Utilizando uma proveta de 100 mL, colocar a quantidade do formol e adicionar a água destilada até completar

²⁹ Solute é a substância que se deseja dissolver no solvente (que dissolve a substância; água ou álcool).

o volume de 100 mL. Acondicionar em vidro etiquetado, indicando a composição do líquido.

Solução de formol neutro tamponado a 10% (Lillie 1965) (recomendado para uso rotineiro)

Formol PA (40%)	10 mL
Água destilada	90 mL
Fosfato de sódio monobásico	0,4 g
Fosfato de sódio dibásico (anidro)	0,6g

Modo de preparo: Utilizando um becker com capacidade de 250 mL, dissolver o fosfato de sódio monobásico em água destilada. Em seguida, dissolver o fosfato de sódio dibásico. Ao final, acrescentar o formol.

Tempo de fixação: De 6 à 24 horas, dependendo das dimensões do fragmento.

Solução de formol à 10% - acetato de sódio (formol-acetato)

Formol PA (40%)	10 mL
Água destilada	90 mL
Acetato de sódio	2 g

Modo de preparo: Em um becker de 250 mL, dissolver o acetato de sódio em água destilada. Em seguida, acrescentar o formol. Essa solução é usada principalmente para acondicionar material por longo período, pois o acetato de sódio evita a formação de ácido fórmico, que reduz o pH da solução, evitando danos ao material.

Solução de formol - brometo de amônio

Formol PA (40%)	15 mL
Água destilada	85 mL
Brometo de amônio	2 g

Modo de preparo: Utilizando um becker de 250 mL, dissolver o brometo de amônio em água destilada. Em seguida, acrescentar o formol.

Esse fixador é recomendado para fixação de tecido a ser submetido às impregnações metálicas, principalmente aquelas usadas no estudo do tecido nervoso.

Solução de formol - álcool etílico - ácido acético

Formaldeído PA (40%)	10 mL
Álcool 80%	90 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Modo de preparo: Utilizando um becker de 250 mL, dissolver o formol em água destilada e, em seguida, acrescentar o ácido acético glacial.

Essa mistura não é um bom fixador de rotina, nem é indicado para o acondicionamento de peças anatômicas. No entanto, promove rápida fixação, prevenindo a hidrólise de carboidratos antes da fixação de proteínas. Além disso, o ácido acético, ao fixar as nucleoproteínas, melhora a coloração nuclear.

Tempo de fixação: Fragmentos de 2 mm de espessura atingem a fixação completa de 4 a 6 horas.

Solução de formol - cálcio

Formol PA (40%)	10 mL
Álcool 80%	90 mL
Cloreto de cálcio (anidro)	1 g

Modo de preparo: Utilizando um becker de 250 mL, dissolver o formol em água destilada. Em seguida, acrescentar o cloreto de cálcio.

Esse fixador é indicado para estudo de lipídeos. No entanto, o material não deve ser submetido ao procedimento rotineiro para inclusão em parafina³⁰. Para o estudo dos lipídeos, os cortes devem ser confeccionados com auxílio de um criostato e submetidos à coloração específica.

Solução de formol neutro a 10% em tampão fosfato (pH 7,2–7,3)

Como as soluções muito ácidas podem afetar a estrutura dos tecidos, diferentes soluções tamponadas foram propostas para evitar o pH ácido dos fixadores.

É importante destacar que o formol neutro tamponado a 10% foi desenvolvido em uma época em que não havia equipamento para medição de pH. Portanto, várias receitas indicando as quantidades dos seus componentes (expressas em gramas) são encontradas na literatura especializada. No entanto, não há garantia de que o pH da solução fique em torno do pH neutro, a menos que se utilize um medidor de pH (designado pHmetro).

Note a maneira correta de preparo da solução de formol a 10% em tampão fosfato (pH 7,2–7,3) e como deve se ajustar o pH. A medição deve ser realizada com um medidor de pH.

Preparar previamente as seguintes soluções, as quais podem ser acondicionadas em um Erlenmeyer:

Sol. A: fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) 0,2M 500 mL

Sol. B: fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4) 0,2M³¹

Modo de preparo: Utilizando um becker com capacidade de 1 litro (= 1000 mL), colocar 500 mL da solução A; em seguida, adicio-

³⁰ No procedimento rotineiro, usa-se o xilol que é um solvente orgânico. O xilol, ao se combinar com lipídeos, remove-os do tecido (ver inclusão em parafina adiante).

³¹ Recomenda-se preparar cerca de 200 mL da solução 2 e, caso sobre a solução, ela pode ser guardada em geladeira para uso posterior.

nar 100 mL de formol PA. Depois misturar ambas soluções, acertar o pH (7,2–7,3) usando a solução B.

Após ajuste do pH, colocar a solução em uma proveta graduada de 1000 mL e elevar, com água destilada, até o volume final desejado (1000 mL).

Líquido de Bouin

Solução aquosa saturada de ácido pícrico ³²	75 mL
Formol PA (40%)	25 mL
Ácido acético PA	5 mL

Modo de preparo: Preparar previamente a solução aquosa saturada de ácido pícrico. Retire 75 mL dessa solução com cuidado, sem “movimentar”³³ muito o líquido. Colocar a solução em uma proveta de 100 mL. Em seguida, adicione o formol. A solução final deve ser acondicionada em vidro adequado (com etiqueta). Ao final, adicione o ácido acético.

Tempo de fixação: de 4 a 6 horas dependendo das dimensões do fragmento do órgão, podendo se estender, excepcionalmente, até 24 horas.

O líquido de Bouin fixa bem proteínas e glicogênio, além de realçar a coloração dos elementos teciduais. No entanto, devido ao seu pH baixo, o ácido acético na solução pode atar precipitando os ácidos nucleicos.

Após a fixação, para remover o excesso do fixador, uma vez que o ácido pícrico tende a enrijecer muito o material, recomenda-se:

- Lavar o material várias vezes em água corrente (água da torneira) após fixação;

³² Em solução saturada, o ácido pícrico encontra-se na concentração de 0,9 a 1,2%.

³³ Para evitar carrear cristais de ácido pícrico.

- Transferir o material para álcool a 70%, podendo permanecer no álcool por tempo indeterminado (sugere-se fazer algumas lavagens para remover o excesso de ácido pícrico).
OBS.: não descartar na pia, mas acondicionar em frasco próprio para descarte por firma especializada.
- Caso os cortes ainda estejam fortemente amarelados durante a microtomia, é possível imergir os cortes em solução aquosa saturada de carbonato de lítio até o clareamento dos cortes; em seguida, os cortes devem ser lavados em água destilada para seguir direto para a coloração.

Líquido de Gendre

O líquido de Gendre possui composição similar à do líquido de Bouin, diferindo apenas que a solução saturada de ácido pícrico é preparada em álcool a 70%.

Solução alcoólica saturada de ácido pícrico	75 mL
Formol PA (40%)	25 mL
Ácido acético PA	5 mL

Modo de preparo: Antes de tudo, preparar a solução alcoólica saturada de ácido pícrico. Com movimentos delicados, retirar 75 mL do frasco e colocar em um becker de 150 ou 200 mL. Em seguida, adicionar o formol e depois o ácido acético. Acondicionar em frasco de vidro. Não esquecer de adicionar a etiqueta.

Tempo de fixação: Até 2 horas. Dependendo das dimensões do fragmento do órgão, a fixação pode se estender até 8 horas para fragmentos maiores. Para tecido embrionário, recomenda-se reduzir o tempo de fixação.

Líquido de Helly

Cloreto de mercúrio	5 g
Dicromato de potássio	2,5 g
Sulfato de sódio	1 g
Formol (PA)	0,5 mL
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Em um becker de 250 mL, dissolver o cloreto de mercúrio em água destilada. Em seguida, colocar o dicromato de potássio e o sulfato de sódio. Ao final, acrescentar o formol.

Tempo de fixação: Cerca de 4 horas.

Líquido de Zenker (modificado)

O líquido de Zenker não é um fixador para uso cotidiano, já que o cloreto de mercúrio tem forte tendência a precipitar as proteínas, enquanto que o dicromato age sobre os lipídeos, formando compostos insolúveis e estabilizando a estrutura celular. Seu uso é indicado em técnicas específicas.

Cloreto de mercúrio	5 g
Dicromato de potássio	2,5 g
Sulfato de sódio	1 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Dissolver o cloreto de mercúrio em água destilada em um becker de 250 mL. Em seguida, adicionar o dicromato de potássio e o sulfato de sódio. Por fim, acrescentar o formol. Como a mistura final se deteriora com o tempo, no momento de uso, adicionar 5 mL de ácido acético glacial para cada 95 mL solução totalizando 100 mL.

Tempo de fixação: O fixador deve ser preparado em menos de 4 horas antes do uso, não ultrapassando 6 horas de preparo. Após a fixação, aconselha-se colocar os fragmentos da amostra em solu-

ção aquosa de dicromato de potássio a 2,5%. Em seguida, os fragmentos devem ser lavados várias vezes com água corrente (água de torneira) e armazenados em álcool 70%.

Solução de Carnoy

Álcool absoluto	60 mL
Clorofórmio	30 mL
Ácido acético glacial	10 mL

Modo de preparo: Em uma proveta de 250 mL, dissolver o clorofórmio no álcool. Em seguida, colocar o ácido acético glacial.

Tempo de fixação: A solução de Carnoy penetra rapidamente, fixando a amostra em cerca de 3 horas, em média.

Após a fixação não é necessário lavar a amostra em água, sendo possível transferir diretamente para o álcool absoluto. A solução de Carnoy fixa bem o glicogênio, a substância de Nissl e o núcleo, mas causa hemólise.

Solução de formol-cálcio de Baker (indicado para lipídeos)

Cloreto de cálcio	1 g
Formol (PA)	10 mL
Água destilada	90 mL

Modo de preparo: Em um becker de 250 mL, coloque a água destilada e dissolva o cloreto de cálcio. Em seguida, adicionar o formol.

Fixador Saint Marrie (indicado para glicoconjugados)

Etanol a 95%	99 mL
Ácido acético	1 mL

Modo de preparo: Em uma proveta de 100 mL, colocar o etanol e acrescentar o ácido acético.

Solução de ALFAC (ÁLcool, Formol, ÁCido Acético)

Álcool etílico a 95%	85 mL
Formol (PA)	10 mL
Ácido acético glacial	5 mL

Tempo de fixação: Este fixador é sugerido para estudo de tecidos vegetais e, dependendo das dimensões do fragmento, a fixação ocorre em cerca de 24 horas.

OBS: Lavar a amostra em álcool 80% por 24 horas após a fixação e acondicionar, se necessário, em álcool 70%.

Fixador para raiz de cebola

Solução 1

Ácido acético glacial	1g
Óxido de cromo	7 mL
Água destilada	93 mL

Solução 2

Formol	30 mL
Água destilada	70 mL

Modo de preparo: Em um becker, juntar a solução 1 e a solução 2 no momento de uso. Fixar de 12 a 24 horas; sem lavar, transferir diretamente para álcool a 70%, mudando a solução a cada 30 minutos por 2 horas.

OBS.: prepare a solução na quantidade necessária para utilizar; não é aconselhável guardar a solução final (soluções 1 + 2).

Para dar continuidade ao processamento, após retirar excesso do fixador, transferir a amostra diretamente para álcool a 85%.

Clivagem

A clivagem visa reduzir as dimensões do material para obter fragmentos menores, sendo recomendada sua realização antes ou imediatamente após a imersão da amostra no fixador, ou simultaneamente com a fixação.

Durante a clivagem também é importante manusear a amostra com cuidado, além de garantir a limpeza do local para prevenir a contaminação da amostra.

É essencial utilizar instrumentos adequados, como pinças e tesouras delicadas, compatíveis com as dimensões dos órgãos para dissecação e clivagem do órgão. Além disso, é imprescindível o uso de navalhas afiadas, uma vez que as navalhas desgastadas podem danificar a amostra.

Fragmentos com pequenas dimensões são essenciais para facilitar a penetração adequada do fixador, especialmente quando a fixação é realizada por imersão na solução fixadora. Portanto, enfatizamos a importância da clivagem, especialmente de órgãos compactos.

Os fragmentos menores facilitam a penetração do fixador e a preservação adequada dos elementos teciduais. Por essa razão, recomendamos que os fragmentos não tenham mais de 5-6 mm de espessura. Fragmentos espessos dificultam a penetração dos fixadores e comprometem a preservação da amostra, uma vez que a fixação deve ocorrer de maneira uniforme.

É comum notar que os fragmentos com dimensões maiores de 6 mm sejam fixados apenas em na sua periferia, enquanto que o interior da amostra revela áreas sugestiva de deterioração tecidual. Isso sugere que a fixação não foi realizada adequadamente, danificando os tecidos.

Além do contato prolongado com substâncias, a dimensão dos fragmentos também influencia as etapas subsequentes da técnica histológica.

Capítulo 4

Procedimento para inclusão em parafina

O tratamento subsequente à clivagem envolve várias etapas, iniciando pela desidratação, seguida da clarificação, impregnação em parafina e, por fim, o emblocamento (confecção do bloco).

O objetivo dessa etapa é preparar o material para a confecção de cortes finos que permitam a coloração adequada e a visualização da estrutura dos tecidos ao microscópio de luz.

Durante o processamento histológico, as amostras de tecido podem ser acondicionadas em cassetes³⁴ (Fig. 9).

Fig. 9: Cassetes de plástico para acondicionar material a ser processado, usualmente, em processador de tecidos.



Os cassetes, que acondicionam as amostras, devem estar devidamente identificados com o número de registro do material.

³⁴ Cassetes são usados para acondicionar os fragmentos de órgãos. Esses cassetes são confeccionados em material plástico que resiste ao contato com as substâncias usadas nessa etapa, como o xilol.

O uso de cassetes permite o processamento de um maior número de amostras, mesmo que seja de forma manual³⁵. Esses cassetes são fabricados em material plástico resistente às substâncias usadas, como o xilol.

Caso não seja possível dar continuidade ao processamento logo após a fixação, o material pode ser mantido em álcool 70%, aguardando para prosseguir com as demais etapas do processamento (Fig. 10).

Chamamos a atenção para se respeitar o tempo necessário para a fixação do material. Esse tempo pode variar conforme o tipo de fixador usado e a dimensão do fragmento.

Fig. 10: As amostras nos cassetes (à esquerda) podem ser acondicionadas em vidro e submetidas ao processamento juntas, o que economiza tempo e substâncias, garantindo as mesmas condições para todas as amostras. No recipiente à direita, note que as amostras estão fora dos cassetes e em contato direto com o fundo do frasco, algo que deve ser evitado. A visualização das amostras durante o processamento, quando são submetidas ao álcool e xilol, permite verificar se o processamento está ocorrendo de maneira adequada.



³⁵ O processamento manual se refere ao procedimento realizado sem o apoio de um equipamento.

Durante essas etapas, a amostra entra em contato com substâncias, algumas das quais são altamente tóxicas; portanto, é necessário manusear com muito cuidado a amostra. Nesse sentido, recomenda-se fortemente que o manuseio ocorra no interior da capela de exaustão de gases ou em local bem ventilado e isolado das demais áreas do laboratório.

O processamento para a inclusão em parafina pode ser realizado manualmente – **processamento manual**. Nesse método, a amostra é colocada em recipientes de vidro, o que possibilita o acompanhamento visual, uma vez que a cor da amostra indica se o procedimento está ocorrendo de forma correta.

A inclusão em parafina também pode ser realizada com o auxílio de um processador automatizado de tecidos (Fig. 11). No entanto, se não for viável realizar o processamento conforme planejado, a amostra pode ser mantida em álcool 70% até que seja possível dar prosseguimento em momento mais oportuno.

OBS.: Antes de realizar o processamento da amostra em equipamento, sugerimos realizar o processamento manual por permitir verificar as características macroscópicas da amostra durante o contato com cada substância, como o álcool, o xilol e a parafina. O processamento manual é recomendado quando os efeitos dessas substâncias na amostra não são conhecidos. Por exemplo, o xilol pode danificar certos órgãos, tornando-os quebradiços e, consequentemente, dificultando a confecção de cortes histológicos.

No **procedimento automático**, usando um processador automatizado de tecidos, as etapas de desidratação, clarificação e a impregnação em parafina são realizadas sem a manipulação direta do material, restando apenas o emblocamento (confecção dos blocos) ser feito pelo técnico/pesquisador.

Fig. 11: Processador automatizado de bancada semifechado com função de vácuo. As amostras passam por recipientes contendo substâncias, como álcool e xilol, incluindo um recipiente aquecido e com temperatura controlada, onde a parafina é acondicionada.



Além de facilitar o trabalho, o processamento realizado em equipamento evita interferências externas, reduzindo possíveis falhas, como a exposição prolongada da amostra à determinada substância, o que poderia danificar a amostra.

O equipamento também possibilita programar o tempo em que a amostra permanecerá em cada substância, conforme as etapas da técnica histológica (desidratação, clarificação e impregnação em parafina). O uso de equipamento ainda permite que o processamento seja realizado durante o período noturno, restando apenas o emblo-

camento para ser realizado no dia seguinte, aumentando a produtividade laboral.

No processamento com o auxílio do equipamento, as amostras acondicionadas em cassetes são colocadas em cestos específicos (Fig. 12), sendo então levadas para o processador automatizado de tecidos (Fig. 11).

Fig. 12: Cesto para acondicionamento de cassetes.



Uma vez iniciado o processamento da amostra, este não deve ser interrompido e deve continuar até a confecção do bloco de parafina (emblocamento).

No entanto, após iniciado o processamento para inclusão em parafina, algumas circunstâncias podem impedir a conclusão de todo o procedimento no mesmo dia. Nessas situações, é possível interromper o processamento da amostra após o primeiro “banho de parafina”³⁶. No entanto, a amostra não deve permanecer na parafina líquida. É importante lembrar que o ponto de fusão da parafina varia

³⁶ Ao interromper o procedimento no primeiro “banho de parafina”, o material deve ser retirado do recipiente contendo parafina e guardado em recipiente próprio e protegido de poeira ambiental.

de 58 a 60 °C, e a exposição a temperaturas muito elevadas pode danificar a amostra.

Na prática, a amostra pode ser eventualmente retirada do equipamento após passar pelo primeiro banho de parafina e a passagem pelo segundo banho e o emblocamento podem ser realizados posteriormente. No entanto, essa prática é desaconselhada, uma vez que, para a parafina se tornar novamente líquida, é necessário levar a amostra para a estufa a fim de reaquecer a parafina antes de prosseguir com a inclusão e emblocamento em parafina. Esse tempo em que a amostra é submetida novamente ao calor pode danificar a amostra e, dessa forma, esse procedimento deve ser evitado.

Desidratação

Para realizar a inclusão de amostras em parafina, é necessário remover a água, uma vez que a parafina não é miscível com a água. O objetivo da desidratação é remover a água da amostra, preparando-a para a penetração de resinas.

Neste livro, abordaremos apenas os procedimentos para a inclusão em parafina, uma vez que a parafina é a resina mais utilizada nos laboratórios, devido ao seu baixo custo em comparação com outras opções disponíveis no mercado.

É importante ressaltar que a maioria das técnicas histoquímicas foi desenvolvida para material incluído em parafina, o que justifica a manutenção da parafina como resina padrão para a realização das técnicas histoquímicas.

Nessa etapa, o álcool etílico é utilizado em concentrações crescentes (álcool a 70%, 80%, 90% e 100%)³⁷, permitindo a remoção da água da amostra sem danificar a amostra (Fig. 13).

Para garantir a desidratação adequada da amostra, além da utilização de álcool de boa qualidade, recomenda-se realizar duas passagens pelo álcool 100% (álcool absoluto) para garantir a completa remoção da água da amostra. Caso a água não seja totalmente removida, as etapas subsequentes serão comprometidas.

Fig. 13: Sequência de álcoois na desidratação. Na prática, a concentração do álcool é expressa em porcentagem (%), embora a quantidade de álcool em solução seja medida em grau Gay-Lussac (°GL). Para garantir a desidratação eficiente, sugerem-se realizar duas passagens de álcool absoluto (álcool etílico absoluto PA). No processamento manual, a amostra passa por uma sequência de álcoois, que devem ser acondicionados em frascos de vidro com tampas, com a finalidade de evitar a hidratação da solução.



Outro aspecto a ser considerado durante a desidratação é a condição ambiental no dia ou semana em que o processamento será realizado. Uma vez que a umidade do ar tende a ser mais elevada em dias chuvosos ou nos dias subsequentes aos períodos de chuva,

³⁷ Cabe ressaltar que, apesar da concentração do etanol ser em porcentagem, o mais correto é expressar a concentração do etanol em grau Gay Lussac (GL). A graduação GL se deve a Joseph Louis Gay-Lussac (1778-1850), um físico e químico francês.

recomenda-se verificar o teor alcoólico³⁸ (GL³⁹). Nessas condições ambientais adversas, indicamos a substituição, principalmente, do álcool 100%.

Devido ao custo financeiro das substâncias, muitos laboratórios tentam economizar. Nesse sentido, sugere-se preparar as soluções mais baixas do álcool (70, 80 e 90) a partir do álcool comercial com teor alcoólico de 90°GL, devido ao seu custo ser menor.

Recorde-se que, embora a concentração dos álcoois seja expressa em porcentagem, a medição do álcool deve ser expressa em GL. Assim, para facilitar o preparo na graduação correta, sugerimos a utilização de um alcoômetro⁴⁰ (veja preparo de soluções).

É importante destacar que, além da qualidade do álcool e da manutenção do teor alcoólico, é fundamental o monitoramento da quantidade de vezes que o álcool foi usado. À medida que a água é removida, ela se acumula na solução alcoólica, alterando a graduação (GL), ou seja, o álcool deixa de ser absoluto e a desidratação da amostra não ocorrerá de forma eficaz, o que prejudicará a etapa seguinte (clarificação).

É importante também considerar a densidade dos líquidos envolvidos com essa etapa (água e álcool). A densidade do álcool é de 0,789 g/cm³, enquanto a densidade da água é de 0,99 g/cm³, ou seja, a água é mais densa (mais pesada) que o álcool em condições ambientais. Dessa forma, à medida que é removida do tecido, a água

³⁸ A medição do teor alcoólico em °GL pode ser realizada utilizando um alcoômetro (ou densímetro de álcool Gay-Lussac), utilizado para determinar o teor de álcool em uma solução de água-álcool.

³⁹ O grau Gay Lussac (GL) é a unidade utilizada para indicar a quantidade de álcool absoluto em 100 mL de solução hidroalcoólica; portanto, ao utilizar álcool absoluto para preparar uma concentração menor, o cálculo da porcentagem equivale ao grau GL.

⁴⁰ Alcoômetro é o instrumento utilizado para medir o teor de álcool em uma solução na faixa de 0 a 100 °GL.

tende a se acumular no fundo do recipiente. Portanto, durante a desidratação, é essencial manter o recipiente com as amostras em constante agitação para evitar que a água se acumule no fundo do recipiente para que a desidratação ocorra de maneira correta

Em muitos laboratórios, é comum que os usuários adicionem grande quantidade de álcool no recipiente, acreditando que a desidratação ocorrerá de maneira mais efetiva, o que não é verdade. O mais importante é assegurar a qualidade do álcool para que o álcool esteja na graduação desejada, garantindo uma desidratação mais eficiente. Nesse sentido, sugere-se realizar duas passagens da amostra no álcool absoluto para garantir a desidratação completa do tecido (Fig. 11), uma vez que o álcool absoluto, após a passagem pelo álcool 90%, pode não estar completamente livre de água, comprometendo a desidratação.

Durante a desidratação, a amostra poderá reduzir suas dimensões, sendo importante que a fixação seja realizada com reagentes de qualidade para minimizar os efeitos da desidratação.

Diafanização ou clarificação

A diafanização, também denominada clarificação, é a etapa subsequente à desidratação. Nessa etapa, o material é tratado com o xilol. O xilol é um solvente orgânico usado para remover o álcool dos tecidos e prepará-los para a penetração da parafina, uma vez que o álcool e a parafina não são miscíveis.

O xilol comercial é uma mistura dos isômeros orto, meta e para-xileno, além do etilbenzeno. É um líquido volátil, incolor, inflamável, derivado do petróleo ou da hulha⁴¹.

⁴¹ A hulha é um tipo de carvão mineral ou carvão natural, rico em carbono, formado há milhões de anos a partir de vegetais.

Devido à sua alta toxicidade, deve-se ter extremo cuidado durante o manuseio do xilol. Dessa forma, a manipulação das amostras deve ser realizada no interior de uma capela de exaustão de gases e em local bem ventilado.

Caso todo o processamento histológico seja realizado em equipamento próprio, como o processador automatizado de tecidos (Fig. 9), recomenda-se que o equipamento seja instalado em espaço próprio e isolado do ambiente laboratorial. É fundamental que esse espaço possua um exaustor de gases operando continuamente por 24 horas para remover vapor de xilol do ambiente e não somente durante o processamento.

Certos cuidados também devem ser adotados durante a diafanização. Como a densidade do xilol é de $0,864 \text{ g/cm}^3$ e a do álcool é de $0,789 \text{ g/cm}^3$, o xilol tende a se acumular no fundo do recipiente e o álcool na superfície. Portanto, durante a clarificação não é necessário agitar o recipiente que contém a amostra, ao contrário do que ocorre durante a desidratação.

Alguns autores sugerem a utilização de outras substâncias durante a clarificação. Por exemplo, o tolueno é recomendado por alguns autores para o processamento de órgãos do sistema nervoso central, uma vez que o xilol tende a retrainir a amostra e tornar o tecido quebradiço. No entanto, essa recomendação não é unânime.

Nos últimos anos, outras substâncias têm sido testadas como alternativas para o xilol. Apesar disso, ainda não há consenso em relação ao uso dessas substâncias, como o óleo de vegetais usado durante a clarificação.

Impregnação e emblocamento em parafina

Na estufa, a parafina⁴² é acondicionada em recipientes de vidro, organizados nos diferentes níveis da estufa (Fig. 14).

A parafina é uma mistura de hidrocarbonetos saturados derivada do petróleo, sendo sólida à temperatura ambiente e líquida em temperatura em torno dos 58 °C (ponto de fusão de parafina).

Fig. 14: Impregnação em parafina realizada em estufa. Notar que a estufa possui dois níveis de prateleira: na prateleira superior, aloca-se um recipiente de vidro com a parafina de 1º banho (depois do xilol), enquanto na prateleira inferior, coloca-se a parafina do 2º banho (sem resíduo de xilol). Como o xilol é volátil, ao evaporar, ele é removido sem contaminar a amostra que está no 2º banho de parafina, garantindo a impregnação.



⁴² O técnico deve tomar o cuidado para ligar a estufa antes de iniciar o processamento e verificar se a parafina já está líquida para receber a amostra. Dessa forma, a parafina poderá se difundir para o interior da amostra. Sugerimos o uso de recipiente de vidro para auxiliar a visualização do material durante a impregnação da amostra.

No **processamento manual**, a impregnação em parafina é realizada em estufa com temperatura em torno de 60°C, ligeiramente acima da temperatura de fusão da parafina⁴³, de modo a garantir que a mesma fique no estado líquido e possa penetrar na amostra.

No nível superior da estufa, indicamos colocar um recipiente com a parafina (1º banho), que receberá a amostra logo após a passagem pelo xilol. Durante o procedimento na estufa, o calor favorece a liberação de vapor de xilol enquanto a parafina penetra na intimidade do tecido.

Na prateleira inferior, coloca-se outro recipiente com parafina do 2º banho, o qual receberá a amostra que já passou pelo 1º banho de parafina. É importante que a segunda passagem em parafina (2º banho) para garantir a remoção do xilol da amostra e assegurar a impregnação total da amostra pela parafina antes de seguir para a o emblocamento.

Na impregnação em parafina realizada com o suporte de **equipamento automatizado** (Fig. 8), a parafina é colocada em recipiente com aquecimento. Nesse equipamento, a parafina é pré-aquecida e mantida líquida e com temperatura constante. Para substituir o xilol e garantir a penetração da parafina nos tecidos, a amostra passa por duas passagens em parafina, que deve estar no estado líquido (aquecida com temperatura acima do seu ponto de fusão).

Durante a impregnação em parafina, temperaturas muito altas (acima de 65°C) devem ser evitadas, bem como a exposição da amostra ao calor por período muito prolongado. O aquecimento excessivo da amostra durante a impregnação pode causar danos no material, interferindo na morfologia tecidual e dificultando o diagnóstico histológico.

⁴³ Recomenda-se regular a estufa com temperatura em torno de 63–65°C. Temperaturas acima de 65°C devem ser evitadas por afetar os elementos teciduais.

Ressalte-se que, caso a temperatura elevada cause lesão no material, as etapas subsequentes serão comprometidas e, conseqüentemente, a amostra será perdida e não será recuperada.

Após a impregnação em parafina, a amostra segue para o emblocamento propriamente dito, o qual é realizado com o auxílio de um dispensador de parafina (Fig. 15).

Fig. 15: O dispensador de parafina é um equipamento equipado com um dispositivo que controla a temperatura em um recipiente que armazena e mantém a parafina no estado líquido. O técnico pode regular a temperatura conforme necessário, considerando o ponto de fusão da parafina. Reforçamos que a temperatura muito acima do ponto de fusão da parafina pode comprometer a estrutura do material e dificultar, ou mesmo impedir, a coloração do material, comprometendo o diagnóstico histológico.



O dispensador de parafina é geralmente dotado de um sistema de controle da temperatura da cuba que armazena a parafina. O objetivo é manter a temperatura estável⁴⁴, mantendo a parafina no estado líquido. Recomenda-se manter a temperatura da cuba em torno de 62°C, ligeiramente acima do ponto de fusão da parafina.

Antes de se iniciar a inclusão propriamente dita, é necessário separar os moldes (ou formas de inclusão), onde as amostras serão colocadas para a confecção do bloco de parafina (Fig. 16).

Fig. 16: Moldes para inclusão em parafina em aço inoxidável. As dimensões do molde devem ser compatíveis com as dimensões das amostras.



Os moldes para colocação das amostras são fabricados em aço inoxidável e estão disponíveis em diversas dimensões e formatos.

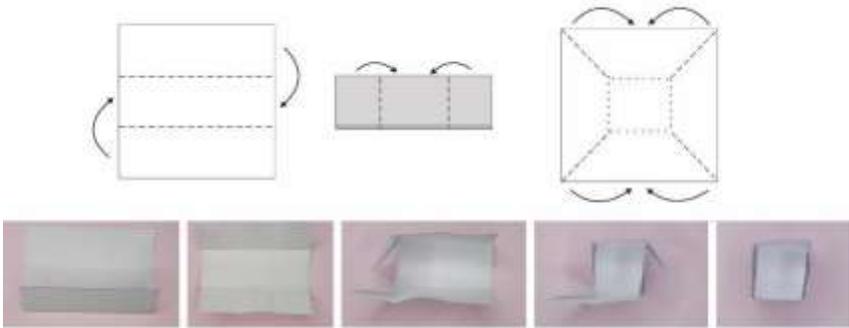
A escolha do molde para o emblocamento da amostra deve ser feita levando em consideração as dimensões dos fragmentos. Em outras palavras, para a inclusão de fragmentos muito grandes, aconselha-se optar por moldes maiores, enquanto as amostras com pequenas dimensões podem ser incluídas em formas menores.

Devido ao custo financeiro dos moldes em aço inoxidável, é possível que o laboratório não tenha quantidade suficiente de moldes

⁴⁴ Recomendamos que a inclusão e o emblocamento em parafina ocorram em ambiente sem aclimatização com ar-condicionado, pois o ar frio ambiental pode resfriar a parafina, principalmente ao redor do material, e comprometer a confecção de um bloco homogêneo.

para emblocar a quantidade de amostras. Para superar essa questão, é possível confeccionar caixas em papel⁴⁵ para inclusão (Fig. 17).

Fig. 17: Elaboração das caixinhas de papel. Para confeccionar as caixinhas, é possível utilizar qualquer papel comum; porém, recomendamos evitar o uso de papel filtro.



Antes de iniciar o emblocamento da amostra, é importante verificar se há parafina suficiente na cuba do inclusor de parafina e se a temperatura está adequada.

Ao iniciar o emblocamento, o cassete⁴⁶ contendo o fragmento da amostra é retirado do recipiente do 2º banho de parafina. Simultaneamente, um pouco de parafina líquida é colocado no molde. Em seguida, a amostra é retirada do cassete e rapidamente posicionada no molde de aço ou na caixa de papel. Essa etapa deve ser realizada o mais rápido possível para evitar que a parafina que envolve a amostra se solidifique, o que interferirá na homogeneidade do bloco.

⁴⁵ Cada laboratório deve ponderar se deve ou não usar as formas de aço inoxidável, uma vez que o micrótomo terá de possuir adaptador para o suporte de bloco confeccionado em papel ou outra forma de emblocamento.

⁴⁶ Os cassetes devem estar numerados de acordo com o número de registro do material.

Na sequência, com o auxílio de uma pinça delicada, a amostra imersa na parafina e contida no molde é cuidadosamente posicionada na base do molde, evitando que a parafina esfrie. Em seguida, a base do cassete de plástico é colocada sobre o molde, que já contém a amostra e um pouco de parafina, preenchendo assim o cassete com parafina líquida (Fig. 18).

Fig. 18: Inclusão em parafina para confecção do bloco. Inicialmente, a amostra é colocada no molde (a) e, em seguida, o molde é preenchido com parafina líquida. Na sequência, a base do cassete é posicionada sobre o molde (b) e é preenchida com parafina. Ao esfriar, a parafina retorna à temperatura ambiente, ela se solidifica (c).



O molde contendo a amostra já incluída é colocado em local fresco para resfriar até atingir a temperatura ambiente. Com o resfriamento, a parafina se solidifica e o bloco pode ser retirado do molde⁴⁷.

Atualmente, a parafina é comercializada pronta para uso durante a impregnação e o emblocamento. No entanto, é possível prepará-la artesanalmente para a inclusão. Para isso, prepara-se uma mistura, adicionando-se cera de abelha e a estearina à parafina pura. A cera de abelha (ou cera de carnaúba) torna a parafina mais plástica e facilita a confecção do corte, enquanto a estearina torna a parafina

⁴⁷ O bloco com o material incluído deve ser removido do molde sem ter grande resistência. Eventualmente, os moldes com o material podem ser resfriados em geladeira, com temperatura em torno de 4°C. No entanto, evitar colocar o molde com o material no freezer da geladeira, uma vez que o resfriamento muito rápido pode danificar a amostra.

mais rígida. É importante que a mistura seja preparada seguindo as quantidades indicadas pela literatura clássica (ver tabela 2).

Tabela 2: Mistura da parafina a ser utilizada na inclusão

Parafina pura	850 mL
Estearina ⁴⁸	100 g
Cera de abelha	50g

Atualmente, a parafina é comercialmente disponível e pronta para ser utilizada tanto na impregnação quanto no emblocamento propriamente dito.

Considerações: No processamento manual ou no automatizado, a amostra é submetida à ação de substâncias, desde o álcool, passando pelo xilol, até chegar à parafina. Devido ao uso de várias substâncias, muitas delas tóxicas, é essencial ter um equipamento de exaustor na área do processamento. Além disso, sugerimos evitar o uso de ar-condicionado durante a impregnação em parafina, já que a temperaturas baixas (abaixo dos 25°C) podem resfriar o material, afetando a uniformidade do bloco. Frise-se que a temperatura muito baixa favorece a solidificação da parafina, interferindo na confecção do bloco.

Protocolo para inclusão em parafina

O tempo necessário para que a amostra deve permaneça em cada solução durante o procedimento para inclusão em parafina varia conforme as dimensões da amostra e do tipo de tecido.

⁴⁸ A estearina [$C_{57}H_{110}O_6$, 1,3-di(octadecanoyloxy)propan-2-yl octadecanoate] ou ácido esteárico é um éster formado pelo ácido esteárico e o glicerol, é utilizada para endurecer sabonetes artesanais.

Reforçamos que os fragmentos devem ter, geralmente, a espessura de 5 a 6 mm, evitando-se fragmentos muito grandes.

As características anatômicas dos fragmentos também devem ser levadas em consideração. Órgãos ou estruturas tubulares, como os segmentos da via digestória e da via respiratória, requerem que os tempos de processamento sejam distintos daqueles usados para órgãos compactos, como fígado e baço. As dimensões e os tempos destinados ao processamento para órgãos mais friáveis, como encéfalo e tecido hematopoiético, também são parâmetros importantes a serem considerados.

Em suma, o processamento de diferentes órgãos ou tecidos com estrutura anatômica e microscópica distintas requer avaliação criteriosa, uma vez que o tempo que cada órgão permanece em contato com cada substância durante o processamento influenciará na qualidade final do material.

A seguir, propomos um protocolo básico e simples, indicando o tempo que fragmentos da amostra com cerca de 6 mm de espessura devem permanecer em cada substância até a inclusão em parafina. Reiteramos que o tempo que a amostra permanece em cada substância deve ser ajustado conforme a quantidade de amostras, o tipo de tecido e as dimensões do fragmento.

Sugestão de protocolo

1) desidratação

- álcool 70% - cerca de 30 minutos
- álcool 90% - 30 a 40 minutos
- álcool 100% - 30 a 45 minutos
- álcool 100% - 30 a 45 minutos

2) clarificação

- xilol 1 - 30 a 40 minutos
- xilol 2 - 30 a 40 minutos

3) impregnação em parafina (à 60°C)

- parafina 1 (1º banho) - 30 a 40 minutos
- parafina 2 (2º banho) - 30 a 40 minutos

Considerações: O cuidado com o processamento, desde a fixação até a confecção do bloco de parafina, é fundamental para garantir cortes de boa qualidade. No entanto, alguns protocolos recomendam que o material permaneça cerca de 1 (uma) hora em cada solução. Acreditamos que esse tempo seja excessivo, especialmente quando a amostra está imersa no xilol por longos períodos, uma vez que o xilol pode danificar o tecido, tornando o material ressecado e quebradiço. Frise-se que, ao passar pelo xilol, solvente orgânico, o material de natureza lipídica é removido. Assim, caso o objetivo seja estudar componentes de natureza lipídica, a amostra não deve ser processada para inclusão em parafina.

Além disso, é importante considerar o tipo de fixador, as dimensões do fragmento e o número de vezes que as substâncias foram utilizadas durante o processamento das amostras. No processamento realizado em processador automatizado de tecidos, a configuração adequada do equipamento também tem papel significativo.

O uso criterioso de substâncias durante o procedimento de preparação de material pela técnica histológica é fundamental. No protocolo proposto, a passagem pelo álcool 80% foi omitida. Além de reduzir os custos financeiros, a omissão do álcool 80% não compromete a desidratação da amostra e a diafanização é realizada com apenas duas passagens de xilol.

Processamento de material mineralizado

Os tecidos que contêm material inorgânico na forma de estruturas cristalinas em sua matriz extracelular são geralmente tecidos rígidos e necessitam de tratamento especial para a análise ao microscópio de luz.

A maioria dos depósitos de cálcio (fosfato de cálcio e carbonato de cálcio) nos tecidos mineralizados encontra-se na forma de cristais de hidroxiapatita. Nos mamíferos, esses cristais desempenham papel significativo na estruturação dos ossos e dos dentes.

Tecidos com matriz extracelular mineralizada precisam ser submetidos ao tratamento específico de modo a permitir a confecção de cortes delgados para serem observados ao microscópio de luz.

A metodologia a ser utilizada depende do objetivo do estudo, ou seja, se a análise histológica foca na porção orgânica do tecido (células e matriz extracelular) ou na porção mineral (cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita).

Para analisar a porção orgânica, o tecido precisa ser primeiramente fixado para preservar as suas células e matriz extracelular. Antes do início do procedimento, o cálcio deve ser removido através da descalcificação. Após descalcificada, a amostra pode ser clivada, podendo os fragmentos ser processados.

Para a análise da porção mineral, não é necessário fixar a amostra e os fragmentos podem ser submetidos à técnica do desgaste. Atualmente, existem equipamentos (micrótomos com tecnologia mais moderna) que possibilitam a visualização de fragmento mineralizado na íntegra (com porção mineral e porção orgânica). No entanto, devido ao alto custo desses equipamentos, eles não são usados rotineiramente.

Desgaste

O método de **desgaste** visa analisar a porção mineral do tecido, sem a necessidade de fixação do material. A peça anatômica retirada do organismo passa por um procedimento designado maceração⁴⁹.

Após seca, a peça é cortada em pequenos fragmentos, com cerca de 5–8 mm de espessura. Esses fragmentos serão então desgastados através da ação mecânica até que se obtenham cortes finos, com espessura adequada que permita a visualização da sua estrutura ao microscópio. No desgaste, os fragmentos são submetidos à ação de lixas com granulação muito fina (Fig. 19). Esse método é usualmente usado com propósitos didáticos ou de pesquisa.

Fig. 19: Sequência de procedimentos utilizados para confecção de lâmina histológica de tecido mineralizado. O fragmento da amostra é colado em uma lâmina de vidro usando uma substância adesiva. Na superfície oposta àquela em que o fragmento foi colado, são colocadas duas ventosas de plástico para facilitar o manuseio da lâmina. Com a superfície do material voltada para a lixa, desliza-se a lâmina várias vezes para desgastar o fragmento. Durante o desgaste, o fragmento é observado ao microscópio para verificar se ele já está com espessura adequada, possibilitando a visualização da estrutura tecidual.



Conforme a lâmina com a amostra desliza sobre a lixa, o fragmento é desgastado. A observação ao microscópio durante o des-

⁴⁹ Maceração é designação da técnica onde o órgão é deixado em recipiente fechado com substâncias específicas (normalmente a água contendo, por exemplo, detergente) para decomposição da porção orgânica do tecido.

gaste é fundamental, uma vez que o desgaste deve continuar até que as fatias atinjam a espessura necessária para permitir a visualização da estrutura tecidual.

No desgaste, não é necessário corar o material.

Descalcificação

A **descalcificação** do material mineralizado visa à observação dos componentes orgânicos do tecido, como as células e os elementos orgânicos da matriz extracelular. Para realizar a descalcificação, é necessário fixar a amostra para depois realizar a descalcificação.

Após a fixação e antes de submeter o material ao tratamento com substâncias químicas, como ácidos minerais ou orgânicos para remover o cálcio tecidual, recomenda-se lavar a amostra em água. Essa lavagem com água de torneira (água corrente) é realizada para evitar qualquer interação indesejada entre as substâncias presentes na solução fixadora e o descalcificador, que poderiam interferir na estrutura tecidual, formando precipitado.

Independentemente do tipo de agente descalcificador a ser utilizado, aconselhamos realizar várias trocas do líquido descalcificador. Essa recomendação é importante porque, à medida que o cálcio está sendo removido do tecido, ele poderá saturar a solução do descalcificador. Além disso, sugere-se agitar o líquido algumas vezes durante a descalcificação para evitar que o cálcio se deposite sobre a peça, interferindo no processo de descalcificação.

Substâncias descalcificadoras

Dentre as substâncias usadas como descalcificadores, destacam-se o ácido nítrico, o ácido fórmico, o ácido tricloroacético e o EDTA.

Ressalte-se que, independentemente da solução escolhida, a solução descalcificadora não deve ser descartada no encanamento após seu uso. Em vez disso, ela deve ser acondicionada em frascos próprios para descarte, seguindo-se as normas técnicas vigentes.

O **ácido nítrico** (HNO_3) é um ácido forte, miscível em água, inodoro, incolor e volátil à temperatura ambiente, além de ser forte oxidante e corrosivo. Para descalcificar sem danificar a amostra, o ácido nítrico é usado em solução aquosa a 5%. Após a descalcificação com o ácido nítrico, recomenda-se a imersão da amostra em solução de alúmen de potássio a 5% (ou sulfato de lítio a 5%) por 24 horas para evitar inchaço do tecido. Em seguida, a amostra deve ser lavada em água corrente⁵⁰ (água da torneira) de 24 a 48 horas.

O **ácido fórmico** (CH_2O_2) pode ser usado em solução aquosa ou alcoólica a 5%, ou combinado com solução fixadora contendo formol (ácido fórmico a 5% em solução aquosa de formol a 10%). O ácido fórmico é usado na descalcificação de pequenas peças, que ocorre de 3 a 5 dias. Após a descalcificação, a amostra deve ser cuidadosamente lavada em água corrente e então transferida para o álcool 70%, onde pode permanecer até o processamento da amostra para inclusão em parafina. Se a amostra tiver sido fixada em solução aquosa de formol a 10%, sugere-se que a peça seja descalcificada usando solução aquosa de ácido fórmico a 1% ou 5%, dependendo do tipo de amostra. Após descalcificação, a amostra é novamente lavada e acondicionada em álcool 70%.

O **ácido tricloroacético** (CCl_3COOH) é utilizado na concentração de 5% em misturas com líquidos fixadores, sendo o formol a 10% o mais empregado. A descalcificação ocorre geralmente em 4 dias. No entanto, como desvantagem, o uso do ácido tricloroacético

⁵⁰ Para se evitar o gasto excessivo de água, bem tão importante para o meio ambiente, sugere-se realizar de 2 a 3 trocas de água.

promove a coagulação de algumas das proteínas citoplasmáticas, causando enrijecimento do material e aumento do volume tecidual.

Após a descalcificação com o ácido tricloroacético, indicamos transferir a peça diretamente para o álcool 90% para evitar o inchaço do tecido, principalmente o tecido conjuntivo.

A descalcificação com ácido tricloroacético é recomendada para estudos do tecido hematopoiético da medula óssea. Durante a remoção desse tecido, é comum que o tecido ósseo também seja removido. Após a remoção, o conjunto (tecido hematopoiético e tecido ósseo) deve ser fixado e, em seguida, descalcificado.

Solução fixadora contendo substância descalcificadora:

Ácido tricloroacético	5 mL
Formol a 10%	95 mL

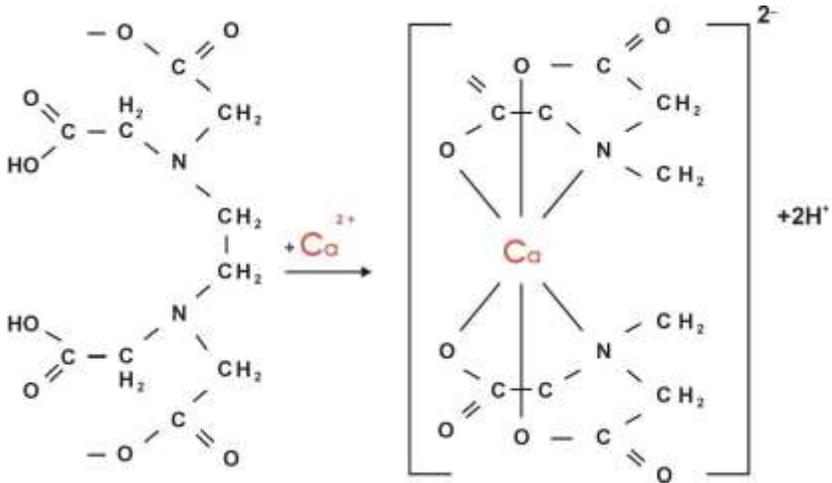
O EDTA (ácido etileno-diaminotetracético) (Fig. 20) é um composto orgânico que age como agente quelante, ou seja, se liga ao cálcio formando um complexo estável, mas que pode ser removido, promovendo a descalcificação do tecido. Fullmer e Link (1964) recomendam que a descalcificação seja realizada com solução mantida em leve e constante agitação, a temperatura de 4°C. O tempo necessário para a descalcificação varia conforme a espessura do fragmento.

Solução descalcificadora de EDTA (segundo Fullmer e Link, 1964):

EDTA	8 g
Tampão fosfato de sódio 0,1M	100 mL

Antes de utilizar o EDTA, o pH da solução deve ser ajustado para 7–8, usando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 10M para aumentar o pH ou de ácido clorídrico (HCl) 1N para diminuí-lo.

Fig. 20: Fórmula química do EDTA e sua interação com o cálcio tecidual durante o processo de descalcificação.



Para preparar 1 litro da solução descalcificadora de EDTA, deve-se proceder da seguinte forma:

1. Reservar cerca de 1 litro de água destilada;
2. Em um becker com capacidade de 1 litro, colocar 80g de EDTA;
3. Adicionar cerca de 800 mL de água destilada ao becker;
4. Ajustar o pH da solução de EDTA (pH 7–8), usando NaOH ou HCl;
5. Após ajustar o pH, transferir o líquido para uma proveta com capacidade de 1 litro.
6. Completar com água destilada até atingir o volume final de 1 litro.
7. Armazenar a solução de EDTA em frasco apropriado. Não esquecer de etiquetar no frasco, indicando a composição da solução e a data de preparo.

Devido à afinidade com o cálcio, o EDTA é considerado um agente sequestrante de metais, sendo também usado como anticoagulante. No comércio, o EDTA também é conhecido como titriplex® III.

Além do uso em laboratório, o EDTA é usado pela indústria alimentícia como agente estabilizador em molhos, conservas e algumas bebidas. Na agricultura, o EDTA atua como estabilizador de micronutrientes. É solúvel em água na proporção de 12g por 100 mL a 25°C; apresenta pH 5,0 em solução aquosa 0,2 M, comportando-se como um ácido fraco.

Como o pH da solução afeta a eficácia da quelação⁵¹, sua maior eficácia é observada em pH alcalino. No entanto, para descalcificar o tecido ósseo, o EDTA pode ser utilizado em pH acima de 7.

Descalcificação eletrolítica

Nesse método, a eletrólise⁵² reduz o tempo de descalcificação. A solução eletrolítica descalcificadora recomendada é:

Ácido fórmico 10%	100 mL
Ácido clorídrico 8%	80 mL
Água destilada	820 mL

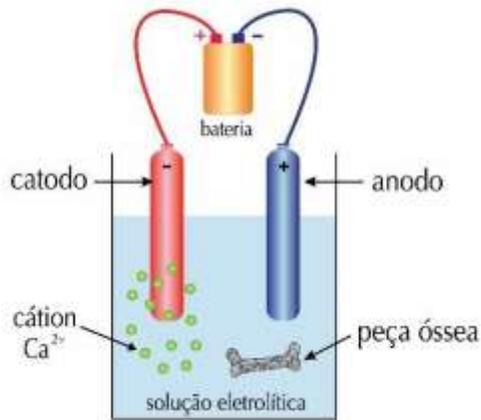
Nessa técnica, eletrodos são colocados em um recipiente de vidro contendo a solução descalcificadora (Fig. 21). Em seguida, a amostra é colocada no recipiente.

⁵¹ Na quelação, os átomos de metais (cálcio, cobre, ferro ou chumbo) se ligam a determinadas moléculas. Na medicina, a terapia de quelação é usada para tratar a intoxicação do organismo por excesso de metais, como o chumbo.

⁵² Com base no princípio da eletrólise, um processo não espontâneo, o cálcio é removido do tecido porque é atraído para o polo negativo (catodo) do eletrodo.

Na descalcificação eletrolítica, a peça óssea é fixada ao anodo (polo positivo). Quando a corrente é ativada no catodo (polo negativo), forma-se um campo magnético entre os dois eletrodos que atrai os íons de cálcio (positivo) do material para o catodo (eletrodo de carbonato).

Fig. 21: Esquema da cuba eletrolítica. A peça de tecido ósseo é fixada no anodo e, quando a corrente é ativada, o catodo atrai os íons de cálcio do tecido. Dessa forma, o tecido é descalcificado.



Na descalcificação eletrolítica, é importante manter a temperatura entre 30 a 45°C durante a reação. Temperaturas acima de 45°C podem causar desintegração do material. Portanto, é crucial controlar a temperatura dentro dessa faixa para garantir a descalcificação sem danificar a amostra.

A solução descalcificadora pode ser utilizada por até 8 horas após entrar em contato com o material; após esse tempo, recomenda-se sua substituição. O procedimento também pode ser realizado em temperaturas mais baixas; no entanto, o tempo de descalcificação deve ser aumentado.

Na descalcificação eletrolítica, os ossos esponjosos, com 3 a 5 mm de espessura, são descalcificados em até 45 minutos, enquanto os ossos compactos necessitam geralmente de 16 horas, em média. No entanto, um tempo mais longo na solução eletrolítica pode danificar as células do tecido.

Ao término da descalcificação, recomenda-se lavar as peças com solução de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% por 24 horas para neutralizar a peça e prevenir a formação de artefatos durante a coloração. Na sequência, as peças ósseas devem ser lavadas várias vezes em água, por período máximo de 48 horas, antes de serem submetidas à inclusão em parafina.

A desvantagem desse método é a limitação da quantidade de material que pode ser descalcificado ao mesmo tempo, além do fato de que o contato do material com o eletrodo pode danificar o tecido.

A descalcificação eletrolítica é recomendada para peças com pouca quantidade de tecido mineralizado, como, por exemplo, a caixa óssea timpânica.

Como verificar se a peça óssea foi devidamente descalcificada

Normalmente, à medida que é descalcificada, a peça tende a adquirir uma coloração amarelada e consistência macia, devendo ser manipulada com cuidado. Não é aconselhável pressionar a peça com força sob risco de deformar o material, afetando a estrutura tecidual. Mesmo que a deformação tecidual não seja percebida, ela pode ser notada durante a análise microscópica da amostra.

As peças submetidas à descalcificação não devem ser muito grandes, uma vez que peças muito grandes podem dificultar a remoção do cálcio. Recomenda-se utilizar 100 mL da solução descalcificadora para cada 0,4 g de osso.

Para verificar se o material foi devidamente descalcificado, sugere-se o uso de uma agulha bem fina. Com movimentos leves e delicados, a agulha deve ser inserida na peça para verificar o grau de mineralização do material. Notando-se “resistência” à penetração da agulha, a peça óssea deve retornar à solução descalcificadora. Não se deve forçar a penetração da agulha sob risco de causar rompimento dos tecidos da amostra. Aconselha-se penetrar a agulha mais na região periférica da peça.

É importante destacar que, para obter uma boa descalcificação, o material deve ter sido previamente bem fixado. Após a descalcificação, a peça é clivada em fragmentos menores, com 5 a 2 mm, antes de prosseguir com o processamento.

Capítulo 5

Microtomia

A **microtomia** é a etapa que se segue ao emblocamento e visa reduzir as dimensões dos fragmentos de modo a possibilitar a observação da estrutura tecidual ao microscópio. Essa etapa é realizada com o auxílio de um equipamento denominado micrótomo.

Com o micrótomo⁵³, é possível obter fatias finíssimas, designadas cortes histológicos, a partir das amostras emblocadas em parafina.

Tipos de micrótomo

Os diversos modelos de micrótomos geralmente possuem:

- a) prendedor de amostras (cassetes/blocos);
- b) dispositivo para suporte da navalha (porta navalhas);
- c) base do porta-navalhas;
- d) alavanca de fixação para a base do porta-navalhas;
- e) botão de controle para ajuste de espessura dos cortes;
- f) roda (manivela) de mão que, ao girar, movimentava o prendedor da amostra.

Existem basicamente cinco tipos de micrótomos: micrótomo rotatório, micrótomo de corrediça, micrótomo de congelamento, micrótomo frio (criostato) e ultramicrótomo.

⁵³ Diante dos diversos tipos de micrótomo, aconselhamos a leitura do manual que acompanha o equipamento antes do início da microtomia.

Micrótomo rotatório

O micrótomo rotatório (Fig. 22) é usado para confeccionar cortes de material incluído em parafina, utilizando navalhas altamente afiadas. Esse equipamento recebe essa designação porque, ao girar uma manivela (cabo da roda de mão), o prendedor universal do bloco se move no sentido vertical, subindo e descendo. A cada descida, o suporte do bloco avança de modo a cortar fatias extremamente finas.

Fig. 22: Micrótomo rotatório manual com regulação da espessura dos cortes. Os cortes variam normalmente de 5 a 6 μm de espessura. 1 = prendedor universal de cassetes; 2 = porta-navalhas, 3 = base do porta-navalhas, 4 = alavanca de fixação para base do porta-navalhas, 5 = cabo da roda de mão, 6 = roda de mão com giro suave, 7 = alavanca para ativar o freio da roda de mão.



Nesse tipo de micrótomo, a navalha permanece fixa no porta-navalhas. Com o auxílio do sistema de rotação, acionado com a roda de mão, o bloco, fixado no prendedor universal de cassete, se move

verticalmente, subindo e descendo. A cada “descida” confecciona-se um corte histológico.

Além disso, esse micrótomo possui dispositivo que permite ajustar a espessura do corte, apenas com a movimentação do botão de ajuste. Dessa forma, a cada ciclo de “subida e descida” (movimento vertical) do braço, o bloco avança na espessura ajustada. Como resultado, cortes com espessura de micrômetros são obtidos.

A espessura do corte depende da técnica de coloração a ser realizada. Rotineiramente, cortes de 5 a 6 μm são recomendados; no entanto, é importante consultar a literatura técnica para verificar a espessura recomendada.

Micrótomo de corredeira

O micrótomo de corredeira, também designado micrótomo inclinado ou deslizante, é usado para cortar blocos grandes. Esse tipo de micrótomo permite a confecção de material incluído em celoidina⁵⁴.

A celoidina, ou nitrato de celulose, é um termoplástico muito resistente, cujo ponto de fusão é de 71°C, e se solubiliza em mistura de álcool absoluto. A celoidina é usada em combinação com cânfora e óleo de mamona para endurecê-la e eliminar sua propriedade explosiva.

O micrótomo de corredeira também pode ser usado para cortar blocos de parafina ou outra resina. Nesse micrótomo, o suporte dos blocos se localiza abaixo do nível da navalha e permanece parado. O que se move é a navalha em direção ao bloco.

⁵⁴ A celoidina não é frequentemente usada como a parafina. A celoidina é recomendada para materiais com grandes dimensões ou, excepcionalmente, duros. É também recomendada para a obtenção de cortes muito espessos, geralmente com espessura acima de 15 μm .

Micrótomo de congelação

O micrótomo de congelação é utilizado para a confecção de cortes de material que foi congelado e que não foi incluído em parafina. Também é usado para cortar material que não pode ser submetido a solvente orgânico (xilol), como o xilol, que remove material de natureza lipídica⁵⁵ do tecido.

Relativamente pequeno, esse tipo de micrótomo é usado em salas de cirurgia, devido à facilidade de transporte. Durante a cirurgia, o patologista também pode estar na sala e fornecer rapidamente o diagnóstico.

O micrótomo de congelação possui conexão direta com um cilindro de CO₂. Ao ser acionado, libera CO₂ que congela rapidamente o material, enrijecendo a amostra.

O enrijecimento do material facilita a confecção de cortes na espessura desejada ao movimentar o suporte de navalha convencional. Os cortes são então coletados em lâminas de vidro e submetidos à coloração.

Micrótomo frio (criostato)

O criostato nada mais é que um micrótomo rotatório alocado no interior de uma câmara refrigerada; é utilizado para confeccionar cortes de tecidos fixados, mas que não podem ser incluídos em parafina.

O criostato segue o mesmo princípio do micrótomo de congelação, mas não usa o CO₂. Devido à refrigeração da câmara, a temperatura é mantida bastante baixa, podendo chegar a -30°C, permitindo o congelamento da amostra e a confecção de cortes finos.

⁵⁵ Os lipídeos são removidos durante o processamento para inclusão em parafina uma vez que a amostra passa pelo xilol (ver processamento).

No criostato, o material, fixado ou não, é seccionado sem necessidade de passar por agentes desidratantes ou solventes orgânicos, como o xilol. Esse procedimento é utilizado em materiais submetidos às técnicas especiais, como a técnica para identificar gorduras ou produtos temporários de reação de um corante.

Ultramicrotomo

O ultramicrotomo permite a confecção de cortes com espessura de 0,02 μm a 0,1 μm , usados para estudo ao microscópio eletrônico⁵⁶.

Existem diferentes tipos de ultramicrotomo, como o ultramicrotomo convencional (ou rotativo) e o ultramicrotomo de congelação (crio-ultramicrotomo). O ultramicrotomo convencional é utilizado para a confecção de cortes semifinos (com 0,5 a 1 μ) e ultrafinos (com 60 a 90 nm)⁵⁷ de materiais incluídos em resinas acrílicas ou epóxi (araldite, epon e spurr). A confecção desses cortes é feita com navalhas de vidro ou navalhas com fio de corte em diamante. O ultramicrotomo de congelação é utilizado para materiais que não são incluídos em resina⁵⁸.

Confecção dos cortes

Na microscopia de luz, os cortes são geralmente confeccionados com espessura que varia de 5 a 6 μm . No entanto, essa espessura pode variar conforme a técnica de coloração que será utilizada.

⁵⁶ A espessura dos cortes usados para estudo ao microscópio eletrônico tem espessura de 60-70nm (0,06-0,07 μm).

⁵⁷ 1 μm = 10⁻⁴ mm (ou 0,001 mm).

⁵⁸ Consultar a literatura especializada.

Antes da microtomia, é importante verificar a espessura recomendada pela técnica de coloração escolhida para garantir que o resultado estará de acordo com os parâmetros indicados na técnica.

Após resfriamento e solidificação da parafina, o bloco é colocado no porta-bloco do micrótomo.

Um aspecto importante da microtomia é o ângulo da navalha em relação à posição do bloco. Na confecção dos cortes, é importante ajustar o ângulo da navalha de acordo com a natureza do material. Dependendo da dureza do bloco, o ângulo da navalha deve variar entre 5 e 10 graus.

Ressalte-se que o micrótomo deve ser manuseado com movimentos contínuos e delicados, relativamente lentos, para garantir a obtenção de cortes uniformes.

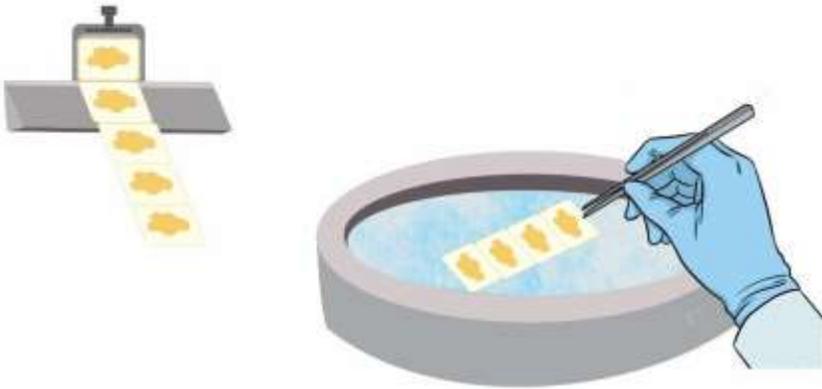
A espessura dos cortes é influenciada por diversos fatores, como a natureza do tecido, a qualidade da navalha (que está diretamente relacionada com a sua afiação), o ângulo de inclinação da navalha, a temperatura do ambiente laboratorial e a velocidade com que o manipulador gira a roda de mão (veja Fig. 20).

Para confeccionar cortes, a roda de mão é rodada com movimentos suaves para aproximar o bloco à navalha, previamente colocada no suporte de navalha. O bloco é ajustado no suporte para que a sua superfície fique paralela à superfície de corte da navalha.

Ao movimentar o cabo da roda de mão, realizam-se giros completos até que a navalha toque a superfície do bloco de modo que cortes delgados sejam obtidos. Com cuidado, continua-se a movimentar a roda de mão de modo a obter cortes delgados do espécime na espessura desejada. Essa fase inicial da microtomia em que se obtém os cortes é designada “desbaste” do bloco. No desbaste, é possível que a navalha atinja somente a parafina, sem atingir o espécime.

Assim que se atinge a amostra, continua-se girando a roda de mão com movimentos mais delicados até que se obtenha cortes contendo o espécime. É possível continuar cortando o material de modo a obter uma sequência de cortes homogêneos contendo o espécime. Essa sequência de cortes é conhecida como fita ou tênia (Fig. 23).

Fig. 23: Durante a microtomia, os cortes se mantêm aderidos, formando fitas (ou “tênias”), as quais são levadas para um banho-maria pré-aquecido a 40–45°C para distensão. Em seguida, os cortes são separados e coletados em lâminas de vidro.



Com o auxílio de uma pinça, a fita com cortes do material é transferida para um banho-maria, onde a temperatura da água deve estar entorno de 40 a 45°C. Essa temperatura auxilia na distensão dos cortes.

Durante a distensão dos cortes, podem se formar “pregas” ou dobras no material. Estas dobras podem ser removidas ainda no banho-maria usando uma pinça com ponta curva, designada pinça histológica, uma vez que essas dobras podem interferir na análise tecidual.

Após serem distendidos sobre a água, os cortes são separados com o auxílio de uma pinça e colocados em lâminas de vidro limpas.

A lâmina contendo cortes é então colocada para secar em estufa (37 a 40°C) para reforçar a adesão do corte à lâmina.

Normalmente, os cortes se aderem facilmente às lâminas. No entanto, certas técnicas, como as impregnações metálicas ou mesmo a imuno-histoquímica, os cortes tendem a se desprender das lâminas. Nesses casos, as lâminas devem ser previamente tratadas com substâncias adesivas para reforçar a adesão dos cortes às lâminas, evitando que os cortes se desprendam da lâmina durante o tratamento subsequente do material, especialmente na coloração.

Atualmente, é possível adquirir lâminas pré-tratadas com substâncias adesivas. Apesar do custo financeiro adicional, a economia de substâncias e tempo gasto no preparo das lâminas é significativa.

Preparo de lâminas com substâncias adesivas

Ao adquirir as lâminas de vidro, é recomendável priorizar lâminas previamente limpas e foram empacotadas a vácuo. No entanto, antes do uso e dependendo de como foram acondicionadas, as lâminas podem necessitar de lavagem com solução de limpeza adequada.

Recomendamos lavar as lâminas com detergente neutro de uso profissional, como o Extran MA02 da Merck⁵⁹.

⁵⁹ Extran é biodegradável e possui propriedades detergentes e emulsionantes. Quando diluído, atinge elevado poder de detergência, deixando os utensílios laboratoriais limpos e sem resíduos.

Procedimento para lavagem das lâminas com detergente

- Colocar as lâminas em um recipiente, garantindo que foram totalmente imersas em solução⁶⁰ de Extran a 2%, permanecendo nessa solução por, no mínimo, uma noite;
- Retirar as lâminas da solução e enxaguar muito bem com água corrente (água da bica);
- Enxaguar com água destilada (cerca de 10 vezes);
- Enxaguar novamente com água bidestilada (é possível deixar nessa água por algumas horas);
- Retirar as lâminas da água e colocar em suportes próprio para lâminas para secagem em estufa (50 a 60°C).

Substâncias para adesivação de lâminas

A solução a ser utilizada como adesivo para os cortes pode ser à base de **silano** (3-aminopropiltriétoxissilano, CAS⁶¹ n° 13822-56-5) ou a **poli-L-lisina** (solução aquosa de poly-L-lysine a 0,1%, CAS n° 259088-63-0).

A seguir encontra-se o procedimento para preparar lâminas adesivadas com essas substâncias.

Adesivação com silano (silanização)

Solução de silano (3-aminopropiltriétoxissilano) a 3% em acetona (PA)

⁶⁰ A solução pode ser reutilizada, mas deve ser trocada a cada 15 dias, mesmo que tenha sido pouco usada. Caso tenha sido bastante usada, O tempo de troca deve ser reduzido.

⁶¹ CAS (Chemical Abstracts Service) é uma divisão da Sociedade Americana de Química, com sede em Olhio, A CAS fornece o registro de substâncias químicas conhecidas; o número de registro é um identificador único, inconfundível e universal para uma substância química ou sua estrutura molecular quando possui várias designações.

Silano	3 mL
Acetona PA	97 mL

Atenção: É importante manipular as lâminas com luvas, pois a solução pode causar queimaduras na pele. A solução também não deve ser descartada na pia e deve ser acondicionada em frascos de vidro para descarte adequado. Recomenda-se realizar a silanização com o maior número possível de lâminas limpas no mesmo dia de preparo da solução, uma vez que a substância pode se deteriorar quando guardada ao longo do tempo.

Procedimento para silanização

- Imergir as lâminas em solução de silano a 3% por 3 a 5 minutos, agitando-as. Se preferir, é possível substituir a acetona por etanol absoluto;
- Lavar as lâminas rapidamente com dois banhos de etanol absoluto por 2 minutos (ou acetona, caso a solução tenha sido preparada em acetona);
- Lavar rapidamente em água destilada;
- Colocar as lâminas em estante de madeira e deixa-las secar durante uma noite em estufa a 60°C.

Após realização desse procedimento, as lâminas devem ser guardadas em local adequado e bem limpo, estando prontas para uso.

Adesivação com poli-L-lisina

Para preparar a solução de poli-L-lisina⁶², proceder:

Poli-L-lisina	1 mL
Água deionizada	99 mL

⁶² O trimerosal (Ethyl(2-mercaptobenzoato-(2-)-O,S) mercurate(1-) sodium) é uma substância com propriedades antissépticas e anti-fúngicas, usado como preservativo da solução.

A solução de poli-L-lisina é comercializada na concentração de 0,1%, contendo trimerosal 0,01%. Assim, a solução é utilizada na concentração final de 0,01%⁶³.

Procedimento para adesivação com poli-L-lisina

- imergir as lâminas na solução de poli-l-lisina 0,01% por 30 minutos;
- escorrer a solução e deixar as lâminas secarem em estufa a 40°C, na posição vertical e no suporte próprio para lâminas.

Dificuldades na obtenção dos cortes

A confecção de cortes histológicos não é tarefa simples e requer habilidade e treinamento especializado. A obtenção de uma fita contínua e homogênea pode ser influenciada por várias condições, tais como:

- parafina muito dura;
- temperatura ambiental muito fria;
- cortes muito espessos;
- navalha de corte pode estar sem fio (“cega”).

Durante a microtomia, os cortes eventualmente podem se encurvar devido a:

- navalha de corte sem fio (“cega”);
- superfície inferior do bloco não está paralela ao fio da navalha;
- superfície do bloco não está devidamente aparada;

⁶³ A solução é estável até 3 meses, sendo acondicionada em geladeira. Entretanto, a sua viabilidade dependerá da quantidade de lâminas que serão adesivadas com essa substância, devendo ser descartada se a solução ficar turva.

É possível também que ocorra variação na espessura dos cortes, causada por diversos motivos, tais como:

- a navalha ou o suporte de navalha não estão suficientemente firmes no micrótomo;
- o material não foi adequadamente incluído;
- o bloco de parafina não está firme no porta-bloco.

Além dos problemas mencionados, outros podem surgir durante a microtomia, como a fragmentação do tecido, o descolamento do material do bloco de parafina e a presença de espaços “vazios” ou esbranquiçados no material. Isso pode ocorrer devido a falhas que ocorreram durante o processamento, tais como:

- o álcool não foi completamente removido do material (desidratação incompleta);
- a parafina de infiltração estava muito quente, com a temperatura muito acima daquela recomendada;
- a infiltração da parafina nos tecidos não foi realizada de forma eficaz.

Um problema comum é a aderência dos cortes à navalha. Isso pode ocorrer por várias razões, incluindo:

- o fio (a superfície de corte) da navalha está sujo;
- ângulo da navalha excessivo;
- a navalha está sem fio (“cega”) e não adequada para a confecção do corte.

Acessórios para realização de corte

Na microtomia, são utilizadas navalhas reutilizáveis (navalhas convencionais) ou descartáveis (que não podem ser afiadas após o uso).

O uso de **navalhas convencionais** requer que as navalhas sejam frequentemente afiadas, utilizando um equipamento específico, designado **afiador de navalhas** (Fig. 24).

Fig. 24: As navalhas convencionais (A) duram por um período longo de tempo, mas precisam ser frequentemente amoladas com o auxílio de um afiador de navalhas (B).



As **navalhas descartáveis** têm seu uso limitado, uma vez que sua utilização depende da quantidade de cortes feitos, da qualidade da amostra e da habilidade técnica em realizar a microtomia. São extremamente afiadas e devem ser manipuladas com extremo cuidado, mas não podem ser amoladas novamente após o uso.

Capítulo 6

Coloração

Após a microtomia, os cortes obtidos são incolores e transparentes; por isso, precisam ser corados para possibilitar a visualização das estruturas teciduais e identificar seus elementos ao microscópio de luz. Para isso, os cortes são submetidos à coloração.

Existe uma variedade muito grande de técnicas histoquímicas. Algumas técnicas são seletivas e específicas para determinados componentes teciduais. No entanto, as técnicas mais usadas são aquelas que permitem a visualização da estrutura dos tecidos ao microscópio de luz, sendo comumente designadas **colorações de rotina** ou **colorações rotineiras**.

As **colorações seletivas** são aquelas que destacam um elemento específico do tecido, mas somente se as condições da técnica ou do corante forem observadas, ou seja, tais condições forem alteradas, outros elementos podem ser corados, o que pode interferir com a identificação da estrutura.

Nas **colorações específicas**, apenas o elemento tecidual com afinidade específica pelo corante é identificado. No entanto, o modo pelo qual o corante atua no tecido é motivo de controvérsia.

Para alguns autores, a coloração é considerada um fenômeno químico, enquanto outros autores afirmam que a coloração é um processo físico. Na realidade, a cor expressa pelos elementos teciduais é um somatório dos dois processos (químico e físico).

Cabe ainda notar que a cor do elemento tecidual após sua interação com o corante é um fenômeno complexo. Quando a luz incide sobre o tecido, esse absorve vários comprimentos de onda luminosa

e reflete apenas um comprimento de onda. Esse raio de luz que é refletido será o responsável pela cor da estrutura (Fig. 25).

Muitas substâncias são coloridas (expressam cor), mas nem todas as substâncias coloridas atuam como corantes. Um corante é um composto que, ao se ligar com o tecido, destaca seus elementos em uma cor específica.

Os corantes possibilitam a visualização dos tecidos com base na afinidade tintorial e no caráter ácido ou básico do elemento tecidual.

Fig. 25: As cores dos corantes e pigmentos se devem à absorção seletiva da radiação eletromagnética na faixa da luz visível. Assim, a cor visualizada é a fração da não absorvida.



A evidenciação dos elementos teciduais é obtida com o emprego de corantes. Entretanto, existem também métodos que usam metais, os quais, ao se depositarem sobre os elementos teciduais, revelam o elemento que se deseja visualizar.

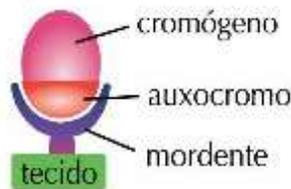
Quando se usa metais, a designação correta para se referir a esses métodos é “impregnação metálica”. É totalmente equivocado usar a designação “coloração”, pois quando o metal se deposita sobre determinado elemento tecidual, ele delinea a estrutura, identificando-a ao invés de corá-la.

Estrutura geral do corante

A molécula do corante consiste de dois componentes distintos: o **cromógeno** – porção responsável pela cor do corante e o **auxocromo** – que se liga ao substrato (Fig. 26).

Os corantes desempenham papel importante no diagnóstico histológico ao repassar sua cor para os elementos teciduais. O modo como o corante se liga aos tecidos é fundamental na compreensão da histoquímica.

Fig. 26: Representação esquemática da molécula de um corante que necessita de um mordente para haver interação do corante com os elementos teciduais. O conjunto corante-mordente constitui a laca.



Algumas substâncias, denominadas **mordentes**, são usadas para reforçar ou estabilizar a interação dos corantes com os elementos teciduais, tornando as colorações mais estáveis e duráveis. Dependendo da substância corante, alguns mordentes são adicionados à solução de corantes, formando uma **laca**⁶⁴.

Nem toda substância colorida age como corante. Existem substâncias incolores que, ao se ligarem aos elementos do tecido, modificam sua estrutura molecular e passam a expressar cor. Dessa forma, os corantes permitem a identificação de elementos específicos. Para que uma substância atue como corante, é necessário que o cromógeno se ligue ao auxocromo.

⁶⁴ Laca é o conjunto corante-mordente.

Ressalte-se que a característica do corante é determinada pela presença de determinados radicais na molécula do corante. Esses radicais conferem ao corante característica ácida (OH, COOH, SO₃H) ou básica (NH, NH₂ e SH).

Classificação dos corantes

Os corantes podem ser classificados de acordo com sua carga elétrica, que se reflete na sua afinidade por diferentes estruturas teciduais. Nesse sentido, os corantes podem ser categorizados como corantes básicos e corantes ácidos, dependendo das características da estrutura tecidual.

Os **corantes básicos** ou **catiônicos** possuem carga elétrica positiva e se ligam aos componentes teciduais com caráter ácido. As estruturas teciduais com afinidade pelo corante básico são denominadas **estruturas basófilas**. Ex.: hematoxilina (de Harris, de Delafield, dentre outras), azul de metileno.

Os **corantes ácidos** ou **aniônicos** têm carga elétrica negativa e se ligam aos componentes teciduais com caráter básico. Dessa forma, as estruturas teciduais que atraem o corante ácido são denominadas **estruturas acidófilas**. Ex.: eosina, fast green.

Há também corantes em que suas cargas, positivas e negativas, estão em equilíbrio. Esses corantes que apresentam caráter anfótero⁶⁵ são designados **corantes neutros**.

Geralmente, os corantes conferem sua própria cor aos elementos teciduais, o que é conhecido com coloração **ortocromática**. No entanto, existem corantes que, ao se combinarem com determinado

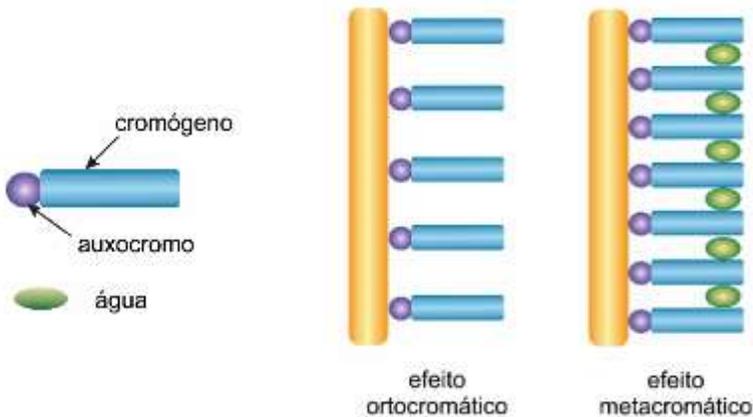
⁶⁵ A substância com caráter anfótero é aquela que, ao reagir com elementos teciduais, é capaz de agir como ácido ou base dependendo do meio. Essas substâncias podem ser moléculas, íons ou outro composto.

elemento tecidual, evidenciam o elemento em cor distinta da cor do próprio corante. Essa propriedade é designada **metacromasia**.

Se um corante é ortocromático ou metacromático depende da concentração do corante e das condições específicas de coloração (Fig. 27).

O azul de toluidina é um corante azul que pode se comportar como corante ortocromático ou promover o efeito metacromático.

Fig. 27: O efeito metacromático ocorre quando os íons do corante se posicionam próximos uns dos outros, mantendo uma distância entre si de 5 a 7 Å. Na técnica de coloração com o azul de toluidina, após a coloração, o corte deve ser coberto com uma lamínula, usando uma resina aquosa ou apenas a água, sem ser desidratado. Caso o corte seja desidratado, o efeito metacromático do corante é perdido quando a água é removida.



O efeito metacromático depende da concentração do corante, mas pode ser alterado durante a montagem de lâmina (veja montagem do corte).

Após a coloração pelo azul de toluidina a 1%, os glicoconjugados podem ser identificados (na tonalidade magenta) devido ao

efeito metacromático, desde que o material não seja desidratado e seja montado em resina sintética aquosa.

Outros corantes, como a violeta de metila, a tionina e o violeta de cresil, também podem ser usados para se obter o efeito metacromático.

Classificação das colorações

Conforme o procedimento, a ação do corante em determinada estrutura tecidual pode ocorrer de diversas maneiras. Assim, as colorações podem ser classificadas de diversas formas, incluindo a coloração simples, combinada, direta, indireta, específica, seletiva, progressiva e regressiva. Além dessas classificações, quando a coloração é realizada com uso de certos corantes sem especificidade para determinado elemento específico, ela pode ser designada como coloração de fundo.

Coloração simples: Os elementos teciduais podem ser evidenciados com o emprego de um único corante. Ex.: coloração pelo azul de metileno.

Coloração combinada: Quando dois ou mais corantes são utilizados no mesmo procedimento de coloração. Ex.: coloração pela hematoxilina e eosina; coloração por métodos tricrômicos.

Coloração direta: Quando o corante se liga diretamente aos elementos teciduais. Ex.: coloração pelo azul de toluidina ou pela eosina.

Coloração indireta: Quando o corante não é capaz de se ligar diretamente ao substrato e requer um mordente como elemento intermediário entre o corante e o substrato. Ex.: coloração pela hematoxilina.

Coloração específica: Quando o corante evidencia exclusivamente um elemento tecidual específico. Ex.: coloração pelo Oil red para evidenciação de gordura.

Coloração seletiva: Quando o corante evidencia uma estrutura tecidual, apenas se determinada condição específica esteja presente, permitindo a ligação do corante com esse elemento. Ex.: coloração pela Orceína para fibras elásticas.

Coloração progressiva: Quando o corante age lentamente até se obter o efeito desejado. Ex.: coloração pela hematoxilina de Delafield.

Coloração regressiva: Quando o tecido é supercorado e o excesso do corante é removido do tecido em etapa subsequente, geralmente com a água ou outras substâncias, tais como o álcool acetificado ou mesmo outro reagente, até que a obtenção do efeito desejado. Esse processo de remoção do excesso do corante é denominado **diferenciação**. Ex.: coloração pela hematoxilina de Harris.

Coloração de fundo: Ocorre quando o corante não revela especificidade para nenhum elemento tecidual em particular, sendo utilizado em conjunto com uma coloração específica. Ex.: solução de verde luz a 1% usada como corante de fundo após a coloração pela Orceína.

Afinidade tintorial

Para a visualização da estrutura de determinado tecido ou órgão, comumente se utiliza a técnica denominada “dupla coloração”. Nessa coloração, dois corantes são usados: um corante básico (por exemplo, a hematoxilina) e um corante ácido (por exemplo, a eosina). Dessa forma, é possível identificar tanto as estruturas basófilas quanto as acidófilas.

Os elementos teciduais com características ácidas atraem os corantes básicos, sendo esses elementos designados **estruturas basófilas**.

Os elementos teciduais com características predominantemente básicas, que atraem os corantes ácidos, são designados **estruturas acidófilas**. No entanto, dependendo do estado funcional do órgão, as células e a matriz extracelular podem se revelar como estruturas acidófilas ou basófilas. Essas considerações são melhor exploradas nos livros didáticos de histologia.

É importante destacar que, caso a técnica de coloração não especifique a espessura dos cortes de material incluído em parafina, estes devem ser confeccionados com espessura de 5 a 6 μm .

Coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE)

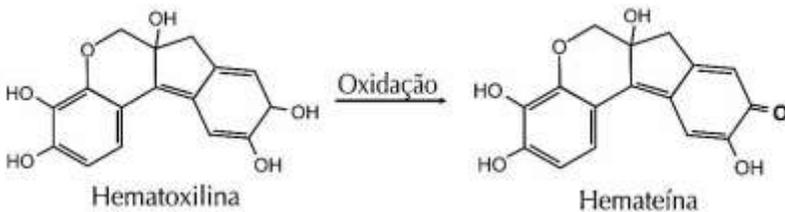
Na coloração pela hematoxilina e eosina (HE), os cortes são submetidos a dois corantes (hematoxilina e eosina) em momentos distintos. Essa técnica de coloração é comumente empregada para a visualização da morfologia geral dos órgãos e tecidos.

Embora a coloração pela HE não identifique elementos específicos, o diagnóstico é realizado por meio da análise da sua estruturação e da afinidade tintorial dos seus elementos teciduais⁶⁶.

Hematoxilina

A hematoxilina é um corante natural e com baixa afinidade tecidual. Para atuar como corante, a hematoxilina precisa ser oxidada, convertendo-se em hemateína⁶⁷ (Fig. 28).

Fig. 28: Ao ser oxidada, a hematoxilina é convertida à hemateína.



A oxidação da hematoxilina pode ocorrer naturalmente (mantendo-se a solução repousar por dias a semanas) ou ser acelerada pela adição de agentes oxidantes na solução, como o óxido de mercúrio, permanganato de potássio ou iodato de sódio.

A hematoxilina (C.I.⁶⁸ 75290), em solução (ou seja, oxidada à hemateína), age como um corante básico. No entanto, para ocorrer a ligação da hematoxilina aos elementos teciduais, é necessário um mordente. Assim, as estruturas coradas pela solução de hematoxilina

⁶⁶ Para melhor compreensão, recomenda-se leitura complementar em livro sobre a Histologia dos Tecidos e dos Sistemas.

⁶⁷ A hematoxilina comercialmente disponível é, na verdade, na forma de hemateína.

⁶⁸ C.I. (Índice Internacional de cores, Colour Index International) é um banco de dados utilizado como referência e mantido pela Society of Dyers and Colourists e pela American Association of Textile Chemists and Colorists.

são caracterizadas como estruturas basófilas, como, por exemplo, o núcleo.

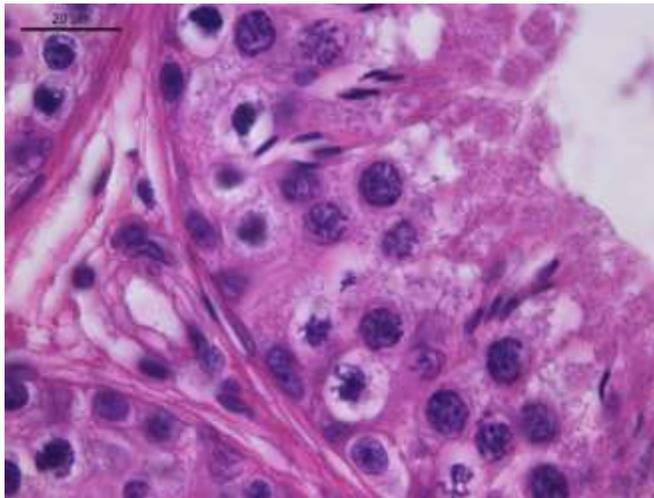
Para destacar os elementos basófilos no tecido corado pela hematoxilina, comumente se utiliza a eosina, um corante com características ácidas. Os elementos teciduais com afinidade pela eosina são caracterizados como estruturas acidófilas, como, por exemplo, a matriz extracelular e o citoplasma da maioria das células.

Dessa forma, em um tecido corado pela hematoxilina e eosina, o núcleo é corado pela hematoxilina (na tonalidade azulada) e o citoplasma é corado pela eosina (na tonalidade rosa) (Fig. 29).

Fig. 29: Nesse material, os núcleos são evidenciados na tonalidade azul-arroxeadada, enquanto o citoplasma e a matriz extracelular são corados em rosa. Coloração pela Hematoxilina de Harris e solução alcoólica de eosina.

Coloração: hematoxilina e eosina (HE).

Material: testículo de bovino. Barra = 20 μm .



Existem diversos tipos de soluções de hematoxilina, como a hematoxilina de Harris, de Delafield, de Erlich e de Mayer. A diferença entre elas está na composição dos seus reagentes, no método

de preparo e na adição de mordentes à solução. Ressalte-se que é importante seguir rigorosamente as orientações de preparo para obter uma solução de qualidade. Recomendamos a utilização da solução de hematoxilina de Harris ao seguir o protocolo básico de coloração pela Hematoxilina-eosina. Entretanto, outros tipos de hematoxilina também podem fornecer bons resultados.

ATENÇÃO: Independentemente da solução de hematoxilina usada, é fundamental filtrar a solução antes da coloração. A filtragem permite remover precipitados à base de óxido de mercúrio (Fig. 30).

Fig. 30: Filtração da solução de hematoxilina. Para filtrar a solução, utilizar um pouco de algodão envolto em gaze (a) para evitar que as fibras de algodão se soltem e contaminem a solução corante. Colocar esse conjunto (algodão envolto por gaze) sobre a abertura do funil de vidro (b) e proceda com a filtragem da hematoxilina. Note que resíduos de óxido de mercúrio (precipitados brilhantes) são retidos (c). É importante ressaltar que a solução deve ser sempre filtrada antes da coloração.



Hematoxilina: tipos

Algumas hematoxilinas, como a de Harris, são comumente usadas na rotina histopatológica, enquanto outras são recomendadas para estudos mais específicos. As soluções mais conhecidas são:

- 1) Hematoxilina de Harris
- 2) Hematoxilina de Mayer
- 3) Hematoxilina de Delafield
- 4) Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory
- 5) Hematoxilina férrica de Weigert
- 6) Hematoxilina férrica de Regaud

Hematoxilina de Harris

Apesar de ser relativamente fácil de preparar, é essencial ter cuidado e atenção no seu preparo. É importante seguir as instruções de preparo e uso das vidrarias, além de respeitar a sequência de adição das substâncias à solução.

Hematoxilina	5g
Etanol 95%	50 mL
Sulfato de amônio e alumínio	100 g
Água destilada	1000 mL
Óxido de amarelo de mercúrio	2,5 g

Modo de preparo: Em um becker, preferencialmente de 100 mL, dissolver a hematoxilina no álcool 95% (solução A). Em outro recipiente (preferencialmente um erlenmeyer com capacidade de 1000 mL), dissolver o sulfato de amônio e alumínio em 500 mL de água destilada com o auxílio do calor (solução B). Aquecer a solução B e, quando estiver próxima à ebulição, adicionar cuidadosamente a solução A. Em seguida, levar a mistura à ebulição o mais rapidamente quanto possível, mas sem deixar ferver.

ATENÇÃO: usar uma luva protetora de calor para segurar o erlenmeyer e agitar a solução.

Assim que a mistura começar a entrar em ebulição, retirar a solução da placa aquecedora e adicionar o óxido de mercúrio. Agitar bem a mistura. Em seguida, adicionar o restante da água destilada (cerca de 500 mL). Para resfriar a solução, colocar o

erlenmeyer com a solução corante em um recipiente com água fria. Após o resfriamento, filtrar e armazenar a solução em frasco escuro neutro. Não esquecer de etiquetar o frasco, indicando preferencialmente a data de preparo.

Hematoxilina-Alúmen de Mayer

Hematoxilina	1g
Etanol absoluto	10 mL
Iodato de sódio	0,2 g
Alúmen de potássio ou amônia	50 g
Ácido cítrico	1 g
Hidrato de cloral	50g
Água destilada	1000 mL

Modo de preparo: Há duas maneiras de preparar a hematoxilina de Mayer.

1) Dissolver o alúmen de potássio ou amônia em água fria; em seguida, adicione a hematoxilina e, depois, o iodato de sódio, o ácido cítrico e o hidrato de cloral. Agite continuamente após cada adição até dissolver completamente os componentes. A cor final da solução deve ser vermelho-violeta e se mantém estável por meses⁶⁹.

2) Dissolver o alúmen de potássio ou amônia em água destilada previamente aquecida (sem ferver). Em outro recipiente, dissolver o hidrato de cloral em 500 mL de água destilada e, em seguida, adicionar o ácido cítrico e o iodato de sódio. Dissolver a hematoxilina em 10 mL de álcool absoluto em outra vidraria (becker). Misturar as 3 soluções e, em seguida, acondicionar em frasco escuro e protegido da luz. O tempo de coloração pode variar de 1 a 10 minutos dependendo do tecido e da quantidade de vezes que a solução foi usada. Não há necessidade de realizar diferenciação.

⁶⁹ Note que nesse preparo, o etanol não é adicionado (Fernandes, 1943).

Hematoxilina de Delafield

Solução A

Hematoxilina	1g
Etanol absoluto	10 mL

Solução B

Alúmen de potássio ou amônia	60 g
Etanol absoluto	600 mL

Solução C

Glicérol ou glicerina	160 mL
Etanol absoluto	150 mL

Modo de preparo: Preparar separadamente as soluções A, B e C. Misturar as soluções A e B e deixar em repouso por 24 horas. Após esse período, filtrar a mistura e, em seguida, adicionar a solução C. Deixar amadurecer⁷⁰ por cerca de um mês.

Hematoxilina fosfotúngstica de Mallory

Hematoxilina	0,1g
Ácido fosfotúngstico	2 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Misturar a hematoxilina e o ácido fosfotúngstico em água destilada, em temperatura ambiente. O amadurecimento da solução necessita algumas semanas. Para acelerar o processo, adicionar 0,2 mL de água oxigenada 15 volumes à solução. A solução estará pronta para uso em 2 ou 3 dias. Filtrar antes do uso. A solução pode ser conservada por meses. O tempo de coloração varia de 12 a 24 horas.

⁷⁰ Amadurecer, nesse contexto, significa o tempo necessário para que ocorra a oxidação da hematoxilina; recorde que a hemateína é o produto de oxidação da hematoxilina que, na realidade, se liga ao tecido.

Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A (deixar amadurecer por, pelo menos, 8 dias; pode ser guardada por 3 anos).

Hematoxilina	1g
Etanol absoluto	100 mL

Solução B

Cloreto férrico	1,2 g
Água destilada	99 mL
Ácido clorídrico concentrado	1 mL

Modo de preparo: Misturar a solução A com a solução B, em partes iguais. A mistura revela uma coloração violeta escura e deve ser preparada antes do uso; pode ser armazenada por até 2 semanas se acondicionada a 4°C. Filtrar antes do uso. Para corar com a hematoxilina férrica de Weigert, recomenda-se que o material tenha sido fixado pelo líquido de Bouin e o tempo de coloração varia de 20 a 30 minutos.

Hematoxilina férrica de Regaud

Hematoxilina	1g
Etanol absoluto	10 mL
Glicerina	10 mL
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Em água destilada previamente aquecida, dissolver a hematoxilina. Deixar a solução esfriar, filtrar e juntar o álcool e a glicerina⁷¹. A solução está pronta para uso após alguns dias. Filtrar antes do uso.

⁷¹ Segundo Fernandes (1943), o álcool e a glicerina retardam a oxidação da hemateína.

Eosina

A eosina é um derivado artificial da bromofluoresceína, na forma de um sal de sódio, e não requer mordente para se ligar às estruturas teciduais. Existem dois compostos muito semelhantes designados como **eosina**: a eosina Y (C.I. 45380; derivada tetrabromato de fluoresceína) e a eosina B (C.I. 45400; derivada da dibromodinitro de fluoresceína).

A eosina Y (C.I. 45380), também conhecida como eosina amarelada, é a mais utilizada. É solúvel em água e em álcool, podendo ser usada tanto em solução aquosa quanto alcoólica. A adição de ácido acético à solução de eosina acentua a coloração.

Solução aquosa de eosina

Solução estoque

Eosina Y	1 g
Água destilada	10 mL

Modo de preparo: Em um becker, dissolver a eosina em água destilada e adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial. Estocar em temperatura ambiente.

Solução de uso

Solução estoque de eosina	1 parte
Álcool 80%	3 partes

Modo de preparo: Após juntar as duas soluções, adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial.

Solução alcoólica de eosina

Solução estoque

Eosina Y	1 g
Água destilada	20 mL
Etanol 95%	80 mL

Solução de uso

Solução estoque de eosina	1 parte
Etanol 80%	3 partes

Para obter uma tonalidade mais acentuada da cor do corante no tecido, adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução.

Solução alcoólica de eosina-floxina

Solução estoque (eosina)

Eosina Y	1 g
Água destilada	100 mL

Solução estoque (floxina B; C.I. 45410)

Floxina B	1 g
Água destilada	100 mL

Solução de uso

Solução estoque de eosina	10 mL
Solução estoque de floxina	1 mL
Etanol 95%	78 mL
Ácido acético glacial	0,4 mL

ATENÇÃO: A literatura recomenda a troca semanal da solução de eosina-floxina. No entanto, sugerimos realizar um teste antes de realizar a troca da solução para verificar se a solução continua em condições adequadas de uso.

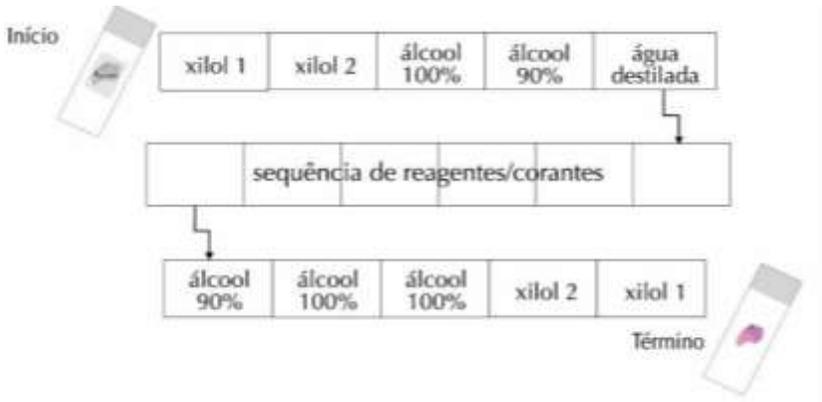
Organização dos reagentes para a coloração

Na realização das diversas colorações, é importante organizar os reagentes (soluções/corantes) em uma “bateria de coloração”, de modo que a transferência das lâminas de um recipiente de vidro (borrel ou cuba) para o seguinte seja feita de modo a evitar desperdício e contaminação das soluções (Fig. 31).

Na rotina laboratorial, a sequência dos recipientes (borrel ou cuba) com os reagentes e os corantes é denominada “bateria de coloração”. É importante destacar que, para realizar coloração da amostra, a parafina deve ser removida, o que é feito com o auxílio do xilol⁷².

Fig. 31: Sequência de reagentes na bateria de coloração.

Após o xilol, o álcool é utilizado na concentração de 100%. Recomenda-se que, antes de iniciar a coloração, o álcool seja trocado para garantir a remoção total do xilol. Também é importante assegurar a remoção total da água após a amostra passar pela “sequência de reagentes/corantes”, antes da montagem (consulte meios de montagem). A remoção total da água é feita com duas passagens em álcool 100%, o qual deve ser trocado antes do início da coloração, uma vez que a própria umidade do ar atmosférico pode alterar a concentração do álcool.



Após a remoção da parafina, o tecido fica impregnado com xilol. Como o xilol não é miscível com as soluções corantes⁷³, é necessário removê-lo. A remoção do xilol da intimidade do tecido é feita utilizando concentrações decrescentes, ou seja, o xilol é removido e a

⁷² Antigamente, se utilizava toluol; entretanto, deve-se evitar por ser muito tóxico.

⁷³ A maioria dos corantes é usualmente dissolvido em álcool ou água.

água é introduzida no material, pois as soluções de corantes são aquosas ou alcoólicas.

No caso dos corantes aquosos, o corte é hidratado até chegar à água destilada. Por outro lado, a coloração da amostra com corantes alcoólicos, a sequência de álcool (na hidratação) deve chegar até a concentração do álcool em que o corante foi preparado, não havendo a necessidade de se lavar a lâmina em água destilada.

Métodos gerais de coloração

Coloração pela Hematoxilina-Eosina (Lillie e Fullmer 1976)

Na coloração pela hematoxilina-eosina, o corte histológico é submetido a uma sequência de reagentes/corantes para a evidenciação dos elementos teciduais ao microscópio de luz.

- 1) desparafinizar (2 passagens em xilol);
- 2) hidratar (etanol 100%, etanol 90%, etanol 70% e água destilada);
- 3) corar pela hematoxilina (sugere-se realizar um teste para verificar o tempo em que a amostra deve permanecer na solução corante. O tempo de coloração varia conforme o tipo de hematoxilina e a frequência de uso);
- 4) lavar em água corrente (até 20 minutos);
- 5) lavar em água destilada;
- 6) corar pela eosina;
- 7) desidratar em etanol (70%, 90% e duas passagens em 100%);
- 8) diafanizar (2 passagens em xilol);
- 9) montar usando resina.

A coloração com alguns tipos de hematoxilina, como a hematoxilina férrica de Regaud, requer reagentes específicos. Nesse caso, deve-se realizar a seguinte sequência:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) passar na solução de alúmen de ferro a 5% durante 12 horas à temperatura ambiente, ou por 30 minutos em estufa a 56°C;
- 3) corar com a hematoxilina (sugere-se testar o tempo adequado para o material);
- 4) lavar rapidamente em etanol 95%;
- 5) diferenciar em solução alcoólica saturada de ácido pícrico; a diferenciação pode ser interrompida com água destilada, observando o material ao microscópio;
- 6) lavar em água corrente,
- 7) coloração de fundo (opcional);
- 8) desidratar, diafanizar e montar.

Além da coloração pela hematoxilina-eosina, há muitas outras técnicas de colorações utilizadas na rotina laboratorial, como os métodos tricrômicos.

Este livro não tem a intenção de apresentar todos os métodos de coloração, mas apenas os métodos mais usuais. Outras técnicas também podem ser encontradas em revistas científicas nacionais e internacionais especializadas em técnicas histoquímicas.

Independentemente do método de coloração escolhido, os passos iniciais e finais permanecem praticamente o mesmo, variando apenas a sequência de reagentes para cada coloração.

Tricrômico de Gömöri (Gömöri 1950)

Mistura de Gömöri

Cromotrope 2R (C.I. 16570)	0,6 g
Fast green FCF (C.I. 42053)	0,3 g
Ácido acético	1 mL
Ácido fosfotúngstico	0,8 g
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela hematoxilina (recomenda-se a hematoxilina de Harris. O tempo de coloração varia conforme a frequência de uso da solução);
- 3) lavar em água corrente;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) corar pela mistura de Gömöri por 15 minutos;
- 6) lavar em solução de água acetificada (solução aquosa de ácido acético 0,5%);
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras musculares: vermelho-escuro

Matriz extracelular do tecido conjuntivo propriamente dito: verde

Núcleos: azul

Citoplasma de células epiteliais: avermelhado

Hemácias: vermelho

Tricrômico de Mallory (Mallory 1905)

Mistura de Mallory

Solução A: solução aquosa de fucsina ácida a 1%

Solução B: solução aquosa de ácido fosfomolibdico 1%

Solução C: Orange G e azul de metileno

Orange G (C.I. 16230)	2 g
Azul de metileno (C.I. 52015)	0,5 g
Ácido oxálico	2 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Dissolver o orange G em água destilada; adicionar o azul de metileno e, em seguida, o ácido oxálico.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução A por 2 minutos;
- 3) lavar em água destilada;
- 4) corar pela solução B por 2 minutos;
- 5) lavar em água destilada;
- 6) corar pela solução C por 30 minutos;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras colagenosas: azul
 Queratina: amarelo-avermelhado
 Hemácias: vermelha

Tricrômico de Masson (Leong 1996)

Solução de fucsina ácida (C.I. 42685) – escarlate de Bierbric (C.I. 26905)

Solução aquosa de Biebrich scarlet a 1%	90 mL
Solução aquosa de fucsina ácida a 1%	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico

Ácido fosfotúngstico	2,5 g
Ácido fosfomolibdico	2,5 g
Água destilada	100 mL

Solução de solução de azul de anilina 2,5%

Azul de anilina (C.I. 42755)	2,5 g
Ácido acético glacial	2 mL
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) colocar no líquido de Bouin por 1 hora, à 56°C (se fixados em formalina⁷⁴, deixar *overnight* à temperatura ambiente);
- 3) deixar esfriar por 1 minuto, se a amostra passou no líquido de Bouin;
- 4) lavar em água corrente até que os cortes fiquem claros;
- 5) lavar em água destilada;
- 6) corar pela hematoxilina férrica de Weigert;
- 3) lavar em água corrente por 10 minutos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) corar pela solução de escarlate de Bierbrich por 5 minutos;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) diferenciar na solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico de 10 a 30 minutos;
- 8) contracorar com a solução de azul de anilina 2,5% de 5 a 10 minutos;
- 9) lavar em água destilada;
- 10) diferenciar com a solução de ácido acético a 1% de 3 a 5 minutos;
- 11) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Núcleos: preto

Músculo, citoplasma, queratina: vermelho

Colágeno: azul

Hemácias: vermelha

⁷⁴ Caso o material tenha sido fixado com o líquido de Bouin, essa etapa não é necessária.

Métodos especiais de coloração

Há uma grande variedade de métodos de coloração utilizados para identificar elementos específicos dos tecidos, sendo designados métodos especiais.

Este livro não tem a intenção de abordar todos os métodos especiais de coloração, o que seria impraticável. Por essa razão, apresentamos os métodos histoquímicos especiais mais usuais.

Método de Van Gieson (Mallory 1938)

Solução de Van Gieson

Solução aquosa de fucsina ácida (C.I. 42685) 1% 5 mL

Solução aquosa saturada de ácido pícrico 95 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela hematoxilina de Harris;
- 3) lavar em água corrente;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) corar pela solução de Van Gieson⁷⁵ de 1 a 3 minutos;
- 6) lavar em água destilada (lavagem rápida);
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras de colágeno: vermelho

Queratina: amarela

Célula muscular: amarela

⁷⁵ Leong (1996) recomenda filtrar a solução antes do uso.

Coloração pelo picrossírus red (Sweat et al. 1964, adaptado)

O método de coloração pelo picrossírus red é indicado para visualizar as fibras de colágeno ao microscópio de luz de campo claro. Ao microscópio de luz polarizada, essa técnica é empregada para observar o arranjo das fibras de colágeno no tecido.

Solução do picrossírus red 1%

Sírius red F3B (direct red 80; C.I. 35780)	1g
Solução aquosa saturada de ácido pícrico	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) colocar na solução do picrossírus red 1% por 1 hora;
- 3) lavar em solução de ácido clorídrico 0,01N, por 2 minutos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) corar pela hematoxilina;
- 6) lavar em água corrente;
- 7) lavar em água destilada;
- 8) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras de colágeno: em vermelho (quando o material é observado ao microscópio de luz de campo claro).

Ao analisar o material ao microscópio de luz polarizada, é possível visualizar o arranjo das fibras de colágeno no tecido, mas não é possível utilizar a coloração das fibras para diferenciar com o tipo de colágeno. Sob luz polarizada, com o fundo escuro, é possível visualizar:

Fibras vermelhas fortemente birrefringentes: fibras de colágeno em arranjo denso.

Fibras verde-alaranjadas fracamente birrefringentes: fibras de colágeno em arranjo frouxo.

Coloração seletiva pela Orceína (Henwood 2002) para identificação de fibras elásticas

Solução de Orceína 1%

Orceína (C.I. Natural red 28 no. 1386)	1g
Álcool etílico 70%	100 mL

Modo de preparo: Dissolver a Orceína em álcool 70% aquecendo até 60°C. Deixar esfriar a solução do corante e adicionar 1 mL de HCl concentrado.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar até álcool 70%;
- 2) passar em solução acetificada de álcool 70% (1 mL de ácido clorídrico para cada 100 mL de álcool);
- 3) corar pela Orceína⁷⁶ (em estufa à 60°C) por 30 minutos;
- 4) passar em solução acetificada de álcool 70%;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) contracorar com solução aquosa de light green 1% em solução aquosa de ácido acético a 1% por 3 minutos;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras elásticas: marrom

Coloração simultânea com Orceína e picrossirius red (Valdiero et al. 2019) para identificação de fibras elásticas e fibras colágenas

Soluções:

Solução de Orceína 1%

Orceína (C.I. Natural red 28 no. 1386)	1g
Álcool etílico 70%	100 mL

⁷⁶ Aquecer previamente a solução e a coloração também ocorre em estufa.

Solução do picrossírus red

Sírius red F3B (direct red 80; C.I. 35780)	1g
Solução aquosa saturada de ácido pícrico	100 mL

Solução álcool-ácido

Álcool 70%	100 mL
Ácido clorídrico PA	1 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar até álcool 70%;
- 2) passar solução de Orceína por 30 minutos à 60°C, em estufa;
- 3) diferenciação em solução de álcool-ácido por 10 segundos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) colocar na solução de picrossírus red por 1 hora;
- 6) diferenciar em solução aquosa de ácido clorídrico 0,1N por 2 minutos;
- 7) passar em solução acetificada de álcool 70%;
- 8) contraporar com solução aquosa de light green 1% em solução aquosa de ácido acético a 1% por 3 minutos;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras elásticas: marrom

Fibras de colágeno (em campo claro): vermelho

Fibras de colágeno (sob luz polarizada): verde-alaranjado fracamente birrefringente (arranjo frouxo), vermelho fortemente birrefringente (arranjo compacto)

Método de Weigert (Weigert 1898, apud Behmer et al. 1976) para identificação de fibras elásticas

Solução de Weigert

Fucsina básica (C.I. 42510)	2 g
Resorcina (CAS ⁷⁷ n° 108-46-3)	4 g

⁷⁷ CAS é um número de registro exclusivo para uma substância no banco de dados do Chemical Abstracts Service).

Água destilada 200 mL

Modo de preparo: Diluir os componentes em água destilada. Aquecer até a solução até que a mesma entre em ebulição. Adicionar 25 mL de cloreto férrico a 30% e deixar ferver por mais 5 minutos. Esfriar a solução e filtrá-la usando papel filtro. Desprezar o líquido filtrado. Colocar o precipitado, retido no papel filtro, em um becker de 500 mL e adicionar 200 mL de álcool 95%. Aquecer cuidadosamente a solução até que o precipitado dissolva. Retirar do calor e remover o papel filtro da solução com o auxílio de uma pinça. Depois da solução esfriar naturalmente, adicione 4 mL de ácido clorídrico. Colocar a solução em uma proveta de 250 mL e elevar ao volume final de 200 mL com álcool 95%. Guardar em um vidro, preferencialmente âmbar, etiquetar o frasco e guardar a solução em geladeira.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução de Weigert por 1 hora;
- 3) lavar em álcool etílico 95%;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) contraporar com solução corante de fundo;
- 6) desidratar, diafanizar e montar.

Resultado:

Fibras elásticas: preto

Método de hematoxilina férrica (Verhoeff 1908)

Soluções

Solução de hematoxilina férrica

Hematoxilina	5 g
Etanol 100%	100 mL

Modo de preparo: Dissolver em calor brando e filtrar.

Solução de lugol

Iodeto de potássio	2 g
Iodo	1 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Dissolver primeiro o iodeto de potássio em água destilada, depois adicionar o iodo.

Solução aquosa de cloreto férrico a 10%

Solução aquosa de cloreto férrico a 2%

Solução de uso:

Solução de hematoxilina	60 mL
Solução de lugol	25 mL
Solução de cloreto férrico a 10%	25 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução de hematoxilina férrica por 1 hora;
- 3) lavar em água destilada para remover o excesso do corante;
- 4) diferenciar os cortes na solução de cloreto férrico 2% por alguns segundos;
- 5) lavar em água destilada por 5 minutos;
- 5) contraporar o corte com uma solução de “corante de fundo”;
- 6) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras elásticas: preto

Núcleos: azul-escuro

Atenção: É importante ressaltar que alguns aspectos das técnicas para detecção das fibras do sistema elástico (fibras elásticas, fibras elauínicas e fibras oxitalânicas). Para diferenciá-las em microscopia de luz, os cortes são oxidados previamente, utilizando a solução de oxona⁷⁸ (monopersulfato de potássio) a 10%, antes da

⁷⁸ Pode ser substituída pelo ácido peracético.

antes da solução corante. Para diferenciar as fibras do sistema elástico, veja o quadro a seguir.

		Fibra elástica	Fibra elauínica	Fibra oxitalânica
Orceína	sem oxidação prévia	+	-	-
	com oxidação prévia	+	+	+
Weigert	sem oxidação prévia	+	+	-
	com oxidação prévia	+	+	+
Verhoeff	sem oxidação prévia	+	-	-
	com oxidação prévia	+	-	-

Método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS) (McManus 1946⁷⁹) para identificar glicoconjugados neutros

Soluções:

Solução aquosa de ácido periódico a 1%

Reagente de Schiff

Fucsina básica (C.I. 42510)	1 g
Água destilada	200 mL
Ácido clorídrico 1N	20 mL
Metabissulfito de potássio ⁸⁰	2g

Modo de preparo: Em um becker de 250 mL, ferver 100 mL de água destilada até o borbulhamento. Retirar o becker da placa aquecedora e, em seguida, dissolver a fucsina básica⁸¹. Agitar bem a solução por 5 minutos e adicionar o restante de água destilada. Deixar a solução estriar. Quando a solução atingir a temperatura de 60°C, adicionar o metabissulfito e, em seguida, o ácido clorídrico.

⁷⁹ Preparo do reagente de Schiff de acordo com Lillie e Fulmmer (1976)

⁸⁰ Pode substituir por bissulfito de sódio, bissulfito de potássio ou metabissulfito de sódio.

⁸¹ A fucsina básica é uma mistura de rosalina e pararosanilina.

Deixar a solução em temperatura ambiente, de 18 a 24 horas, no escuro, para descorar. Se a solução ainda não estiver transparente após ser removida do escuro, adicionar 2g de carvão ativado e agitar a solução vigorosamente por 1 minuto. Em seguida, filtrar a solução em papel filtro, utilizando um funil de vidro. O líquido filtrado deve ser transparente e armazenado em vidro âmbar escuro na geladeira.

ATENÇÃO: toda a vidraria usada deve estar extremamente limpa, sob risco da solução não corar devidamente o material.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) oxidar os cortes com solução aquosa de ácido periódico 1% de 5 a 10 minutos;
- 3) lavar em água destilada;
- 4) colocar no reagente de Schiff de 5 a 10 minutos⁸²;
- 5) lavar em água corrente por 10 minutos;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) corar pela hematoxilina (metade do tempo usual);
- 8) lavar em água corrente;
- 9) lavar em água destilada;
- 10) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Glicoconjugados neutros: magenta

Camada reticular da membrana basal, glicogênio, muco, amiloide, coloide da tireoide: magenta

⁸² De acordo com as vezes que a solução foi usada.

Método do Alcian blue⁸³ (AB) pH 2,5 (Scott e Dorling 1965) para identificar glicoconjugados ácidos sulfatados e carboxilados

Solução de AB

Alcian blue (C.I. 74240)	1 g
Ácido acético 3%	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) passar na solução aquosa de ácido acético 3%;
- 3) corar pela solução de AB (pH 2,5) por 30 minutos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) contraporar o corte usando nuclear fast red ou safranina O;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Glicoconjugados ácidos sulfatados e carboxilados: azul
 Núcleo, citoplasma: avermelhados

Método do Alcian blue (AB) pH 1,0 (Scott e Dorling 1965) para identificar glicoconjugados ácidos sulfatados

Solução de AB

Alcian blue (C.I. 74240)	1 g
Ácido clorídrico 1N	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) passar na solução aquosa de ácido clorídrico 1N;
- 3) corar pela solução de AB (pH 1,0) por 30 minutos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) contraporar pelo nuclear fast red ou safranina O;

⁸³ Para obter os mesmos resultados obtidos por Scott e Dorling 1965 ao utilizar AB a 1%, adquirir o AB disponibilizado pela empresa SERVA. Se utilizar o AB adquirido da empresa Sigma, prepare a solução de AB na concentração de 0,1%.

- 6) lavar em água destilada;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Glicoconjugados ácidos sulfatados: azul
Núcleo, citoplasma: avermelhados

Método do Alcian blue (AB) pH 2,5 + PAS (Mowry 1956) para identificar glicoconjugados ácidos neutros

Soluções:

Solução aquosa de ácido periódico 1%
Reagente de Schiff
Solução de Alcian blue (AB) 1% em ácido acético 3%pH 2,5

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) passar na solução de ácido acético 1%;
- 3) corar pela solução de AB pH 2,5 por 30 minutos;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) tratar pelo ácido periódico;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) colocar na reagente de Schiff por 10 minutos;
- 8) lavar em água destilada.
- 9) corar pela hematoxilina;
- 10) lavar em água corrente;
- 11) lavar em água destilada;
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Glicoconjugados ácidos: azul intenso
Glicoconjugados neutros: magenta
Mistura de glicoconjugados ácidos e neutros: azul-púrpura
Núcleo: Azul-claro

Coloração do Paraldeído-Fucsina (PAF) (Trindade et al. 1998)

Soluções:

Solução de oxidação

Permanganato de potássio 2,5%	30 mL
Ácido sulfúrico 5%	30 mL
Água destilada	160 mL

Solução de aldeído-fucsina

Fucsina básica	1 g
Ácido clorídrico	2 mL
Paraldeído	1 mL
Água destilada	200 mL

Modo de preparo: Dissolver a fucsina básica em água destilada até a fervura; em seguida, esfriar a solução até chegar à temperatura ambiente e, em seguida, adicionar o ácido clorídrico e o paraldeído. Deixar a solução descansar por 24 horas ou até a solução apresentar a coloração roxa-violácea. Filtrar e desprezar o líquido. Lavar o resíduo com água destilada e secar o papel filtro em estufa a 60°C. Separar o precipitado.

Solução de aldeído-fucsina

Aldeído-fucsina	5 g
Álcool 75%	100 mL
Ácido clorídrico	0,5 mL

Modo de preparo: Dissolver o precipitado (aldeído-fucsina) em álcool e o ácido clorídrico; deixar dissolver overnight (a solução é estável em até 2 anos).

Mistura de Halmi (modificada)

Fast green FCF (C.I. 42053)	0,2 g
Orange G (C.I. 16230)	1 g
Ácido fosfomolíbico	0,5 g
Água destilada	100 mL
Ácido acético glacial	1 mL

Modo de preparo: Dissolver o fast green e o orange G em água destilada; em seguida, adicionar o ácido fosfomolibdico e o ácido acético.

Hematoxilina de Weigert

Solução de nuclear fast red 1% (corante de fundo)

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) oxidar os cortes com a solução de oxidação por 15 minutos;
- 3) lavar em água destilada;
- 4) colocar na solução de ácido oxálico 3%, de 5 a 20 minutos;
- 5) lavar em água corrente;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) corar pela solução de aldeído-fucsina por 5 minutos;
- 8) lavar em álcool 95%;
- 9) lavar em álcool 70%;
- 10) corar com a hematoxilina de Weigert por 2 minutos;
- 11) lavar em água destilada;
- 12) contracorar com solução de nuclear fast red por 5 segundos;
- 13) lavar em água destilada;
- 14) contracorar com a mistura de Halmi, de 1 a 2 minutos;
- 15) lavar em álcool 95% e em álcool absoluto;
- 16) diafanizar e montar.

Resultados:

Núcleo: vermelho

Citoplasma: verde, violeta ou laranja

Queratina: amarelada

Fibras elásticas: violeta

Fibras de colágeno: verde

Hemácias: laranja

Mucina e grânulos de mastócitos: violeta

Células musculares: amarelo

Métodos de Violeta de cresil (de Vogt) (Leong 1996) para substância de Nissl

Soluções:

Solução estoque de cresil violeta a 2%

Violeta de Cresil (CAS 18472-89-4)	2 g
Água destilada	100 mL

Solução tampão de acetato de sódio

Acetato de sódio	2 g
Água destilada	1000 mL
Ácido acético glacial	3 mL

Solução de uso de violeta de cresil:

Solução estoque de cresil violeta a 2%	1 mL
Solução tampão de acetato de sódio	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e passar a lâmina em dois banhos com etanol absoluto;
- 2) deixar no segundo álcool absoluto por 2 horas;
- 3) corar pela solução de uso de violeta de cresil de 40 a 60 minutos;
- 4) diferenciar rapidamente em álcool 95%;
- 5) desidratar e montar.

Resultados:

Substância de Nissl: púrpura intenso
 Núcleo: púrpura

Método de Kluver - Barrera (Kluver e Barrera 1953 apud Leong 1996) para mielina e células nervosas

Soluções

Solução aquosa de carbonato de lítio a 0,05%

Solução de Luxol fast blue a 0,1%

Luxol fast blue MBS (C.I. 74180)	0,1 g
Álcool etílico 95%	5 mL
Água destilada	100 mL

Solução de violeta de cresil a 0,1%

Violeta de cresil (CAS 18472)	0,1 g
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar até álcool 95%;
- 2) tratar pela solução de luxol em estufa a 56°C, overnight⁸⁴;
- 3) passar no álcool 95% para remover excesso de corante;
- 4) diferenciar, mergulhando rapidamente, na solução de carbonato de lítio;
- 5) Continuar a diferenciação em álcool 70% até haver distinção entre substância branca e cinzenta.
- 6) passar rapidamente pela solução de carbonato de lítio;
- 7) passar pelo álcool 70% várias vezes até obter um bom contraste entre substância branca (corada em azul esverdeada) e a substância cinzenta (incolor).
- 8) lavar em água destilada;
- 9) corar pela solução de violeta de cresil por 6 minutos.
- 10) desidratar, clarificar e montar.

Resultados:

Mielina: azul

Outras estruturas: rosa a violeta

⁸⁴ Overnight = de um dia para outro.

Coloração com efeito metacromático

Quando um corante impõe sua própria cor a determinado elemento tecidual, a coloração é dita ortocromática. Contudo, alguns corantes sob determinadas condições, ao se ligarem ao tecido, coram a estrutura tecidual em cor diferente daquela do corante usado. Essa propriedade é conhecida como **metacromasia**.

Ressalte-se que o efeito metacromático de um corante depende da concentração do corante em solução aquosa. Para se obter o efeito metacromático, após a coloração com o corante, o material não deve ser desidratado. Após a coloração, a lâmina é levada diretamente ao microscópio para documentação fotográfica, sem passar pela água destilada. Todavia, é possível montar a lâmina com uma lamínula, desde que se utilize um meio aquoso.

Corantes como a tionina a 1%, o azul de toluidina O a 0,05% e o azul A 1%, podem exibir a efeito metacromático, desde que, após a coloração, a amostra não seja lavada em água destilada nem desidratada.

Coloração pelo azul de toluidina para observação do efeito metacromático (Leong 1996)

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pelo azul de toluidina O (C.I. 52040) a 0,5% de 1 a 5 minutos;
- 3) lavar rapidamente em água destilada;
- 4) levar ao microscópio para observação.

Resultados:

Reação metacromática: lilás-arroxeadado

Reação ortocromática: azul claro

Métodos para demonstrar lipídeos (gordura) teciduais

Lipídeo é o termo geral usado na técnica histológica e se refere a todas as gorduras e substâncias semelhantes às gorduras, como os triglicerídeos, ácidos graxos, lipoproteínas e glicolipídeos presentes nos tecidos.

Alguns elementos que contenham lipídeos, como lipoproteínas, lipofucsina e mielina, podem permanecer no tecido mesmo que a amostra seja processada para inclusão em parafina. Entretanto, as amostras destinadas ao estudo de lipídeos, principalmente aqueles presentes nas células na forma de inclusões, por serem facilmente removidos pelo xilol durante a diafanização, devem ser submetidas a um tratamento especial.

Para estudar os lipídeos teciduais, após a fixação, a amostra deve ser congelada. O congelamento causa endurecimento da amostra, facilitando a obtenção de cortes com o auxílio de um micrótomo de congelação ou criostato.

Método de coloração pelo oil red O (Lillie e Fulmer)

Soluções:

Solução estoque de oil red O 0,5%⁸⁵

Oil red O	0,5 g
Isopropanol 98%	100 mL

Modo de preparo: Em um becker de 200 mL, dissolver o corante oil red em pequena quantidade de isopropanol, misturando bem. Caso haja fragmentos maiores, esses devem ser triturados com o auxílio de um bastão de vidro. Juntar lentamente o restante do isopropanol, agitando com bastão de vidro.

⁸⁵ Atualmente, a solução corante de Oil red O é vendida comercialmente.

Aquecer a solução até 95°C. Não deixe a temperatura passar de 100°C. Filtrar com papel de filtro de malha grande enquanto a solução estiver quente. Deixar a solução em repouso à temperatura ambiente até o dia seguinte. Se a solução continuar turva, filtrar novamente. OBS.: a solução, se for guardada em estufa a 60°C, dura indefinidamente.

Solução de uso de oil red O:

Para cada 6 mL da solução de estoque adicione 4 mL de água destilada. Deixar repousar por 24h. Filtrar no momento de uso com o papel filtro com poro de 2,5µm.

Solução aquosa de isopropanol 98%

Procedimento:

- 1) cortes de congelação, recolhidos em água;
- 2) imergir os cortes em solução de isopropanol a 60% (fazer a diluição pouco antes do uso) por 2 minutos;
- 3) corar pela solução de uso de oil red por 10 minutos⁸⁶;
- 4) lavar em água destilada (2 passagens);
- 6) corar com hematoxilina;
- 7) diferenciar em água corrente;
- 8) lavar em água destilada;
- 9) diferenciar em água acidulada (caso os cortes estejam hiper-colorados);
- 10) lavar em água destilada;
- 11) montar o corte usando solução de glicerina ou outro meio aquoso (ver meios de montagem).

Resultados:

Núcleo: azul

Gordura neutra: vermelho

⁸⁶ O tempo pode ser reduzido para 10 minutos, se a coloração for realizada em estufa a 60°C.

Método de coloração pelo Azul do Nilo (Kiernan 1991)

Solução de azul do Nilo

Azul do Nilo (C.I. 51180)	1 g
Água destilada	95 mL
Ácido sulfúrico a 1%	1 mL

Modo de preparo: Após dissolver o azul do Nilo em água destilada, adicione a solução de ácido sulfúrico e ferva a mistura por 4 horas. Caso o volume da solução reduza, restaure o volume de tempos em tempos com água destilada. Esfriar, filtrar e guardar em frasco bem vedado. A solução se mantém viável por vários meses.

Procedimento:

- 1) cortes de congelação, recolhidos em água;
- 2) corar com azul do Nilo a 60 °C de 5 a 10 minutos (ou 20 minutos à temperatura ambiente) em recipiente fechado para evitar a evaporação do solvente e a formação de precipitado.
- 3) lavar rapidamente em água destilada acetificada (solução aquosa de ácido acético 1%;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) montar o corte usando solução de glicerina ou outro meio aquoso (ver meio de montagem).

Resultados:

Lipídeos neutros: róseo

Lipídeos ácidos: azul

Método do tetróxido de ósmio (Prophet 1992) para gordura em cortes de congelação

Solução de tetróxido de ósmio a 1%

Tetróxido de ósmio (ampola)	1 g
Água destilada	100 mL

Atenção: Devido à alta toxicidade do tetróxido de ósmio, sempre trabalhar em capela de exaustão de gases. Colocar a ampola de ósmio em um vidro resistente; com o auxílio de um bastão de vidro, quebrar a ampola. Em seguida, adicionar a água destilada e fechar imediatamente o vidro. Não inalar o vapor. Vedar muito bem o vidro⁸⁷, revestindo-o com alumínio e guardando-o em geladeira.

Procedimento:

- 1) cortes de congelação, recolhidos em água;
- 2) imergir os cortes na solução de tetróxido de ósmio por 24 horas (trabalhar em capela de exaustão de gases e em vidro bem vedado);
- 3) lavar em água destilada várias vezes por 6 horas;
- 4) contracorar com corante de fundo (opcional);
- 5) montar o corte usando solução de glicerina ou outro meio aquoso (ver meio de montagem).

Impregnações metálicas

Algumas técnicas histoquímicas utilizam metais, como a prata, para identificar elementos teciduais ou mesmo para células.

Além do método de reticulina de Gömöri que utiliza a solução de nitrato de prata para identificar as fibras reticulares⁸⁸ no tecido conjuntivo. As impregnações pela prata também são usadas na identificação de células como os neurônios, por facilitarem a visualização do seu pericário e de seus prolongamentos. Outras técnicas também utilizam a solução à base de prata, como o método de Grimelius

⁸⁷ Recomendamos utilizar parafim® para vedar o vidro.

⁸⁸ As fibras reticulares são fibras de colágeno preferencialmente do tipo III. Ressalte-se que os elementos fibrosos à base de colágeno são estruturas híbridas, ou seja, possuem vários outros elementos associados ao tipo de colágeno da fibra/fibrila.

para identificar grânulos de células enteroendócrinas presentes na via digestória. Importante ressaltar que, para as impregnações metálicas, não se fala em coloração, mas impregnação, uma vez que a prata é um metal que se deposita sobre a estrutura, impedindo a passagem de luz e, dessa forma, evidencia a silhueta do elemento tecidual.

As impregnações pela prata podem ocorrer por meio de duas reações. Na **reação argentafim**, a prata é reduzida e depositada no local da reação sem a necessidade de se utilizar um agente redutor. Na **reação argirófila**, a prata é adsorvida ao elemento tecidual, sendo posteriormente reduzida por um agente redutor; dessa forma, a prata é depositada no local da reação, revelando o elemento tecidual.

Método de reticulina de Gömöri para evidenciação de fibras reticulares (Gömöri 1937)

Soluções:

Solução de permanganato de potássio a 1%

Solução de metabissulfito de potássio a 2%

Solução de alúmen de ferro a 2%

Solução de formol a 10%

Solução de tiosulfato de sódio a 5%

Solução de nitrato de prata a 10%

Solução aq. de nitrato de prata a 10% 20 mL

Solução aq. de hidróxido de potássio 10% 5 mL

Solução aq. de hidróxido de amônia 28% 100 mL

Modo de preparo: Ao juntar a solução de nitrato de prata à solução de hidróxido de potássio, forma-se um precipitado. Adicionar lentamente a solução de hidróxido de amônia à solução de nitrato de prata até a dissolução total do precipitado. Adicionar, gota a gota,

solução de nitrato de prata até que se forme um precipitado, mas que seja solúvel por agitação.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar com a solução de permanganato de potássio a 1% por 1 minuto;
- 3) lavar em água destilada por 2 minutos;
- 4) tratar com a solução de metabissulfito de potássio a 2% ou solução de ácido oxálico a 5% por 1 minuto;
- 5) lavar em água corrente por 3 minutos;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) tratar com solução de alúmen de ferro a 2% por 1 minuto;
- 8) lavar em água destilada, 2 passagens;
- 9) passar na solução de nitrato de prata a 10% por 2 minutos;
- 10) lavar em água destilada por 5 minutos;
- 11) tratar com a solução de formol a 10% por 3 minutos;
- 12) lavar em água corrente;
- 13) lavar em água destilada;
- 14) tratar com a solução de metabissulfito de potássio a 2% por 1 minuto;
- 15) lavar em água corrente;
- 16) lavar em água destilada;
- 17) tratar com a solução de tiosulfato de sódio a 5%, 2 minutos;
- 18) lavar em água corrente por 2 minutos;
- 19) lavar em água destilada;
- 20) contracorar com solução aquosa de light green a 1% em solução de ácido acético a 1%;
- 21) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras reticulares: preto

Método de Bodian (Leong 1996) para fibras e terminações nervosas

Soluções:

Solução de protargol a 1%

Protargol	1 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparar: espargir o protargol na superfície da água e deixar dissolver sem agitar.

Solução redutora

Hidroquinona	1 g
Formalina 37-40%	5 mL
Água destilada	100 mL

Solução aquosa de cloreto de ouro a 1%

Solução aquosa de ácido oxálico a 1%

Solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5%

Solução de azul de anilina

Azul de anilina.....	0,1 g
Ácido oxálico	2 g
Ácido fosfomolibdico	2 g
Água destilada	300 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) colocar na solução de protargol recentemente preparada por 72 horas em estufa à 37°C;
- 3) lavar em água destilada, 3 mudanças;
- 4) colocar na solução redutora por 10 minutos;
- 6) lavar em água destilada, 3 mudanças;
- 4) colocar na solução de cloreto de ouro por 10 minutos;
- 7) lavar em água destilada, 3 mudanças
- 8) colocar na solução de ácido oxálico;
- 9) lavar em água destilada, 3 mudanças;
- 10) tratar com solução de tiosulfato de sódio por 5 minutos;

- 11) lavar em água destilada
- 12) contraporar com solução de azul de anilina de 1 a 5 minutos;
- 13) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fibras nervosas e neurofibrilas: preto

Núcleo: preto

Método de Grimelius (Grimelius 1969) para evidênciação de células enterocromafins

Soluções:

Soluções A

Nitrato de prata 1%	3 mL
Tampão acetato 0,2M (pH 5,6)	10 mL
Água bidestilada	87 mL

Soluções B (solução redutora; preparada no momento de uso)

Hidroquinona	1g
Sulfito de sódio (cristal)	5 g
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) Impregnar pela prata (solução A), previamente aquecida a 60°C por 3 horas e em estufa;
- 3) retirar os cortes da solução A (escorrer bem, sem deixar secá-los);
- 4) colocar os cortes na solução B, previamente aquecida a 45°C por 1 minuto;
- 5) lavar em água destilada;
- 6) examinar os cortes; se não estiver bem impregnado pode retornar para a solução A por 5 a 10 minutos e repetir a redução;
- 7) contraporar com solução aquosa de light green 1% em solução de ácido acético a 1%;

8) desidratar, diafanizar e montar.

Atenção: caso a amostra tenha sido fixada com o Líquido de Bouin, não há necessidade de se realizar coloração de fundo.

Resultados:

Granulação das células enterocromafins: marrom.

Método de Nonidez (Nonidez 1939) (neurofibrilas – nervos)

Fixador: Solução alcoólica de hidrato de cloral a 25%

Hidrato de cloral	25 g
Álcool 50%	100 mL

Soluções:

Solução diferenciadora: álcool 95% amoniacal a 0,2%

Álcool 95%	99 mL
Hidróxido de amônio	0,2-1 mL
Água destilada	100 mL

Solução aquosa de nitrato de prata a 2%

Solução redutora (pirogalol – formalina)

Pirogalol	0,5 g
Formol PA	5 mL
Água destilada	50 mL

Procedimento:

- 1) enxugar o fragmento do órgão (com até 5 mm de espessura) com papel-filtro para remover o excesso do fixador;
- 2) colocar o fragmento em álcool a 95% com 4 gotas de amoníaco concentrado por 24 horas;
- 3) lavar em água destilada por 5 minutos;
- 4) colocar o fragmento em solução de nitrato de prata de 5 a 6 dias em estufa com 37 a 40°C. Se a solução ficar escura, ela deve ser substituída;
- 5) lavar em água destilada por 3 minutos;

- 6) colocar o fragmento na solução redutora de pirogalol-formalina por 24 horas;
- 7) lavar em água destilada por 2 a 3 horas, trocando várias vezes;
- 8) transferir o fragmento para álcool 50% e deixar de 12 a 24 horas;
- 9) processar o fragmento para inclusão em parafina.
- 10) depois da confecção de cortes, desparafinizar e hidratar;
- 11) contracorar com corante de fundo desejado (sugerimos solução aquosa de light green a 1%);
- 12) desidratar, clarificar e montar.

Resultados:

Fibras nervosas e terminações nervosas: preto

Método de Gless (Marsland 1954) para axônio

Soluções:

Solução aquosa de nitrato de prata a 20%

Solução de formalina a 10%

Solução de nitrato de prata amoniacal de Gless

Solução aquosa de nitrato de prata a 20% 30 mL

Álcool absoluto 20 mL

Modo de preparo: misturar as duas soluções e gotear amônia até dissolver o precipitado que se forma. Após dissolução, adicionar mais 5 gotas de amônia.

Solução aquosa de cloreto de ouro a 0,2%

Solução aquosa de hipossulfito de sódio a 5%

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar com solução de nitrato de prata aquecida a 37°C até o corte adquirir cor âmbar (cerca de 25 a 30 minutos);

- 3) lavar em água destilada por 3 minutos;
- 4) colocar na solução de formalina: 3 passagens de 10 segundos cada;
- 5) lavar em água destilada por 3 minutos;
- 6) tratar pela solução de nitrato de prata de Gless por 30 segundos;
- 7) tratar com a solução de formalina por 1 minuto;
- 8) examinar ao microscópio para verificar se o axônio estava em preto (voltar a lâmina para a solução de Gless, se necessário);
- 9) lavar em água destilada por 3 minutos;
- 10) passar na solução de cloreto de ouro por 10 minutos;
- 11) lavar em água destilada por 3 minutos;
- 12) tratar com a solução de hipossulfito de sódio por 5 minutos;
- 13) lavar em água destilada por 10 minutos;
- 14) desidratar, clarificar e montar.

Resultados:

Axônio: preto

Outras estruturas: cinza ou amarelo (se usar o cloreto de ouro)

Colorações para elementos figurados do sangue

Algumas colorações usadas para caracterizar os elementos figurados do sangue são baseadas na mistura de Romanowsky, composta por eosina, azul de metileno e o eosinato de azul de metileno (resultante da combinação da eosina-azul de metileno).

As colorações mais antigas são preparadas a partir de corantes em pó adquiridos comercialmente. Atualmente, as soluções corantes estão disponíveis comercialmente e prontas para uso.

A coloração de Giemsa utiliza uma mistura de azure II e eosina Y, a qual deve ser dissolvida em metanol e glicerol, enquanto a

coloração May-Grünwald Giemsa é um procedimento realizado em duas etapas. Na primeira etapa, a distensão é corada pela solução de May-Grünwald e, em seguida, corada pela solução de Giemsa.

Outro método usado para corar as distensões sanguíneas é a coloração de Wright, a qual pode ser utilizada sozinha ou combinada ao Giemsa (Wright-Giemsa).

Neste livro, apresentamos algumas colorações nas quais as soluções corantes podem ser preparadas no laboratório ou adquiridas prontas para uso.

Coloração de May-Grünwald em uma etapa (em Fernandes, 1943)

Solução de May-Grünwald

May-Grünwald	0,2 g
Metanol	100 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, misturar o corante ao metanol. Ferver a solução por 2 horas, usando uma placa aquecedora à 60°C. Caso haja muita perda do metanol (por evaporação), completar o volume da solução até o volume inicial (100 mL). Após as 2 horas, deixar esfriar e filtrar em papel filtro.

Procedimento:

- 1) distensões sanguíneas recentemente preparadas e secas ao ar (o álcool metílico no corante promove boa fixação);
- 2) gotejar o corante May-Grünwald sobre a preparação por 3 minutos;
- 3) sem rejeitar o corante, adicionar quantidade igual de água destilada, movimentando a distensão para misturar bem; deixar o corante atuar por 5 minutos;
- 4) lavar rapidamente em água destilada;

5) deixar secar e examinar ao microscópio de luz, usando óleo de imersão.

Resultados:

Núcleo: azul pálido
 Hemácias: vermelho azulado claro
 Granulações eosinófilas: vermelho forte
 Granulações basófilas: azul intenso
 Grânulos azurófilos: púrpura
 Plaquetas: azul pálido

Coloração de Giemsa

Solução estoque de Giemsa

Giemsa (C.I. 42555)	1 g
Glicerina	60 mL
Metanol	56 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, colocar o metanol, a glicerina e, em seguida, adicionar o corante. Usando uma placa aquecedora à 60°C, ferver a mistura por 2 horas. Caso haja muita perda do metanol, completar o volume da solução. Deixar esfriar e filtrar usando papel filtro.

Solução de uso de Giemsa

Solução estoque de Giemsa 2,5 mL
 Preparar em proveta: elevar o volume à 100 mL com água destilada.

Procedimento:

- 1) distensões sanguíneas recentemente preparadas devem ser secas ao ar, seguida de fixação com álcool metílico P.A., de 3 a 10 minutos;
- 2) gotejar, sobre a distensão sanguínea, a solução de Giemsa diluída (solução de uso) de 20 a 30 minutos;

- 3) lavar rapidamente a distensão com abundante quantidade de água corrente;
- 4) secar a distensão com auxílio de papel filtro;
- 5) examinar ao microscópio de luz, usando óleo de imersão.

Resultados:

Núcleo: vermelho-violáceo
 Hemácias: vermelho-pálido
 Citoplasma dos leucócitos: azul
 Granulações eosinófilas: vermelho forte
 Granulações basófilas: azul ou azul-violáceo
 Grânulos azurófilos: vermelho-violáceo
 Plaquetas: azul

Coloração May-Grünwald Giemsa em duas etapas (em Fernandes, 1943)

Soluções:

Solução de May-Grünwald

May-Grünwald	0,2 g
Metanol	100 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer, misturar o corante ao metanol. Ferver, usando uma placa aquecedora à 60°C, por 2 horas. Deixar esfriar a solução e, caso haja muita perda do metanol, completar o volume da solução (até atingir 100 mL). Filtrar em papel filtro.

Solução estoque de Giemsa

Giemsa	1 g
Glicerina	60 mL
Metanol	56 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer, misturar o corante à glicerina e adicionar o metanol. Ferver, usando uma placa aquecedora à 60°C, por 2 horas. Caso haja muita perda do metanol, completar o volume da solução. Filtrar em papel filtro.

Solução de uso de Giemsa

Solução estoque de Giemsa 20 mL

Água destilada 80 mL

Colocar 3 gotas de ácido acético.

Procedimento:

- 1) usar distensões sanguíneas recentemente preparadas e secas ao ar (o álcool metílico na solução corante promove a fixação);
- 2) gotejar o corante May-Grunwald sobre a lâmina e aguardar 3 minutos;
- 3) sem rejeitar o corante, adicionar quantidade igual de água destilada, movimentando a lâmina para misturar bem e deixar a solução corante atuar por mais 1 minuto;
- 4) rejeitar o corante e, sem lavar, colocar sobre a distensão a solução de Giemsa (solução de uso) por 15 minutos;
- 5) lavar rapidamente com água de torneira;
- 6) deixar secar e examinar ao microscópio de luz, usando óleo de imersão.

Resultados:

Núcleo: azul

Hemácias: vermelho

Granulações eosinófilas: rosa intenso

Granulações basófilas: azul violáceo

Grânulos azurófilos: púrpura

Coloração de May-Grünwald Giemsa a partir de soluções prontas, disponíveis comercialmente

Solução de uso de May-Grünwald

Solução estoque May-Grünwald
(Merck cod. nº 1524) 25 mL

Tampão Sørensen pH 6,8 190 mL

Procedimento:

- 1) distensões sanguíneas recentemente preparadas e fixadas em metanol por 15 minutos;
- 2) gotejar o corante May-Grünwald e deixa-lo atuar por 5 minutos;
- 3) escorrer o corante da lâmina;
- 4) corar pela solução de uso de Giemsa por 10 minutos;
- 4) rejeitar o corante e lavar em tampão Sörensen pH 6,8;
- 5) deixar secar e examinar ao microscópio de luz, usando óleo de imersão (a montagem da lâmina é opcional).

Resultados:

Núcleo: azul pálido

Hemácias: vermelho alaranjado

Granulações eosinófilas: rosa intenso

Granulações basófilas: azul-escuro

Grânulos azurófilos: vermelho claro

Coloração de Wright (em Fernandes, 1943)**Solução de Wright**

Azul de metileno (C.I. 52015)	1 g
Solução de bicarbonato de sódio 5%	100 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o azul de metileno na solução aquosa de bicarbonato de sódio e aquecer a mistura a 100°C durante 1 hora e 30 minutos, usando autoclave. Retirar da autoclave, deixar a solução esfriar e filtrar para remover o precipitado. Para cada 100 mL da mistura filtrada, adicionar 500 mL de solução aquosa de eosina a 0,1%⁸⁹; misturar bem os reagentes e, em seguida, filtrar. Quando o precipitado estiver seco (no papel filtro), remova-o. Em seguida,

⁸⁹ Escolha usar um erlenmeyer de 500 mL.

dissolver 0,1g do precipitado para 60 mL de metanol; a solução estará pronta para uso⁹⁰.

Procedimento:

- 1) utilizar distensões sanguíneas recentemente preparadas e que foram fixadas em metanol por 15 minutos;
- 2) gotejar o corante por 1 minuto e, em seguida, adicionar a mesma quantidade de água destilada e deixar agir por 2 ou 3 minutos;
- 3) escorrer o corante da lâmina;
- 4) lavar a distensão com água destilada por 30 segundos ou até a parte mais delgada da distensão se tornar amarelada ou rosada;
- 4) deixar a distensão secar e examinar ao microscópio de luz, usando óleo de imersão.

Resultados:

Núcleo: azul-pálido

Hemácias: vermelho alaranjado

Granulações eosinófilas: rosa intenso

Granulações basófilas: azul-escuro

Grânulos azurófilos: vermelho-claro

Método de Giemsa (Lennert 1978), para cortes histológicos

Soluções:

Solução de Giemsa (estoque)

Giemsa	1 g
Glicerina	60 mL
Metanol	56 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o corante na glicerina e adicionar o metanol. Ferver a mistura usando uma placa aquecedora a 60°C, por 2 horas. Deixar a

⁹⁰ Este corante é encontrado comercialmente pronto para uso.

solução esfriar e, caso tenha havido muita perda do metanol, completar o volume da solução com metanol. Filtrar em papel filtro.

Solução de Giemsa (de uso)

Solução de Giemsa (estoque)	20 mL
Água destilada	80 mL

Solução acetificada

Ácido acético glacial	4 gotas
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução de Giemsa, por 1 hora;
- 3) diferenciar com solução acetificada por 3 a 4 segundos;
- 4) completar a diferenciação em álcool 95%, aproximadamente 15 segundos (chegar ao microscópio);
- 5) lavar em água destilada
- 6) desidratar, diafanizar e montar

Resultados:

Grânulos dos mastócitos: azul
 Grânulos dos eosinófilos: rosa
 Plasmócitos: basofilia citoplasmática
 Grânulos dos neutrófilos: não se coram

Método de May-Grünwald Giemsa (Leong 1996) para cortes histológicos)

Soluções:

Solução de May-Grünwald (estoque)

May-Grünwald.....	0,2 g
Metanol	100 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o corante ao metanol. Ferver a mistura usando uma aquecedora

a 60°C, por 2 horas. Deixar a mistura esfriar e, caso haja muita perda do metanol, completar o volume da solução. Filtrar em papel filtro.

Solução de May-Grünwald (de uso)

Solução estoque de May-Grünwald	25 mL
Água destilada	100 mL

Solução de Giemsa (estoque)

Giemsa	1 g
Glicerina	60 mL
Metanol	56 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o corante à glicerina e adicionar o metanol. Ferver, usando uma placa aquecedora à 60°C, por 2 horas. Deixar esfriar e, caso haja muita perda do metanol, completar o volume da solução. Filtrar em papel filtro.

Solução de Giemsa (de uso)

Solução de Giemsa (estoque)	20 mL
Água destilada	80 mL

Solução acetificada

Ácido acético glacial	4 gotas
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução de uso de May-Grünwald por 15 minutos em estufa à 37°C;
- 3) sem lavar, colocar a distensão na solução de uso de Giemsa por 40 minutos em estufa a 37°C;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) diferenciar em água acetificada por 15 segundos;
- 6) lavar em água destilada;

- 7) diferenciar em solução de álcool absoluto – acetona (em partes iguais);
- 8) desidratar em álcool absoluto, diafanizar e montar.

Resultados:

Núcleo: azul intenso
 Hemácias: vermelho
 Grânulos dos eosinófilos: rosa
 Plasmócitos: basofilia citoplasmática
 Grânulos dos neutrófilos: não se coram

Método de vermelho do congo (Song et al. 2018, adaptado) para identificação de eosinófilos em corte histológico

Solução alcoólica de vermelho do congo (congo red) a 0,5% (preparada recentemente)

Vermelho do congo (C.I. 22120)	0,5 g
Álcool 50%	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução alcoólica de vermelho do congo a 0,5% por 15 minutos em temperatura de 25°C;
- 3) diferenciar em álcool 75% por alguns segundos;
- 4) contraporar com a hematoxilina (cerca de 10 segundos);
- 5) lavar em água corrente;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) desidratgar, diafanizar e montar.

Resultados:

Eosinófilos: granulações avermelhadas
 Núcleo: azul

Detecção de elementos orgânicos e inorgânicos

Após a coloração, é possível detectar depósitos de substâncias como alguns pigmentos e/ou precipitados no tecido. Para esclarecer a natureza desses elementos, pigmentos e/ou material inorgânico, é possível utilizar algumas técnicas histoquímicas.

Alguns pigmentos podem eventualmente se formar durante a realização da fixação, interferindo no diagnóstico ou na qualidade do material. Esses pigmentos também podem ter origem endógena, como resultado de algum processo metabólico no próprio organismo, ou serem produtos de reação formados durante alguma etapa da técnica histológica.

Amiloide

Amiloide refere-se aos depósitos de proteínas fibrilares insolúveis, também denominada proteína amiloide, que se acumula em diversos tecidos. Essa deposição de depósito pode ocorrer em certas condições patológicas, afetando a função desses tecidos.

Método de violeta de metila para amiloide (em Fernandes 1943)

Soluções:

Solução formol-sublimado

Solução saturada de cloreto de mercúrio	1 g
Água destilada	100 mL

Solução aquosa de violeta de metila B (C.I. 42535) a 2%

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) colocar na solução de formol-sublimado por 15 minutos;

- 3) diferenciar em solução aquosa de ácido acético a 1% (acompanhar ao microscópio até o núcleo ficar azul e o amiloide lilás);
- 4) diferenciar em carbonato de lítio a 1% por 15 segundos;
- 5) montar em solução aquosa saturada de acetato de potássio.

Resultados:

Núcleo: azul-escuro

Amiloide: azul

Método de vermelho do congo para amiloide (Prophet et al. 1992)

Soluções:

Solução de vermelho do congo (congo red)

Vermelho do congo (C.I. 22120)	1 g
Etanol a 50%	200 mL

Solução diferenciadora

Etanol 50%	160 mL
Hidróxido de sódio (ou potássio)	0,4 g
Água destilada	40 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução de Congo red a 1% de 10 a 30 minutos;
- 3) passar na solução diferenciadora⁹¹;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) corar pela hematoxilina;
- 6) lavar em água corrente;
- 7) lavar em água destilada;
- 8) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Amiloide: vermelho

⁹¹ É possível também usar uma solução de ácido clorídrico em álcool 50% como solução diferenciadora.

Método de vermelho do congo (Prophet et al. 1992, adaptado) para amiloide, com observação ao microscópio de luz polarizada

Solução de vermelho do congo (congo red) 1%

Vermelho do congo	1 g
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar pela solução aquosa de Congo red 1% de 10 a 30 minutos;
- 3) lavar em água destilada;
- 4) diferenciar em solução de carbonato de lítio 1% por 15 segundos;
- 5) lavar em água corrente;
- 6) lavar em água destilada;
- 7) corar pela hematoxilina;
- 6) lavar em água corrente;
- 7) lavar em água destilada;
- 8) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Amiloide: alaranjado ao microscópio de campo claro.

Amiloide: em verde ao microscópio de luz polarizada.

Pigmento de lipofuscina

A **lipofuscina** é um pigmento de coloração amarronzada e representa o acúmulo intracelular de resíduos lipídicos que não são digeridos pela célula, ficando contidos em vacúolos. Esse acúmulo é mais comum em indivíduos idosos.

O método de Schmorl é utilizado para detectar lipofuscina, mas também pode indicar a presença de melanina. Portanto, é recomendável utilizar outros métodos específicos ou empregar um método de

identificação de pigmento melânico para descartar a possibilidade de o pigmento em questão ser melanina.

Método de Schmorl (em Culling 1964)

Soluções:

Reagente de Schmorl

Solução aquosa de ferricianeto de potássio 1%	8 mL
Solução aquosa de cloreto férrico 1%	60 mL
Água destilada	12 mL

Solução de ácido acético a 1%

Corante de fundo: solução aquosa de safranina a 1% ou vermelho neutro a 1%, ou ainda, nuclear fast red a 1% (ver pág. 142).

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar pelo reagente de Schmorl por 10 minutos;
- 3) lavar com solução de ácido acético 1%;
- 4) lavar com água destilada;
- 5) corar usando um corante de fundo;
- 6) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Pigmento de lipofuscina e melanina: azul intenso

Outras estruturas: vermelho-claro

Melanina

A melanina é uma proteína rica em tirosina e fenilalanina produzida por células especializadas – os melanócitos.

Existem vários tipos de melanina e em diferentes cores, tais como preto, marrom, vermelho ou amarelo. Na pele, a melanina está relacionada com as várias tonalidades da cor da pele. No entanto, a

melanina também ocorre em diversos tecidos/órgãos, tais como nos neurônios da substância negra do cérebro, na íris e na coróide do olho, na estria vascular da orelha interna, entre outros locais.

Método de impregnação de pigmento melânico, segundo Masson (em Fernandes, 1943)

Soluções:

Solução de nitrato de prata amoniacal a 10%

Nitrato de prata	1 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o nitrato de prata em 50 mL de água destilada. Em seguida, adicionar hidróxido de amônia puro até a dissolução do precipitado. Em seguida, adicionar lentamente (gota a gota) a solução de nitrato de prata até que novamente se forme um precipitado, o qual é dissolvido com agitação da solução. Colocar a solução em uma proveta de 100 mL e completar o volume com água destilada até o volume de 100 mL. Guardar em frasco escuro, protegido da luz.

No preparo da solução, usar luvas e não utilizar espátula de pesagem metálica (utilizar recipiente de pesagem e espátula de plástico).

Líquido de Cajal

Solução de sulfocianeto de amônio 3%	20 mL
Hipossulfito de sódio	20 mL
Cloreto de ouro 1%	40 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar pela solução de nitrato de prata por 2 horas (no escuro);
- 3) lavar em água destilada;
- 4) tratar com o líquido de Cajal por alguns minutos;

- 5) lavar em água destilada;
- 6) passar rapidamente na solução de hipossulfito de sódio 3%;
- 7) lavar em água comum;
- 8) lavar em água destilada;
- 9) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Pigmento melânico: preto

Método de Desmelanização (em Beçak & Paulete 1976)

Soluções:

Solução de permanganato de potássio a 0,25%

Solução aquosa de ácido oxálico a 5%

Procedimento:

- 1) Não desparafinizar e não colocar os cortes em lâminas de vidro. Os cortes unidos entre si (formando tências) são transferidos para um recipiente (Fig. 32) contendo solução de permanganato de potássio a 0,25%, devendo permanecer na solução por 1 hora.

Fig. 32: Coloração de corte em tências na técnica de desmelanização. Após a microtomia, os cortes, organizados em tências, são transportados de uma cuba para outra até o embranquecimento dos cortes. OBS.: agitar levemente a solução; a despigmentação pode ser acelerada se a solução estiver a 37°C.



- 2) transferir os cortes para água destilada;
- 3) transferir os cortes para a solução de ácido oxálico a 5%, até a descoloração dos cortes;
- 4) lavar em água destilada (3 passagens);
- 5) pescar os cortes em lâmina filmada e deixá-los secar até o dia seguinte em estufa a 37°C;
- 6) seguir com o método de coloração desejado.

Pigmento formólico

O pigmento formólico pode ser formado durante a fixação do material em soluções aquosas ácidas de formol (pH inferior a 6) ou quando o material permanecer por um longo período na solução de formol. Entretanto, é possível remover o pigmento formado antes de se utilizar a coloração desejada.

Método para remoção do pigmento formólico

Solução alcoólica amoniacal

Álcool 95%	50 mL
Hidróxido de amônio (sol. aq. 28%)	15 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar os cortes com a solução alcoólica amoniacal;
- 3) lavar bem os cortes com água corrente (água da torneira);
- 4) lavar em água destilada;
- 5) seguir com o método de coloração desejado.

Resultados:

Pigmento formólico desaparece.

Pigmento de hemossiderina

A hemossiderina é um pigmento endógeno, amarronzado, que contém material insolúvel contendo carboidratos, proteínas, lipídeos e ferro. Pode ser depositada no tecido em consequência do acúmulo de ferro devido à decomposição da hemoglobina.

O método de azul de Turnbull, também conhecido como azul da Prússia, é indicado para identificar pigmento de hemossiderina. Os depósitos de ferro no tecido também podem ser identificados pelo método de Perls.

Método de azul de Turnbull (em Fernandes 1943)**Soluções**

Solução de uso de ferrocianeto de potássio⁹²

Solução aquosa de ferrocianeto a 20% 50 mL

Solução aquosa de ácido clorídrico a 1% 50 mL

Corante de fundo (ver adiante): Pode-se usar a solução aquosa de safranina a 1%, vermelho neutro a 1%, nuclear fast red a 1% ou solução aquosa de fucsina básica a 50%.

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar os cortes com solução acidificada de ferrocianeto de potássio (10 a 20 minutos);
- 3) lavar bem com água destilada;
- 4) corar com um corante de fundo, como o nuclear fast red a 1%;
- 5) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Pigmento de hemossiderina: azul intenso

Núcleo, citoplasma e matriz extracelular: vermelho

⁹² Preparar antes do uso.

Método de azul da Prússia (em Fernandes 1943)

Soluções:

Solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 2%

Ferrocianeto de potássio	2 g
Água destilada	100 mL

Solução aquosa de ácido clorídrico a 3%

Ácido clorídrico PA	3 mL
Água destilada	100 mL

Solução de ferrocianeto-ácido clorídrico (solução de uso)

Solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 2%.....	50 mL
Solução aquosa de ácido clorídrico a 3%	50 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar os cortes com a solução de ferrocianeto-ácido clorídrico (solução de uso) por 10 minutos a temperatura ambiente;
- 3) lavar bem com água destilada;
- 4) contraporar com corante de fundo;
- 5) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Pigmento de hemossiderina: azul intenso

Método de Perls (em Fernandes 1943)

Soluções:

Solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 2% (recém preparada)

Solução alcoólica de ácido clorídrico a 1%

Álcool 70%	100 mL
Ácido clorídrico concentrado	1 mL

Solução de ferrocianeto-ácido clorídrico (solução de uso)

Solução aquosa de ferrocianeto de potássio a 2%..... 50 mL

Solução aquosa de ácido clorídrico a 3% 50 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) tratar pela solução de uso por 30 minutos;
- 3) lavar com água destilada;
- 4) contracorar com um corante de fundo (nuclear fast red a 1%);
- 5) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Pigmento de hemossiderina: azul intenso

Remoção de precipitado de mercúrio

Os precipitados de mercúrio no tecido podem ser removidos antes da realização da coloração. Fixadores que contenham mercúrio em sua composição podem ser fonte de precipitados no tecido, como o fixador de Zenker⁹³. Para a remoção dos precipitados, os cortes (incluídos em parafina) devem ser submetidos, antes da coloração, aos seguintes passos:

- 1) desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada;
- 2) colocar os cortes na seguinte solução por 15 minutos;

Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: dissolver primeiro o iodeto de potássio em água destilada, depois adicionar o iodo.

- 3) lavar em água corrente;

⁹³ Atualmente é pouco utilizado, já que o mercúrio é extremamente tóxico e prejudicial ao meio ambiente.

- 4) colocar em solução aquosa de tiosulfato (ou hipossulfato) a 5% por 3 minutos;
- 5) lavar em água corrente por 10 minutos ou mais, seguida de lavagem em água destilada;
- 6) seguir com o método de coloração escolhido.

Depósitos de cálcio tecidual

Em condições normais, o cálcio está presente na forma de cristais de hidroxiapatita no tecido ósseo que forma o esqueleto e nos dentes. Em vertebrados não mamíferos, depósitos de cálcio podem ser encontrados em outros tecidos do corpo que não o tecido ósseo. No entanto, nos mamíferos, a calcificação pode ocorrer em decorrência de lesões degenerativas, necróticas, processos inflamatórios, em tumores em desenvolvimento, entre outras condições patológicas. Portanto, a identificação de depósitos de cálcio é importante.

Método de von Kossa (em Fernandes 1943), para identificação de depósitos de cálcio em tecidos

Soluções:

Solução de nitrato de prata a 5%⁹⁴

Solução de tiosulfato de sódio⁹⁵ a 5%

Solução de nuclear fast red (C.I. 60760) 1% (vide corantes de fundo)

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) impregnar o tecido usando a solução de nitrato de prata a 5%;

⁹⁴ A solução deve ser preparada pouco antes do uso.

⁹⁵ Pode substituir o tiosulfato por metabissulfeto de sódio.

- 3) expor a lâmina (ainda imersa em solução de prata e no borrel ou outra cuba de vidro) à luz solar de 30 minutos a 1 hora;
- 4) lavar em água destilada (4 passagens);
- 5) passar na solução de tiosulfato de sódio por 5 minutos;
- 6) corar pelo nuclear fast red 1% ou pelo light green a 1%;
- 6) lavar em solução de água acetificada (solução aquosa de ácido acético a 0,5%);
- 7) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Depósitos de cálcio: em preto

Citoplasma: rosa

Detecção de micro-organismos

Método de Grocott (Grocott 1955) para fungos

Soluções:

Solução aquosa de ácido crômico a 4%

Solução de nitrato de prata a 5%

Modo de preparo de nitrato de prata: Em um erlenmeyer de 250 mL, dissolver o nitrato de prata em 50 mL de água destilada (forma-se um precipitado marrom). Adicionar lentamente hidróxido de amônia pura (PA) até a dissolução do precipitado. Em seguida, adicionar nitrato de prata lentamente (gota a gota) até que se forme novo precipitado, o qual se dissolve com agitação da solução. Colocar a solução em uma proveta e completar o volume com água destilada até atingir 100 mL. Guardar a solução em frasco escuro bem fechado e protegido da luz.

Solução aquosa de metenamina (hexametilenotetramina) 3%

Solução aquosa de bórax a 5%

Solução de metenamina – nitrato de prata (solução estoque)

Solução de nitrato de prata a 5%	25 mL
Solução de metenamina a 3%	100 mL

A mistura produz precipitado branco que se dissolve com a agitação. A solução pode se manter viável por meses e deve ser guardada em vidro âmbar e em geladeira.

Solução de metenamina – nitrato de prata (solução de uso; deve ser preparada no momento de uso)

Solução de metenamina – nitrato de prata	25 mL
Solução de bórax a 5%	2 mL
Água destilada	100 mL

Solução aquosa de bissulfito de sódio a 1%

Solução aquosa de cloreto de ouro a 0,1%

Solução aquosa de tiosulfato de sódio a 5%

Solução de verde luz a 0,2% (solução estoque)

Verde luz (C.I. 42095)	1 g
Água destilada	100 mL
Ácido acético glacial	0,2 mL

Solução de verde luz 0,2% (solução de uso)

Solução estoque de verde luz	10 mL
Água destilada	50 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) oxidar com solução de óxido crômico por 1 hora;
- 3) lavar em água destilada por alguns segundos;
- 4) lavar com solução de bissulfito de sódio a 1% por 1 minuto, para remover o ácido crômico residual;
- 5) lavar em água destilada (3 a 4 passagens);
- 6) colocar na solução de metenamina – nitrato de prata recém-preparada por 1 hora em estufa a 60°C, ou até que os cortes exibam coloração amarelada escura. OBS.: manter em frasco tampado para evitar oxidação;

- 7) lavar em água destilada (6 passagens);
- 8) passar na solução de cloreto de ouro de 2 a 5 minutos;
- 9) lavar em água corrente;
- 10) lavar em água destilada;
- 11) contraporar com solução de verde luz por 40 segundos;
- 12) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Fungos: preto

Mucina: castanho a cinza escuro

Hifas e micélios: rosa escuro

Método de Ziehl-Neelsen (em Leong 1996) para bacilos

Soluções:

Solução de fucsina fenólica

Fucsina básica (C.I. 42510)	1 g
Solução aquosa de fenol a 5%	10 mL
Álcool absoluto	100 mL

Modo de preparo: Em erlenmeyer de 250 mL, dissolver a fucsina no álcool e, depois, acrescentar o fenol. Em seguida, adicionar a solução de fenol. Filtrar a solução antes do uso; a solução pode ser usar várias vezes.

Solução diferenciadora

Álcool 70%	99 mL
Ácido clorídrico concentrado	1 mL

Solução de azul de metileno 1%

Azul de metileno (C.I. 52915)	0,25 g
Ácido acético glacial	1 mL
Água destilada	100 mL

Procedimento:

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) corar com a solução de fucsina fenólica por 1 hora, a 56°C;

- 3) lavar em água corrente para remover o excesso do corante;
- 4) lavar em água destilada;
- 5) passar na solução diferenciadora até que o corte fique na cor rosa pálido (cerca de 2 passagens);
- 6) contraporar com solução de azul de metileno por 1 minuto;
- 9) lavar em água destilada;
- 10) desidratar, diafanizar e montar.

Resultados:

Bacilo álcool-ácido resistente: vermelho forte

Fundo: azul claro

Método para citologia cervical

Método de Coloração de Papanicolaou (Bancroft 2018, adaptado)

A coloração de Papanicolaou é usada para destacar variações na morfologia, grau de maturidade e atividade metabólica das células que revestem a vagina e colo de útero (epitélio de revestimento). Para isso, realiza-se uma leve raspagem do epitélio com uma espátula especial. O material coletado é então colocado sobre uma lâmina de vidro, formando um “esfregaço”, que é então fixado com álcool etílico a 95%. Após fixação, os esfregaços são corados para verificar se há alterações na morfologia das células epiteliais, ou seja, se as células apresentam morfologia celular normal ou há indícios citopatológicos.

Soluções:

Hematoxilina de Harris (veja preparo da hematoxilina)

Solução de Orange G

Orange G (C.I. 16230)	5 g
Álcool absoluto	950 mL
Ácido fosfotúngstico	0,25g

Modo de preparo: dissolver o Orange G em água destilada; depois adicionar o ácido fosfomolibdico. Filtrar e guardar em frasco escuro.

Solução de EA-65

Solução aquosa de light green a 3%	10 mL
Solução aquosa de eosina Y a 20%	20 mL
Álcool 95%	700 mL
Metanol	250 mL
Ácido fosfotúngstico	2 g
Ácido acético glacial	20 mL

Preparo: Dissolver os reagentes, inicialmente, em álcool 95%; ao final, adicionar o metanol. Filtrar antes do uso.

Solução aquosa de ácido clorídrico 0,5%

Procedimento:

- 1) utilizar esfregaço fixado em etanol a 95%;
- 2) hidratar;
- 3) corar pela hematoxilina de Harris;
- 4) lavar em água corrente;
- 5) lavar em água destilada (5 a 10 mergulhos);
- 6) passar na solução diferenciadora (3 mergulhos);
- 7) lavar em água destilada por 2 minutos;
- 8) lavar em água corrente por 2 minutos
- 9) lavar em água destilada (5 a 10 mergulhos);
- 10) passar no álcool a 95%;
- 11) corar pela solução de Orange G por 2 minutos;
- 12) lavar em álcool a 95%, 2 passagens de 5-10 mergulhos cada;
- 13) corar com a solução de EA-65 por 5 minutos;
- 14) lavar em álcool a 95%, 3 passagens de 5-10 mergulhos cada;
- 15) lavar em álcool absoluto, 2 passagens de 5-10 mergulhos cada;
- 16) diafanizar e montar.

Resultados:

Núcleo: azul escuro

Citoplasma das células escamosas não queratinizadas: azul-esverdeado

Células queratinizadas: rosa a laranja

Coloração de fundo

Algumas técnicas histoquímicas que identificam elementos teciduais específicos utilizam corantes de ampla ação para ressaltar a identificação do elemento principal. Nessas técnicas, é importante usar corantes não específicos⁹⁶ para ressaltar os elementos específicos evidenciados.

Os corantes que coram todos os elementos teciduais de forma indiscriminada e não específica são designados “corante de fundo” e devem ter cor distinta daquela do corante principal, utilizado para identificar uma estrutura específica.

A solução de ácido pícrico foi muito usada na “coloração” de fundo, necessária para destacar determinados elementos, como a coloração seletiva pela Orceína para identificar as fibras elásticas, uma vez que sua cor amarela é repassada para os demais elementos teciduais. Entretanto, devido à sua alta toxicidade, o uso do ácido pícrico é evitado, uma vez que há outros corantes menos tóxicos que podem ser utilizados como corantes de fundo.

Solução aquosa de eosina a 1%

Solução estoque

Eosina Y (C.I. 45380)	1 g
Água destilada	100 mL

⁹⁶ Significa que o corante “cora” indiscriminadamente todos os elementos teciduais.

Modo de preparo: após dissolver a eosina em água destilada, adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial. Estocar em temperatura ambiente.

Solução de uso

Solução estoque de eosina	1 parte
Álcool 80%	3 partes

Modo de preparo: dissolver e adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial.

Resultados:

Os elementos teciduais são evidenciados em rosa.

Solução alcoólica de eosina a 1%

Solução estoque

Eosina Y (C.I. 45380)	1 g
Água destilada	20 mL
Etanol 80%	80 mL

Solução de uso

Solução estoque de eosina	1 parte
Etanol 80%	3 partes

Para se obter uma tonalidade mais acentuada da cor do corante no tecido, adicionar 0,2 mL de ácido acético glacial para cada 100 mL de solução. Isso pode ser feito para estender a viabilidade do corante.

Resultados:

Os elementos teciduais são evidenciados em rosa.

Nuclear fast red a 0,2% (Kernechtrot, vermelho neutro nuclear)

Nuclear fast red (C.I. 60760)	0,2 g
Sulfato de alumínio	5 g
Água destilada	100 mL

Modo de preparo: dissolver o corante e o sulfato de alumínio em água destilada, aquecendo até 90°C. Após resfriar, filtrar a solução, acrescentar um grão de timol para evitar contaminação. Tempo de coloração: varia de 5 a 15 minutos.

Resultados:

Os núcleos são corados em tonalidade avermelhada e o citoplasma e matriz extracelular em rosa.

Safranina O a 1%

Safranina O (C.I. 50240)	1 g
Água destilada	100 mL

Tempo de coloração: varia de 15 a 30 minutos.

Resultados:

Os núcleos são corados em tonalidade avermelhada e o citoplasma e matriz extracelular em rosa.

Cristal violeta a 0,1%

Cristal violeta (C.I. 42555)	0,1 g
Solução aquosa de ácido acético a 2%	100 mL

Tempo de coloração: varia de 1 a 3 minutos.

Resultados:

O tecido é corado em tonalidade azul-arroxeadada.

Verde luz (light green) 1%

Verde luz (C.I. 42095)	1 g
Álcool 95%	100 mL

Tempo de coloração: varia de 1 a 3 minutos.

Resultados:

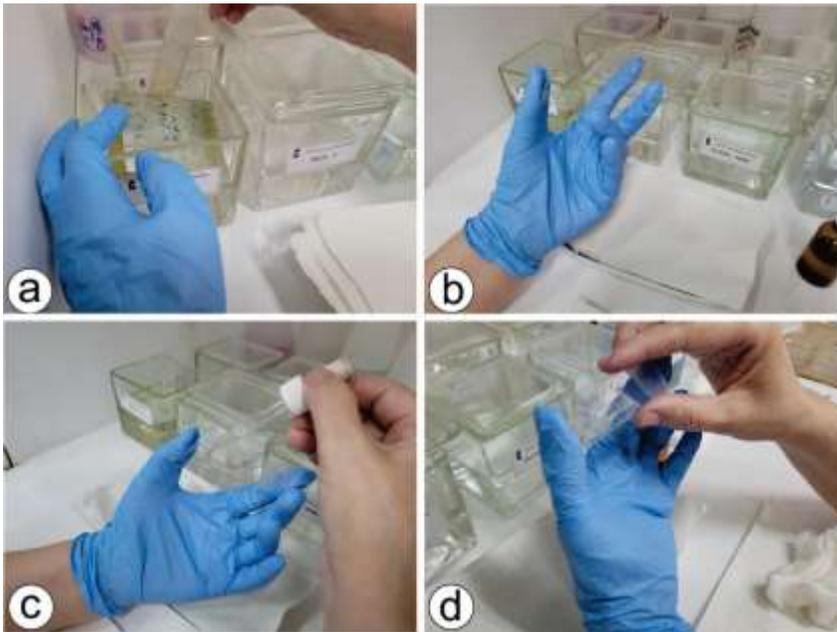
As estruturas teciduais são coradas em verde.

Capítulo 7

Meios de montagem

A montagem, ou selagem do corte, representa a etapa final da técnica histológica, quando o corte, já corado, é protegido por uma lamínula de vidro (Fig. 33). Para a aderência da lamínula à lâmina contendo o corte, utilizam-se meios de montagem resinosos naturais ou sintéticos, disponíveis comercialmente.

Fig. 33: Ao final da coloração, as lâminas estão imersas em xilol (a). Para o manuseio de material ao microscópio, os cortes devem estar protegidos com lamínula. Usando luva nitrila, a lâmina é retirada da cuba de coloração contendo xilol (b). Com o auxílio de um “conta-gotas” coloca-se a resina sobre o corte (c). Em seguida, a lamínula é depositada sobre o corte de modo a protegê-lo. Após esse procedimento, deixar a resina secar antes da lâmina ser levada ao microscópio para análise.



Após a montagem, a lâmina pode ser manuseada.

Em regra, os meios de montagem resinosos são incompatíveis com a água. Atualmente, as resinas sintéticas são priorizadas por secarem rapidamente. Dessa forma, é necessário remover totalmente a água dos tecidos (desidratação). No entanto, essas resinas também não são miscíveis em álcool, sendo necessário removê-las do tecido com o auxílio de xilol.

Após a lamínula aderir à lâmina, esta é colocada sobre um suporte para secagem. É importante destacar que a lamínula não deve ser removida sob risco de danificar o corte histológico.

Na preparação de lâminas submetidas às técnicas histoquímicas em que o material não deve ser desidratado, existem meios de montagem miscíveis em água, conhecidos como meios de montagem aquosos. Esses meios possibilitam a adesão da lamínula à lâmina sem a necessidade de desidratar o tecido.

Meios de montagem naturais

Bálsamo do Canadá

O bálsamo do Canadá é uma resina natural extraída da casca da árvore *Abies balsamea*. Por ser solúvel em xilol, o bálsamo do Canadá foi amplamente usado na selagem das lâminas. No entanto, tem a desvantagem de secar (polimerizar) lentamente, o que dificulta o acondicionamento adequado da lâmina em recipiente próprio. Atualmente, apesar de ser produzido sinteticamente e secar mais rapidamente, o bálsamo do Canadá tem sido substituído por outras resinas sintéticas.

Goma de Damar

A goma de Damar é extraída de árvores do gênero *Shorea* ou *Hopea* de coloração amarelada, pálida. Foi muito pouco usada em histologia por demorar a secar após aplicada sobre o corte.

Goma de Damar 200 g
 Xilol 100 mL

Modo de preparo: misturar e aguardar dissolver; dependendo da textura desejada, acrescentar mais xilol ou goma de Damar.

Meios de montagem acrílicos

Os meios semelhantes aos acrílicos, como o metilmetacrilato, não são os mais indicados. No entanto, esses meios podem ser dissolvidos em xilol, o que permite controlar sua viscosidade até atingir a consistência desejada. Um produto acrílico, disponível comercialmente, é o Entellan®, que é transparente e não interfere na cor do espécime.

Xarope

Xarope de milho da marca Karo foi eventualmente usado como meio de montagem aquoso para material congelado e submetido às técnicas especiais, como a identificação de material lipídico. Pode ser usado em momentos emergenciais, pois forma precipitados de açúcar.

Meios de montagem aquosos

Gelatina-glicerina

Gelatina 10 g
 Água destilada 60 mL

Modo de preparo: aquecer a gelatina até dissolver totalmente; depois, acrescentar 70 mL de glicerina.

Glicerina de Jelly

Glicerina	50 mL
Gelatina	10 g
Água destilada	50 mL
Fenol	5 gotas

Modo de preparo: Dissolver a gelatina em água, em banho-maria. Após dissolução total, adicionar os outros componentes.

Polivinilpirrolidona (PVP)

A PVP é um polímero solúvel em água que pode ser usado como meio de montagem aquoso.

Polivinilpirrolidona	50 g
Água destilada	50 mL
Glicerol	2 mL

Modo de preparo: Misturar o PVP em água até formar uma pasta; aquecer em estufa, overnight ou mais, mexendo ocasionalmente, até obter um xarope. Adicionar o glicerol e misturar bem. Deixar na estufa até que todas as bolhas sejam eliminadas. A solução é estável à temperatura ambiente por muito tempo (chegando a anos). Se a mistura ficar muito espessa, adicione pequeno volume de água e misture bem. Deixar a mistura em estufa durante a noite. Para preservar a solução, coloque um pequeno cristal de timol para evitar o crescimento de fungos.

Além dos meios acima citados, há outros meios de montagem comercialmente disponíveis, como o Aquatex® Merck.

Capítulo 8

Imuno-histoquímica

Apesar do grande número de técnicas histoquímicas, há elementos teciduais que não são identificados através das colorações anteriormente descritas, principalmente elementos de natureza proteica.

Para solucionar essa dificuldade, a imuno-histoquímica foi desenvolvida a partir da reflexão de que cada molécula tem características próprias. Essas moléculas podem ser próprias do organismo ou terem sido introduzidas por meio de agentes infecciosos. Moléculas também são produzidas a partir de situações em que células do organismo se comportam de maneira desordenada e descontrolada, passando a não ser mais reconhecidas como próprias, como as células tumorais.

A imuno-histoquímica se baseia no princípio antígeno-anticorpo, em que os anticorpos são específicos para cada antígeno, onde o anticorpo interage com a porção da molécula do antígeno denominada epítopo.

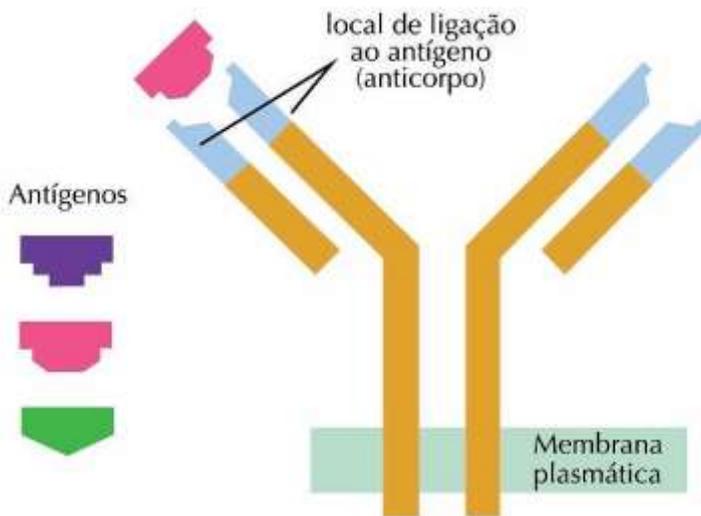
De modo geral, os antígenos são substâncias estranhas que penetram no organismo do hospedeiro que, ao reconhecer a molécula como “estranha”, produz **anticorpo**, uma molécula orgânica (geralmente uma glicoproteína) capaz de se combinar com o antígeno específico, neutralizando-o. O anticorpo também é conhecido como imunoglobulina (Ig).

As imunoglobulinas são naturalmente produzidas por células do corpo e desempenham papel fundamental no sistema imunológico (sistema de defesa do organismo). O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo pode ocorrer pela **afinidade química** ou **afinidade estrutural**, ou seja, através da adaptação da estrutura tridimensional

do antígeno à região de ligação ao anticorpo da molécula do anticorpo (especificidade “chave-fechadura”) (Fig. 34).

Dessa forma, a imuno-histoquímica é uma ferramenta de diagnóstico complementar, comumente utilizada em anatomia patológica e pesquisa científica, para identificar elementos teciduais não visualizados pela histoquímica.

Fig. 34: Baseado na especificidade, cada anticorpo é específico para cada antígeno, como uma chave é específica para cada fechadura.



Atualmente, os anticorpos são adquiridos de empresas que comercializam anticorpos produzidos em diferentes animais, como camundongo, rato, coelho, cabra, macaco, dentre outros animais.

Os anticorpos podem ser utilizados para identificação de moléculas presentes em tecidos de material incluído em parafina ou em cortes obtidos pelo método de congelação, ou em outras resinas.

É importante ressaltar que, para identificar a molécula que se deseja identificar, é importante adquirir um anticorpo que tenha sido

produzido em animal distinto daquele animal que está sendo usado no estudo. Por exemplo, para identificar a laminina na pele de rato, deve-se utilizar anticorpo anti-laminina (que reconheça a laminina) de rato, mas que tenha sido produzido em outro animal (coelho, cabra ou outro animal) de modo a evitar reação cruzada. Por exemplo, o anticorpo anti-laminina de rato produzido em coelho irá se combinar com a molécula de laminina no tecido de rato. A laminina presente no tecido do rato funcionará como “antígeno” para o anticorpo produzido no coelho.

Ressalte-se ainda que, seja qual for o processamento histológico escolhido, a fixação adequada do material é fundamental para que a molécula que se deseja identificar seja preservada.

É fato que não existe fixador ideal; entretanto, deve-se tomar cuidado com os fixadores aldeídicos que, além de mudar a configuração tridimensional da molécula, podem estabelecer ligações cruzadas com as proteínas teciduais de modo a impedir a ligação do anticorpo à molécula do tecido (antígeno). Dessa forma, para propiciar a ligação do antígeno ao anticorpo, é necessária a “exposição” do antígeno através do procedimento denominado **recuperação antigênica**.

Existem métodos para recuperação antigênica, tais como:

- Método enzimático, que utiliza enzimas, como a tripsina;
- Método físico-químico por aquecimento, que utiliza a panela de pressão, banho-maria e micro-ondas, onde as lâminas com os cortes são imersas em solução previamente aquecida, como a solução de tampão citrato ou tampão tris-EDTA.

Durante a realização da técnica de imuno-histoquímica, os cortes são submetidos a diversas substâncias, as quais podem causar desprendimento do corte da lâmina. Para evitar o desprendimento, os cortes devem ser coletados em lâminas adesivadas, ou seja, lâmi-

nas previamente tratadas com substância que fortalece a adesão do corte à lâmina.

Outro aspecto a ser considerado para identificação de molécula através da imuno-histoquímica é estipulação da concentração do anticorpo. Portanto, é importante verificar a recomendação contida na bula do anticorpo (datasheet⁹⁷ fornecida pelo fabricante) de modo a utilizar a concentração mais adequada.

Recomenda-se também a realização de um teste prévio, onde o anticorpo usado com diversas diluições. O objetivo é se encontrar a diluição adequada onde a marcação seja evidente e não ocorra reação inespecífica (reação com outros elementos teciduais que não específicos para o anticorpo utilizado).

Para a identificação de uma molécula, os anticorpos devem estar “marcados” (conjugados) com uma substância. Geralmente, utiliza-se anticorpo associado à enzima que, em etapa subsequente, será revelada com uma substância cromógena (substância que modifica sua cor ao se combinar com outra substância).

A possibilidade de se utilizar anticorpos associados aos fluoróforos, tais como o FITC (isotiocianato de fluoresceína), Alexa fluor, dentre outros também é uma alternativa na imuno-histoquímica. Caso o anticorpo esteja marcado com substância fluorescente, a análise da reação deverá ser realizada ao microscópio de fluorescência. Como a fluorescência reduz com o tempo, a observação da reação deve ser realizada logo após a finalização da técnica.

Na rotina laboratorial, a técnica mais usual é a enzimática, onde o anticorpo vem ligado a uma enzima. Após aplicação da técnica enzimática, que permite o anticorpo reagir com a molécula do tecido (anticorpo primário), esse anticorpo deve vir conjugado (combinado) com uma enzima ou com um fluoróforo. Na sequência usada após a

⁹⁷ Dados técnicos que contém especificas de um produto.

aplicação do anticorpo, o que se “revela” é a ligação antígeno-anticorpo. Esse procedimento é designado imuno-histoquímica direta.

Na imuno-histoquímica indireta, é necessário utilizar um segundo anticorpo. Ou seja, o epítipo da molécula tecidual se combina com o anticorpo primário e, em seguida, o anticorpo secundário reconhece o anticorpo primário (Fig. 35).

Na etapa seguinte, utiliza-se um segundo anticorpo (anticorpo secundário), produzido ligado a outra molécula, geralmente a vitamina biotina (anticorpo biotinilado).

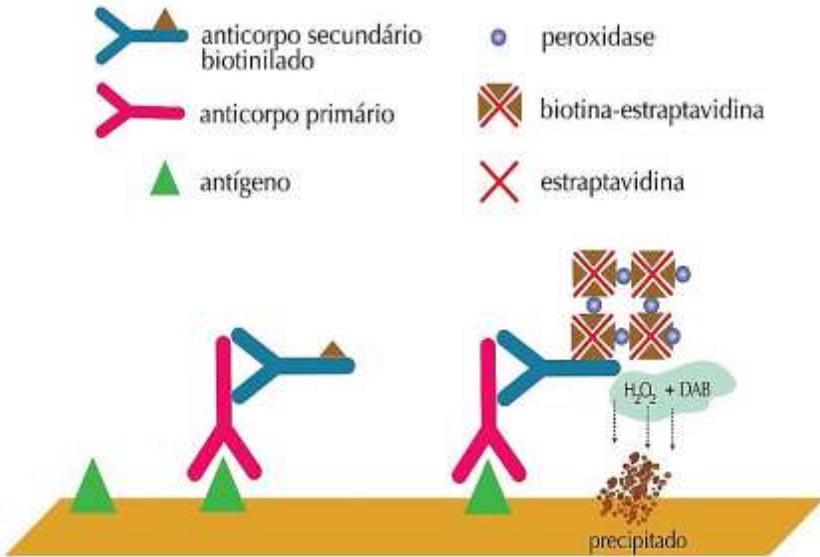
O anticorpo secundário biotinilado interage com outra substância – a estreptavidina, que é uma proteína não glicosilada com quatro sítios de ligação para as moléculas de biotina. A estreptavidina, por sua vez, está ligada à enzima peroxidase. Assim, nessa sequência, são utilizados dois anticorpos: o anticorpo primário e o anticorpo secundário.

O conjunto (anticorpo primário – anticorpo secundário – biotina – estreptavidina – biotina-peroxidase) ainda não é detectável no corte (Fig. 35). Para identificação da molécula, todo esse conjunto precisa ser “revelado”.

Para revelação do produto de reação, o corte deve ser submetido a uma solução contendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que é um cromógeno. O peróxido de hidrogênio, ao reagir com a peroxidase, libera oxigênio. O oxigênio, por sua vez, oxida o DAB (DAB oxidado), que precipita no local da reação na forma de um produto castanho. Esse produto castanho pode ser facilmente observado ao microscópio de luz de campo claro, permitindo a visualização do local da reação, indicando a presença da molécula no tecido.

Essa sequência de reações caracteriza a técnica imuno-histoquímica indireta, que envolve o uso de dois anticorpos (o anticorpo primário e o secundário), sendo que o anticorpo secundário deve estar marcado com peroxidase.

Fig. 35: Representação da técnica de imuno-histoquímica indireta. A molécula tecidual (antígeno) é reconhecida pelo anticorpo primário, que se combina com o anticorpo secundário biotinizado, que pode ser adquirido combinado com o complexo biotina-estraptavidina-peroxidase. No final da reação, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com a peroxidase na presença do 3,3'-diamonobenzidina (DAB), formando um precipitado insolúvel e de coloração castanha no local da reação.



Apesar do anticorpo ser usado na concentração adequada, é possível ocorrer reações inespecíficas entre o anticorpo e componentes teciduais. Para eliminar essas reações inespecíficas, utiliza-se uma solução de bloqueio, normalmente a solução de albumina bovina 1% diluída em tampão fosfato 0,1M (PBS, phosphate buffered solution).

A peroxidase endógena⁹⁸ também pode causar reações inespecíficas no tecido, mas pode ser bloqueada ao passar os cortes pela solução de peróxido de hidrogênio 3% em tampão fosfato 0,1M.

Para garantir a qualidade da reação, é importante utilizar cortes “controle”: controle positivo e controle negativo da reação.

O **controle positivo** ou “controle positivo” é o corte de um tecido que sabidamente possui a molécula alvo, ou seja, que revela reação positiva para o antígeno que se deseja marcar.

O **controle negativo** se refere ao material que deverá passar por todas as etapas da técnica de imuno-histoquímica, omitindo-se a exposição ao anticorpo primário. Assim, como o material não é exposto ao anticorpo que se une à molécula desejada, ao final da técnica não haverá reação (marcação da molécula) no tecido.

Protocolo básico para cortes em parafina (método indireto)

É importante destacar os cortes a serem submetidos à técnica de imuno-histoquímica devem ser coletados em lâminas previamente adesivadas⁹⁹.

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) lavar em água destilada;
- 3) lavar em água destilada;
- 4) lavar em tampão (o mesmo tampão da recuperação antigênica a ser utilizada)

⁹⁸ Enzimas que oxidam substratos orgânicos, tendo papel importante na desintoxicação celular ao eliminar do tecido o peróxido de hidrogênio, que é uma espécie reativa de oxigênio.

⁹⁹ Após microtomia, os cortes devem ser colocados em estufa à 37°C por, pelo menos, 24 horas para a adesão às lâminas.

5) recuperação antigênica¹⁰⁰ (dependendo do anticorpo, pode ser usada três recuperações alternativamente). Sugerimos consultar a bula (datasheet) que acompanha o anticorpo e é fornecida pelo fabricante.

- 5a) Tampão citrato de sódio 0,01M em pH 6 por 15 minutos em steamer (aquecimento¹⁰¹) para expor sítios antigênicos. Após o tempo em que a lâmina é submetida ao tampão, sob aquecimento, retirar a lâmina (imersa ainda no tampão) e deixar resfriar à temperatura ambiente por cerca de 20 minutos. A recuperação antigênica com tampão citrato é indicada para anticorpos de marcação nuclear.
 - 5b) Tripsina a 0,1% em tampão fosfato (PB, phosphate buffer) contendo cloreto de cálcio a 0,01% - 30 minutos (diluir 0,01g de cloreto de cálcio em 100 mL de PB; depois, acrescentar 0,1g de tripsina). A recuperação antigênica com tripsina é indicada para identificação de proteínas de matriz extracelular.
 - 5c) Tween 20 (polysorbato 20)¹⁰² a 0,25% em tampão PB - 30 minutos. A recuperação antigênica com tween é indicada para identificação de proteína de membrana ou citoplasmática.;
- 6) lavar as lâminas com o mesmo tampão utilizado na recuperação antigênica (2 passagens);
 - 7) lavar em tampão fosfato 0,1M;
 - 8) bloqueio da peroxidase endógena: solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% em tampão fosfato 0,1M por 30 minutos;

¹⁰⁰ Dependendo do anticorpo, a recuperação antigênica pode ser feita em tripsina, tampão citrato ou Tween20, devendo-se consultar a bula do fabricante do anticorpo.

¹⁰¹ O aquecimento é obtido utilizando-se panela de cozimento à vapor.

¹⁰² É um surfactante não iônico que atua como detergente e emulsificante (substância capaz de misturar dois líquidos que normalmente não se misturam).

- 9) lavar em tampão fosfato 0,1M;
- 10) aplicar soro albumina bovina (BSA) 3% em tampão fosfato 0,1M, por 1 hora¹⁰³;
- 11) aplicar o anticorpo primário sobre o corte e deixar a lâmina em contato com o anticorpo *overnight* (de um dia para outro). As lâminas devem ser mantidas em câmara úmida e em geladeira (4°C);
- 12) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 13) aplicar o anticorpo secundário (biotilado) por 1 hora;
- 14) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 15) aplicar com estreptavidina-peroxidase¹⁰⁴ por 30 minutos em câmara úmida, à temperatura ambiente;
- 16) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 17) revelar a reação (com DAB)¹⁰⁵;
Preparo do DAB (cromógeno), a partir do pó.
DAB (solução estoque¹⁰⁶):
DAB 25 mg
Tampão tris-HCl (pH 7,6) 20 mL

DAB (solução de uso):
DAB estoque 25 µL
H₂O₂ (no momento do uso) 200 µL
- 18) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);

¹⁰³ Também pode ser deixado *overnight* em geladeira.

¹⁰⁴ Atualmente, há vários “kits” comercialmente disponíveis. No caso de se usar esses kits, consultar a sequência de reagentes na bula (datasheet) que deve ser fornecida pelo fabricante.

¹⁰⁵ Controlar o tempo de reação, observando os cortes até que esses adquiram uma leve coloração acastanhada.

¹⁰⁶ Após filtração, pode ser congelado em alíquotas no congelador/freezer.

- 19) contraporar com hematoxilina diluída (fazer teste prévio para que os núcleos sejam marcados levemente);
- 20) diferenciar em água corrente;
- 21) lavar em água destilada;
- 22) desidratar, clarificar e montar.

Histoquímica com lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica que podem se ligar, de modo estável, a carboidratos que fazem parte de outras moléculas. As lectinas também podem causar aglutinação de hemácias e/ou outras células, ou a precipitação de glicoconjugados e polissacarídeos.

As lectinas são isoladas a partir de diversas variedades de fontes, tanto vegetais quanto de animais (vertebrados e invertebrados), além de fungos e bactérias.

Capazes de reconhecer de forma específica carboidratos simples e conjugados que fazem parte de outras moléculas, as lectinas têm papel importante no reconhecimento carboidratos e proteínas ao nível celular e molecular (veja tabela a seguir).

Nos tecidos vegetais, as lectinas atuam como proteínas de reserva de nitrogênio, como fatores de reconhecimento específicos, na defesa contra vírus e micro-organismos fitopatogênicos, insetos, nematoides, entre outros processos.

As lectinas podem também ocorrer em tecidos de animais, estando envolvidas com mecanismo de endocitose e outros processos (translocação intracelular de glicoproteínas, ligação a glicoconjugados, apoptose), podendo atuar na defesa contra microrganismos, re-

gulação da migração e adesão celular, interação de bactérias às células epiteliais.

Lectina	Planta	Especificidade (resíduo de açúcar)
1) Grupo glicose/manose		
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -manose, α -glicose
PSA	<i>Pisum sativum</i>	α -manose, glicose
LCA	<i>Lens culinaris</i>	α -manose, glicose
2) Grupo N-acetilglucosamina		
WGA	<i>Triticum vulgare</i>	N-acetilglucosamina, ácido neurâmínico
STL	<i>Solanum tuberosum</i>	N-acetylglucosamine
LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	[GlcNAc]1-3, N-acetylglucosamine
DSL	<i>Datura stramonium</i>	[GlcNAc]1-3, N-acetylglucosamine
GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	N-acetylglucosamine
3) Grupo N-acetilgalactosamina/galactose		
Jacalina	<i>Artocarpus integrifolia</i>	β -galactose ligada a oligossacarídeos
SBA	<i>Glycine max</i>	galactose, N-acetilgalactosamina
RAC-I	<i>Ricinus communis</i>	β -galactose, lactose
DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	α -N-acetilgalactosamina
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -galactose
ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	galactose, N-acetilgalactosamina, lactose
GSL-I	<i>Griffonia simplicifolia</i>	α -galactose
4) Grupo N-acetilgalactosamina/galactose		
UEA-I	<i>Ulex europaeus I</i>	α -fucose
AAA	<i>Alcuria aurantia</i>	α -fucose ligada a GluNAc
LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	α Fucose, arabinose
4) Grupo do ácido siálico		
MAL -II	<i>Maackia amurensis</i>	Ácido siálico
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Ácido siálico ligado a acetilgalactosamina ou galactose

Devido à sua especificidade, a marcação histoquímica com lectinas é utilizada como ferramenta para o estudo de glicoconjugados nos tecidos, podendo identificar as alterações nos padrões de glicosilação durante o desenvolvimento e diferenciação celular, nos estudos de subpopulações de linfócitos, entre outros. Dessa forma, a histoquímica com diferentes lectinas é usada em complementação às técnicas histoquímicas.

Protocolo para marcação com lectinas em cortes incluídos em parafina

- 1) desparafinizar e hidratar;
- 2) lavar em água destilada;
- 3) solução de bórax a 1% por 20 minutos (para exposição dos açúcares);
- 4) lavar em água destilada;
- 5) aplicar em soro albumina bovina (BSA, Bovine Serum Albumin) a 3% em tampão fosfato 0,1M por 1 hora;
- 6) lavar em tampão fosfato 0,1M;
- 7) bloqueio da peroxidase endógena: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% em tampão fosfato 0,1M por 30 minutos;
- 8) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 9) aplicar lectina diluída sobre o corte por 1 hora;
- 10) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 10) aplicar o complexo avidina-peroxidase por 30 minutos;
- 11) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 12) revelar a reação (com DAB)¹⁰⁷;

¹⁰⁷ Controlar o tempo de reação, observando a coloração dos cortes até que adquiram leve coloração acastanhada.

Preparo do DAB (cromógeno), a partir do pó

DAB estoque: DAB 25 mg
H₂O 10 mL

DAB uso: Tampão fosfato 5 mL
DAB estoque 200 µL
H₂O₂ (no momento do uso) 200 µL

- 13) lavar em tampão fosfato 0,1M (2 passagens);
- 14) contracorar com hematoxilina diluída (fazer teste prévio para que os núcleos sejam marcados levemente);
- 15) diferenciar em água corrente;
- 16) lavar em água destilada;
- 17) desidratar, clarificar e montar.

Imagens histológicas

Neste item encontram-se imagens histológicas de diversos tecidos, coradas com diferentes métodos. Recomendamos consultar um livro didático sobre Histologia dos Tecidos para melhor reconhecer os elementos que estruturam os diversos tipos de tecidos.

Fig. 36. Coloração pela hematoxilina-eosina (HE). Núcleos em azul-arroxeados; citoplasma e matriz extracelular em rosa. Pele delgada. Barra = 100 μm

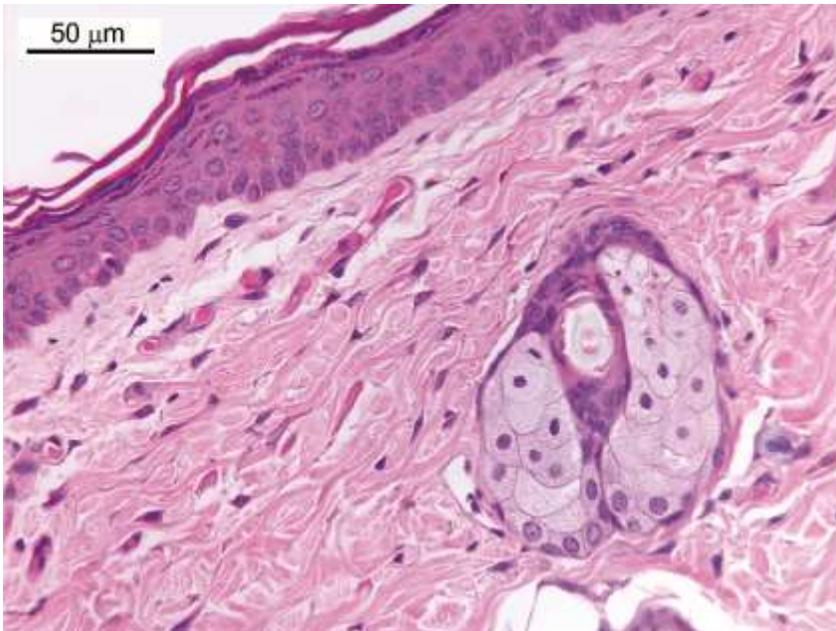


Fig. 37. Tricrômico de Mallory.
Núcleos em vermelho-alaranjado; matriz celular na tonalidade azul devido a presente de material à base de colágeno.
Ossificação endocondral (osso longo).

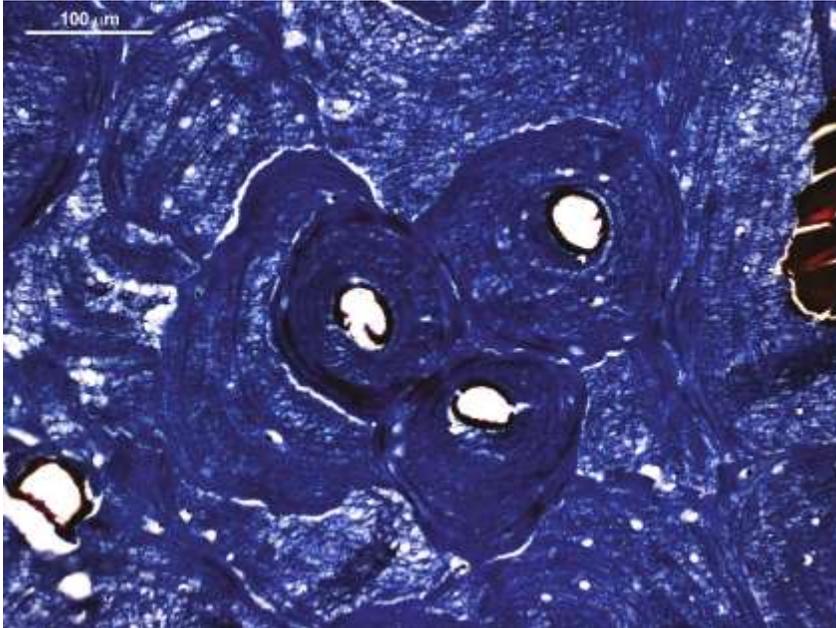


Fig. 38. Coloração pelo Tricrômico de Gömori.
Elementos fibrosos do tecido conjuntivo à base de colágeno são visuali-
zados em verde.
Epidídimo

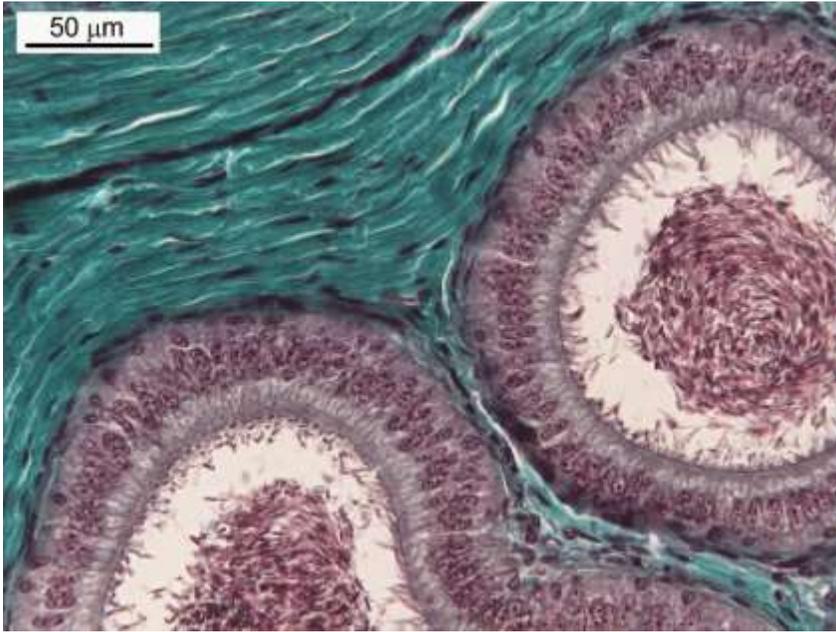


Fig. 39. Método de van Gieson
Elementos fibrosos à base de colágeno na matriz extracelular corado em vermelho; queratina em amarelo.
Pele espessa.



Fig. 40. Coloração seletiva pela Orceína
Fibras elásticas visualizadas em marrom.
Coloração de fundo: solução aquosa de ácido pícrico.
Artéria elástica (Aorta).

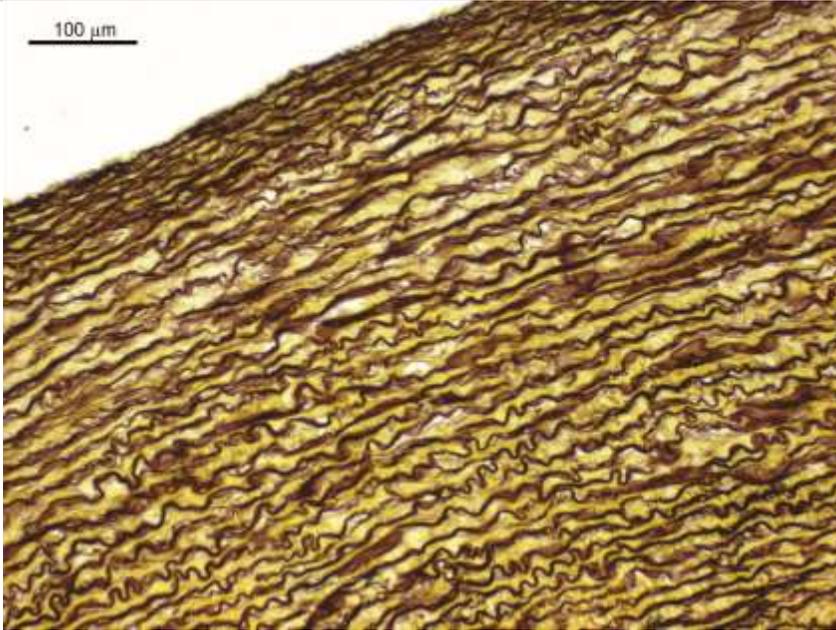


Fig. 40. Coloração seletiva pela Orceína: Artéria elástica (Aorta).
Fibras elásticas coradas em marrom.
Coloração de fundo: solução aquosa de verde luz.
Artéria elástica (Aorta). Barra = 100 μ m

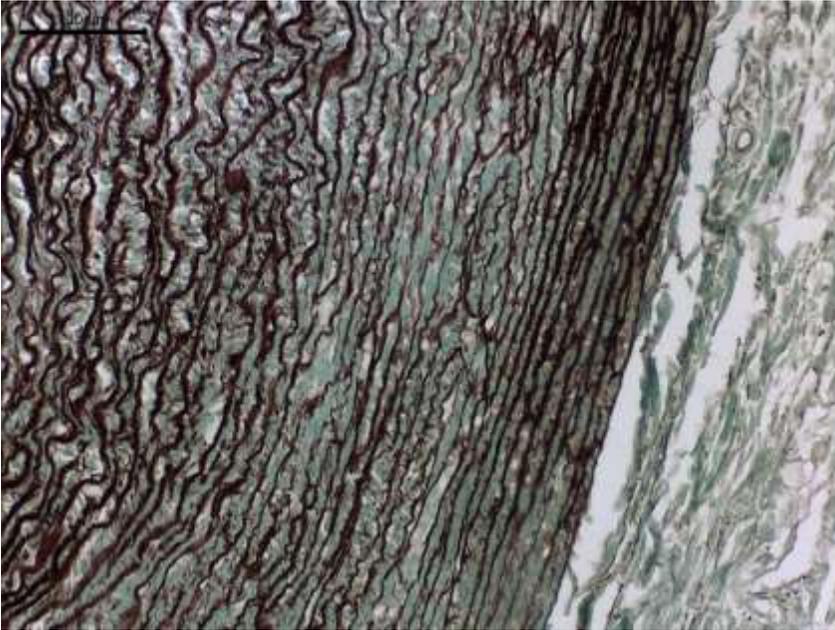


Fig. 41. Coloração com picrossírius red com visualização ao microscópio de campo claro.
Fibras colagenosas (fibras a base de colágeno) em vermelho.
Testículo. Barra = 100 μm

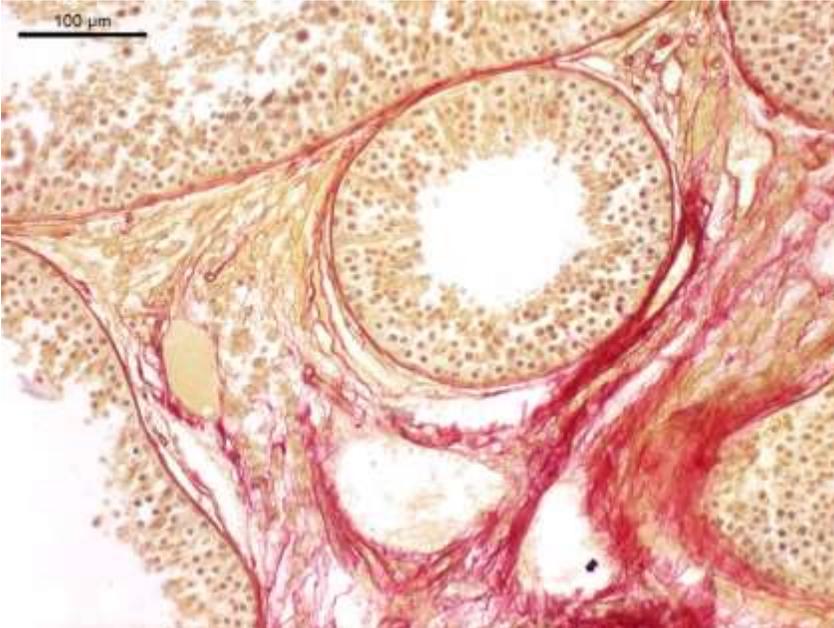


Fig. 41. Coloração com o picrossírius red: microscópio de campo claro (a) e microscópio de luz polarizada (b).
Fibras colagenosas coradas em vermelho.
Aorta. Barra = 100 μ m

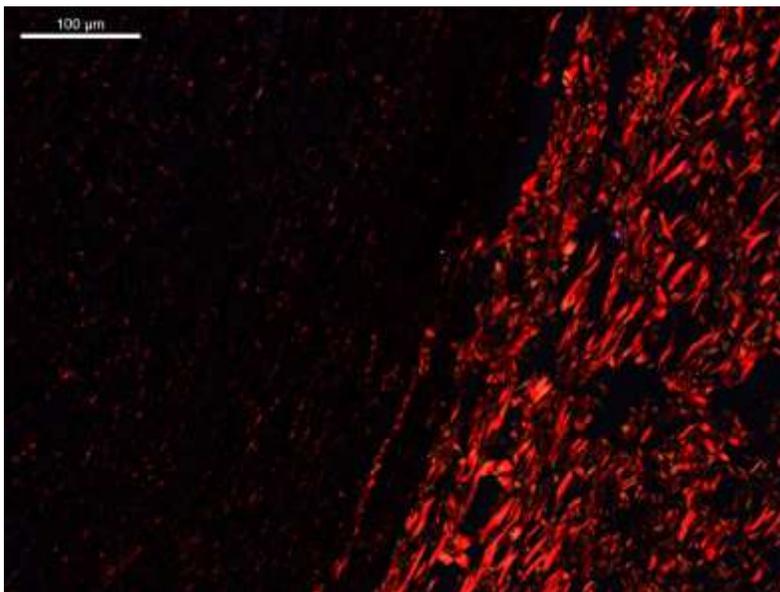
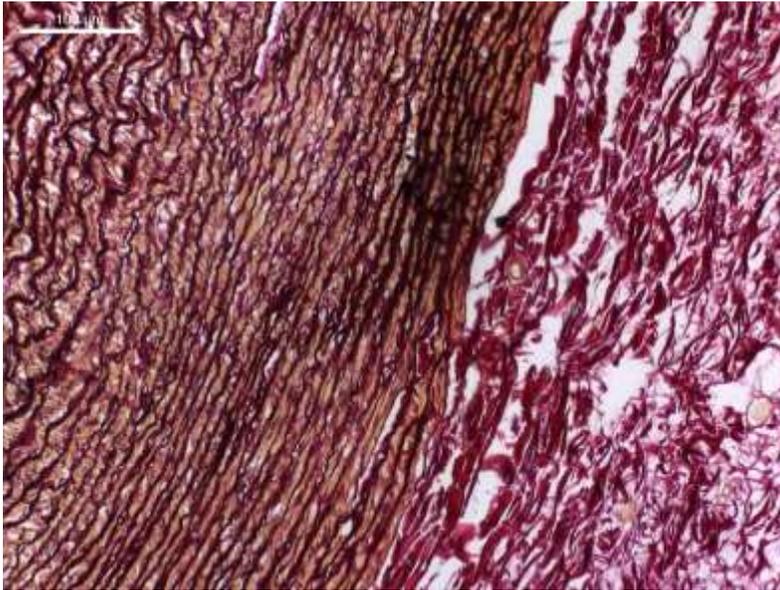


Fig. 42. Azul de toluidina a 1%
Matriz extracelular em roxo (reação metacromática).
Cartilagem elástica (orelha externa). Barra = 50 μm

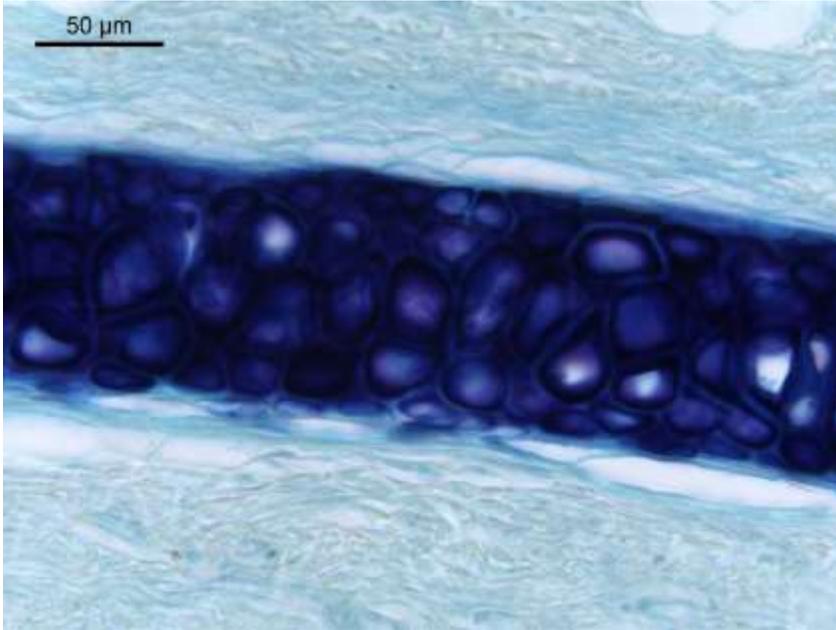


Fig. 43. Alcian blue, pH 2,5.
Coloração de fundo: nuclear fast red a 1%
Intestino grosso.

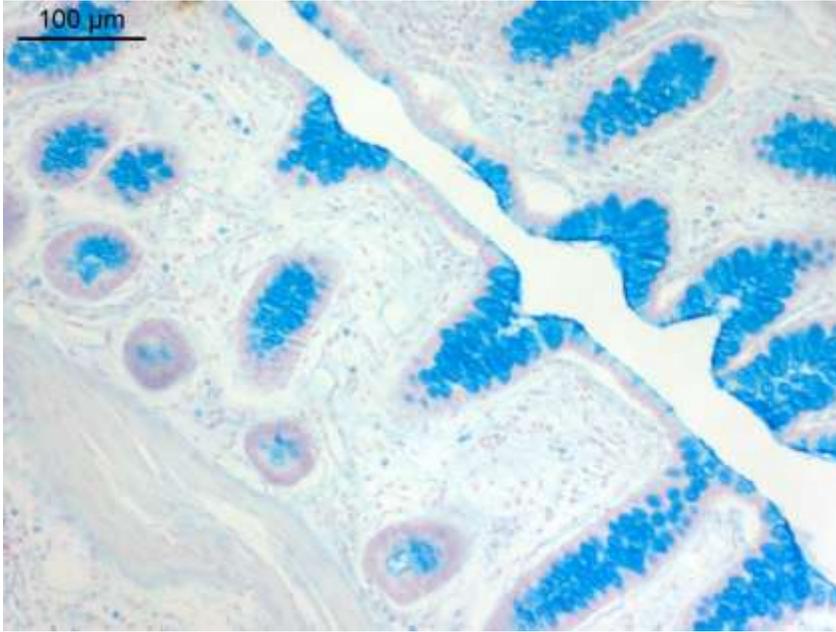


Fig. 44. Alcian blue, pH 1,0.
Coloração de fundo: nuclear fast red a 1%
Pulmão de anfíbio anuro.

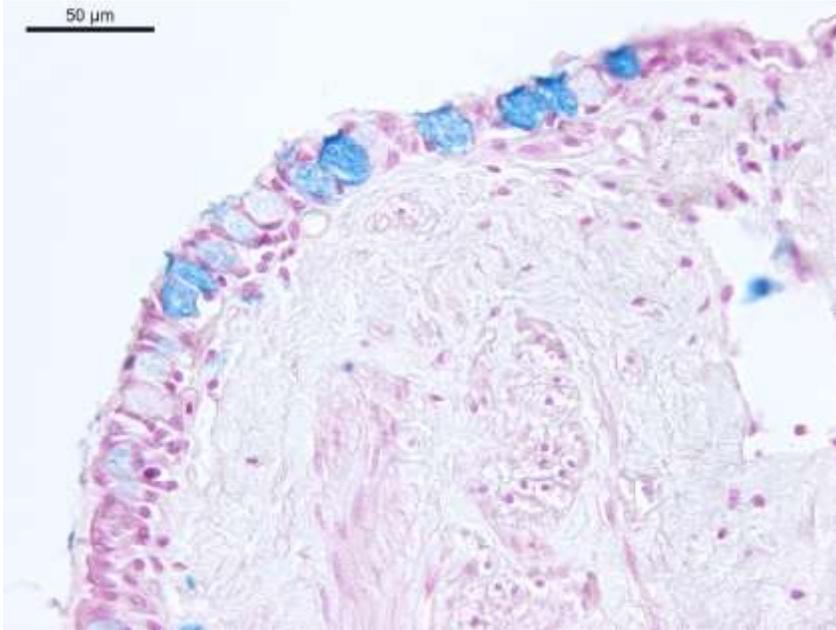


Fig. 45. Impregnação pela prata: Reticulina de Gömori
Fibras reticulares em preto.
Fígado.

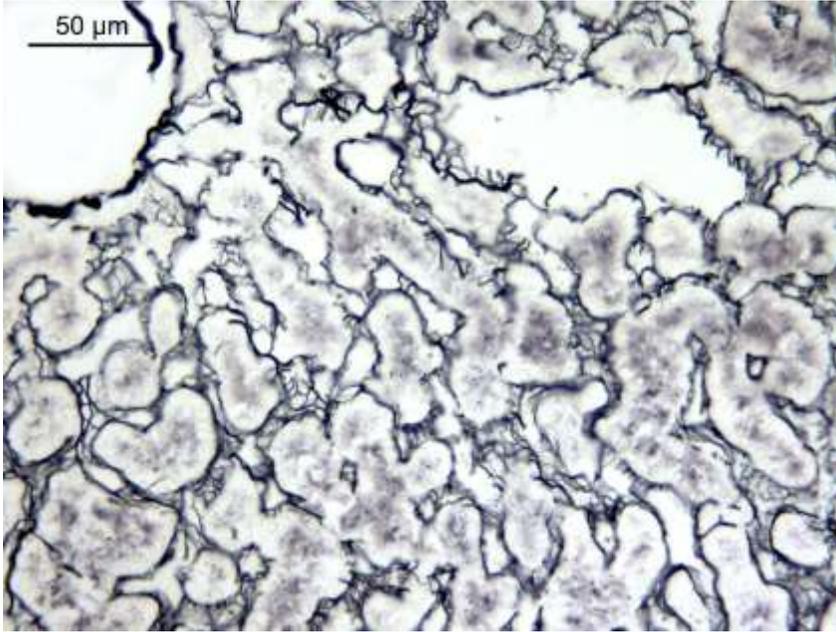


Fig. 46. Coloração pelo PAS (ácido periódico + reativo de Schiff)
Estruturas PAS-positivas em magenta.
Contra-coloração: hematoxilina de Harris
Estômago de anfíbio anuro.

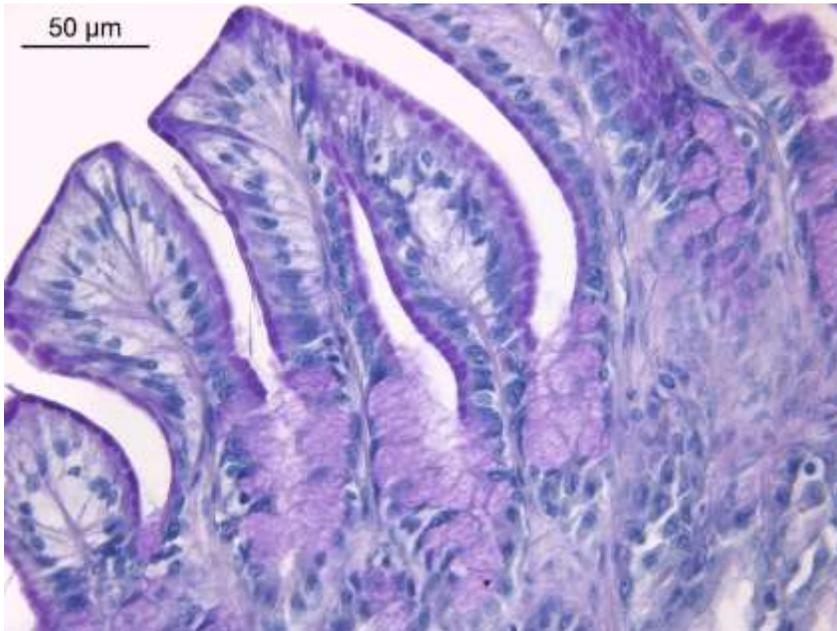


Fig. 47. Método de Grimélius
Grânulos de células cromafins em marrom
Coloração de fundo: solução aquosa de ácido pícrico
Intestino de porco

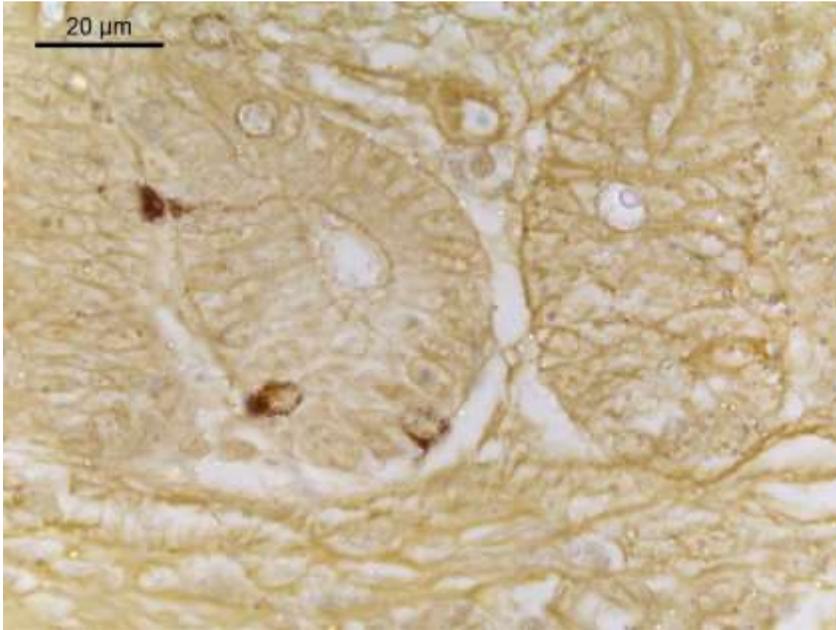


Fig. 48. Imuno-histoquímica (método indireto)
Anticorpo anti-alfa-actina de músculo liso (HHF35, DAKO)
Septo pulmonar (pulmão de anfíbio anuro).

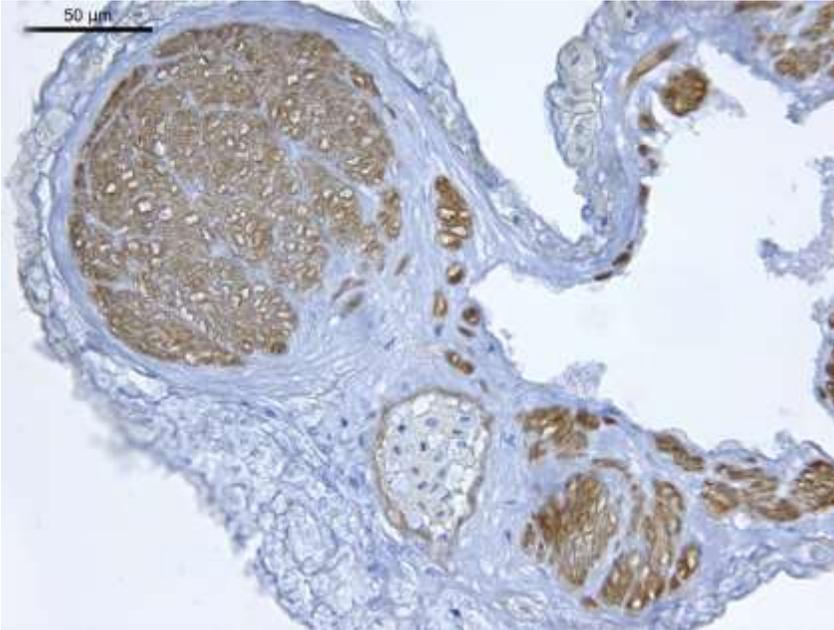
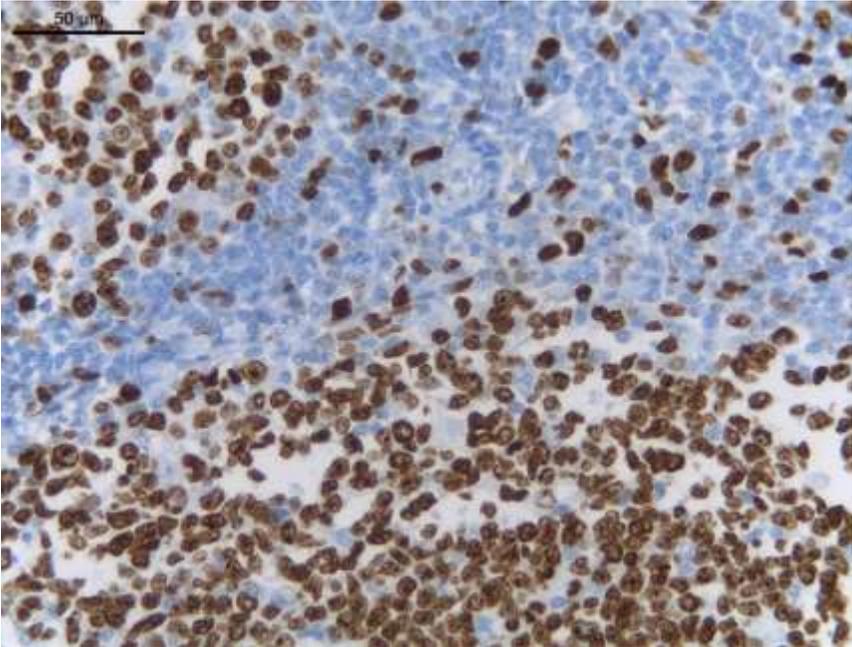


Fig. 48. Inmuno-histoquímica (método indirecto)
Anticorpo anti-Ki67 (DAKO)
Tonsila palatina (humana)



Literatura

- ASSIS, E. 2020. **Manual de Boas Práticas em Patologia**. Sociedade Brasileira de Patologia. 92p.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. 1996. **Theory and Practice of Histological Techniques**. 4th Ed. Nova York: Churchill Livingstone.
- BARKA, T.; ANDERSON, P.J. 1963. **Histochemistry: Theory, Practice, and Bibliography**. New York: Hoeber Medical Division, 660 p.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. 1976. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos S.A., São Paulo.
- BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; NETO, A.G.F. 1975. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, 279 p.
- BENNHOLD, H. 1922. Eine spezifische amyloidfärbung mit Kongorot. **Muench Medizinische Wochenschrift**, 19: 1537-1538.
- BROOKS, S.A. 2017. **Lectin histochemistry: Historical perspectives, state of the art, and the future**. Em Pellicciari, C; Biggioggera M. (eds.) *Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1560.
- CAPUTO, L.F.G.; MOTA, M.; E.; DE BRITO-GITIRANA, L. 2010. **Técnicas citológicas**. Volume 2, Capítulo 4, em *Conceitos e Métodos para formação de profissionais em*

laboratórios de Saúde. Organização de Molinario, E.; Caputo, L.; Amendoeira, R. pág. 208-210.

CONN, H.J.; DARROW, M.A.; EMMEL, V.M. 1960. **Staining procedure used by the Biological Stain Commission**. 2nd ed. William and Wilkins Company.

COOK, H.C. 1974. **Manual of Histological Demonstration Techniques**. London: Butterworth-Heinemann, 314 p.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. 1985. **Cellular Pathology Technique**. 4 ed. Philadelphia: Elsevier, 150 p.

DE BRITO-GITIRANA, L; VIANA-TRINDADE, A. 2000. Direct blue staining plus polarization microscopy: An alternative dye for polarization method for collagen detection in tissue sections. *Journal of Histotechnology*, 23: 347-349.

EINARSON, L.A. Method for progressive selective staining of Nissl and nuclear substance in nerve cells. *American Journal of Pathology*, 8: 295-308, 1932.

FERNANDES, M.C. **Métodos escolhidos de técnica microscópica**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1943. 611 p.

FISBERG, R.M.; TORRES, E.A.F.S.; MORIMOTO, J.M., FISBERG, M; ARAVA, L.H., VERA, A.G., TOSTADO, E.C., LOYOLA, M.A.A., GARCIA, O.P., ALMEIDA, N. 202. Estimativa do consumo de EDTA em escolares. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição*, 24: 71-83.

FIORUCCI, A.R.; SOARES, M.H.F.B.; CAVALHEIRO, E.T.G. 2001. O conceito de solução tampão. *Quimica Nova na Escola*, nº 13, 18-21.

- GOMORI, G. 1937. Silver impregnation of reticulum in paraffin sections. *American Journal of Clinical Pathology*, 13: 993-1002.
- GOMORI, G. 1950. A rapid one-step trichrome stain. *American Journal of Clinical Pathology*, 20: 661-664.
- GÓMEZ-SANTOS, L. ALONSO, E., DÍAZ-FLORES, L., MADRID, F.J., SÁEZ, J.F. 2017. Characterization by lectin histochemistry of two subpopulations of parietal cells in the rat gastric glands. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65: 261-272.
- GROCOTT, R.G. 1955. A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *American Journal of Clinical Pathology*, 25: 975-979.
- GROCOTT, R.G. 1955. A Stain for Fungi in Tissue Sections. *American Journal of Clinical Pathology*, 25: 975-979.
- HENWOOD, A. 2002. The Orcein stain - A versatile stain for histopathology. *The Journal of Histotechnology*, 25: 29-31.
- HIGHMAN, B. 1946. Improved methods for demonstrating amyloid in paraffin sections. *Archives of Pathology*, 41: 559-562.
- JUNQUEIRA, L.C.V; BIGNOLAS, G; BRENTANI, R.R. 1979. Picosirius staining plus polarization microscopy. A specific method far collagen detection in tissue sections. *Histochemical Journal*, 11: 447-455.
- KIERNAN, J.A. **Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice.** 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.

- KLÜVER, H.; BARRERA, E. 1953. A method for the combined study of cells and fibers in the nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 12: 400-403.
- LENNERT, K. 1978. **Malignant Lymphomas Other than Hodgkin's Disease: Histology · Cytology · Ultrastructure · Immunology**. Springer, p. 73-82.
- LEONG, A.S.Y. 1996. Principles and Practice of **Medical Laboratory Science: Basic Histotechnology**. London, p. 59-60.
- LIIKANEN, E. 2019. Practicing histotechnologists identify the core competencies needed by newly graduated biomedical laboratory scientists in histotechnology and histology. *Medical Science educator*, 29: 923-927.
- LILLIE, R.D; ASHBURN, L.L. 1943. Supersaturated solutions of fat stains in dilute isopropanol for demonstration of acute fatty degeneration not shown by Herxheimer's technique. *Archive of Pathology*, 36: 432-440.
- LILLIE, R.D.; FULLMER, H. M. 1976. **Histopathologic Technic and Practical Histochemistry**. New York: McGraw-Hill Companies, 942 p.
- LUNA, L.G. 1968. **Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces** Institute of Pathology. 3 rd ed.; New York; McGraw-Hill Book Company. 258 p.
- MALLORY, F.B. 1938. **Pathological technique**. Philadelphia: WB Saunders, p. 152-153.
- MARSHALL, P.N. 1983. Papanicolaou staining: a review. *Microscopic Acta*, 87: 233-243.

- MARSLAND, T.A.; GLEES, P.; ERIKSON, L.B. 1954. Modification of the Glee's silver impregnation for paraffin sections. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 13: 587-591.
- MCMANUS, J.F.A. 1946. Histological demonstration of mucin after periodic acid. *Nature*, 158: 202.
- MOWRY, R.W. 1956. Alcian blue techniques for the histochemical study of acid carbohydrates. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 4: 407.
- NONIDEZ, J.F. 1939. Studies on the innervation of the heart: I. Distribution of the cardiac nerves, with special reference to the identification of the sympathetic and parasympathetic postganglionic. *American Journal of Anatomy*, 65: 361-413.
- OLIVEIRA, L.R.; SOUZA, D.P.; MENEZES, A.P.; PEREIRA, G.P.; BOTELHO, P.A.; LOPES, P.F.R.; OBERLENDER. Técnica de maceração na confecção de esqueletos do laboratório de anatomia veterinária do Campus muzambinho. 8ª Jornada Científica e Tecnológica do Ifsuldeminas. 5º Simpósio de Pós-Graduação. Acessível em <https://jornada.ifsuldeminas.edu.br/index.php/jcmuz2/jcmuz2/paper/viewFile/4402/3036>.
- PERLS, M. 1867. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten. *Archiv für pathologisch Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 39: 42-48.
- PINTO, V.P.T.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S. 1999. Lectinas em cancerologia: Revisão. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, 12: 144-152.

- PREECE, A. 1972. **A Manual for Histologic Technicians**. Little Brown and Co. 3rd edition. 428p.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. 1994. **Laboratory Methods in Histotechnology**. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C., American Registry of Pathology, 1994. pp. 274.
- SCOTT, J. E.; DORLING, J. 1965. Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by Alcian Blue in salt solutions. *Histochemie*, 5: 221-223.
- SONG, Y.; YIN, J.; CHANG, H.; ZHOU, Q.; PENG, H.; JI, W.; SONG, Q. 2018. Comparison of four staining methods for detecting eosinophils in nasal polyps. *Scientific Reports*, 8: 17718.
- TRINDADE, A.V.; BRANDÃO, A.P.A.; SOUSA, AF; FARIAS CF, BRANDAO APS; DE BRITO-GITIRANA L. 1998. Enhancement of the paraldehyde-Fuchsin staining. *Journal of Histotechnology*, 21:147–150.
- STREET, C.M. 1952. Papanicolaou Techniques in Exfoliative Cytology. IN *Laboratory Technique in Biology and Medicine*, 3rd ed. EV Cowdry Editor, Williams & Wilkins, Baltimore, p 253.
- SOUZA, A.; CRUZ, A.C.; VILELLA, B.T.X.; COTTA-PEREIRA, G. 1985. O Sistema de fibras elásticas e sua participação no ligamento anular e membrana da janela redonda. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, 51, 16-25.

SWEAT, F., PUCHTLER, H., ROSENTHAL, S.I. 1964. Sirius red F3BA as a stain for connective tissue. *Archives of Pathology*, 78: 69-72.

TUCKETT, F.; MORRIS, K.G. 1988. Alcian blue staining of glycosaminoglycans in embryonic material: Effect of different fixatives. *The Histochemical Journal*, 20: 174-182.

VERHÖEFF, F.H. 1908. Some new staining methods of wide applicability, including a rapid differential stain for elastic tissue. *The Journal of American Medical Association*. 876-876.

WEIGERT, C. 1898. Über eine Methode zue Färbung elastischer Fasern. *Zentralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie*, 9: 289-292.

Lycia de Brito Gitirana

Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos

O principal propósito do livro "Técnicas Histológicas: Conceitos Básicos da Coleção Conhecendo é oferecer uma base sólida sobre os fundamentos da técnica histológica.

O leitor encontrará técnicas histológicas aperfeiçoadas ao longo da trajetória acadêmica da autora.

O objetivo é apresentar, em uma fonte única, os princípios básicos e os métodos elaborados para preparação de amostras a serem analisadas pela microscopia de luz.

O leitor também poderá acessar a base da técnica de imuno-histoquímica e histoquímica com lectinas, além de instruções sobre o preparo de soluções.

ISBN: 978-65-01-02344-1

