

Capítulo 3

Técnicas histológicas

Luzia Fátima Gonçalves Caputo

Lycia de Brito Gitirana

Pedro Paulo de Abreu Manso

A histologia é a ciência que estuda as células no contexto da estrutura tecidual e a inter-relação delas com os constituintes da matriz extracelular. A histotecnologia proporciona o entendimento dos fundamentos técnicos para a análise dos elementos teciduais, normais ou patológicos, isto é, suas células e os elementos da matriz extracelular, abrangendo diversas técnicas histoquímicas.

Os procedimentos técnicos aplicados na histotecnologia incluem técnicas citoquímicas, histoquímicas, imuno-histoquímicas, voltadas para a pesquisa científica e para o diagnóstico patológico, além de análises em nível de microscopia eletrônica. Neste capítulo, serão realizadas considerações somente sobre as técnicas histológicas voltadas para a análise histoquímica e imuno-histoquímicas dos tecidos.

A técnica histológica representa um conjunto de procedimentos técnicos que, inicialmente, se difundiu entre os diversos profissionais das ciências naturais, como os botânicos e zoologistas, sendo empregada também pelos anatomistas e histologistas da época. Geralmente, os estudiosos utilizavam um

microscópio simples para descrever os tecidos; porém, somente duzentos anos após a descoberta do microscópio, a utilização da técnica histológica foi utilizada como ferramenta para diagnóstico histopatológico. Por volta de 1828, Rudolph Virchow, médico alemão e antropologista, utilizou a análise histopatológica como ferramenta básica e essencial em qualquer laboratório de histologia e/ou anatomia patológica para elaborar as bases da patologia celular.

Histotecnologista, ou histotécnico, é a designação conferida ao profissional responsável por executar a técnica histológica para atuar em instituições de saúde, instituições voltadas à pesquisa científica e ao controle de qualidade, normalmente em laboratórios de histo ou anatomopatologia. Sua função, além de ser essencial aos serviços de saúde, pelo apoio ao diagnóstico e ao tratamento de pacientes, está também localizada de forma central no moderno paradigma médico anatomoclínico.

Os procedimentos utilizados para se obterem amostras de tecido ou preparados histológicos retirados de um organismo para exame microscópico incluem: coleta do material, fixação, clivagem, processamento, inclusão, microtomia (corte) e coloração. No caso de tecidos calcificados, o material é descalcificado após a fixação e, em seguida, realizam-se os outros procedimentos, os quais discutiremos um a um.

Vale a pena ressaltar a importância do planejamento para a execução de qualquer procedimento que envolva a técnica histológica, pois tal planejamento facilita e evita acontecimentos indesejados durante a realização de qualquer etapa desse processo. De forma geral, a organização é um dos principais fatores para se criar um ambiente seguro para o desempenho do trabalho. Um laboratório limpo e organizado é fundamental para se desenvolver um bom trabalho, ao contrário de um que apresente bancada entulhada por materiais e sem espaço adequado para a realização dos procedimentos. Deve-se evitar também empilhar caixas e deixar coisas pelo chão, obstruindo ou dificultando o trânsito dos trabalhadores no laboratório.

1. Coleta, fixação e clivagem

A . Coleta

Consiste em remover amostras de tecido de um determinado organismo. Essa coleta pode ser feita quando o organismo ainda está vivo, por meio de biópsia ou durante uma cirurgia, ou mesmo *post mortem*, durante a realização de necropsia de animais ou seres humanos.

Quando a coleta é realizada para diagnóstico de determinada enfermidade, o material originado de necropsia ou biópsia deve ser previamente analisado por um patologista, o qual fornecerá o laudo macroscópico, ressaltando aspectos macroscópicos da peça anatômica, como cor, tamanho e aparência do órgão analisado. Durante a coleta, também devemos respeitar algumas regras que são fundamentais para a boa qualidade final da amostra, que serão abordadas mais adiante.

Após a coleta, o material deve ser registrado em um livro próprio de protocolo, para registro. Por meio desse registro, o material será identificado por um número, que o acompanhará durante todos os procedimentos da técnica histológica. Em instituições credenciadas para realizar procedimentos histopatológicos, o material obtido cirurgicamente deve ser acompanhado de uma ficha com o pedido da análise histopatológica, contendo a identificação do órgão e as datas da fixação e de entrada do material no laboratório. Essa ficha técnica deverá conter a identificação do paciente (nome, sexo, cor, idade, estado civil, nacionalidade, naturalidade e profissão) e, no caso de paciente de rede hospitalar, deverão ser informados sua qualificação (registro ou número do leito), registro ambulatorial, ou consultório particular, identificação do médico responsável, data da intervenção cirúrgica, descrição da biópsia, morte ou necropsia, e outros dados que o médico julgar importantes, que auxiliarão o histopatologista no diagnóstico.

Para material proveniente de trabalhos experimentais com animais em instituições de pesquisa credenciadas, o registro deverá ser feito após a eutanásia, em livro próprio. No livro de registro experimental devem constar a identificação do laboratório, a data da eutanásia, os órgãos colhidos, o tipo de procedimento realizado com o animal experimental (por exemplo, infecção), o título do projeto e as observações necessárias para avaliação do pesquisador ou tecnologista. Atualmente, deve-se realizar também o registro no comitê de ética da instituição, que aprovará a realização da pesquisa, fornecendo o número de protocolo. Esse número é importante, pois deve ser informado ao se elaborar um trabalho científico, seja uma dissertação de mestrado, tese de doutorado, publicação em revista indexada, ou outro meio de divulgação científica. Tratando-se de animal experimental nativo, originário diretamente do meio ambiente, o pesquisador deve submeter o seu projeto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Ibama) a fim de obter uma autorização para coleta, sem a qual poderá estar sujeito a sanções da legislação vigente. Sem esses registros, o material não poderá ser manipulado no laboratório, podendo o responsável pela coleta responder a processo na Justiça por desrespeito às leis vigentes no território nacional.

Notas de biossegurança

Todo material biológico coletado para análise é potencialmente infectante. Assim, deve-se ter muito cuidado durante a coleta e a manipulação dos espécimes, utilizando sempre os equipamentos de proteção individual (EPI). É imprescindível, durante os procedimentos de coleta, o uso de luvas, jaleco, máscara e óculos de proteção. Você deve ainda procurar se informar na instituição sobre qual é a política de descarte de material infectado. Nunca descarte material biológico ou seus derivados em lixo comum.

B. Fixação

Você alguma vez refletiu sobre o que acontece quando esquecemos um pedaço de carne fora da geladeira? Por que a carne apodrece? O que, realmente, acontece com esse material?

Ao se remover qualquer material (órgão ou tecido) de um organismo após a sua morte, esse material inicia um processo de autólise, ou seja, por não receber o suprimento necessário de oxigênio e de substâncias essenciais ao seu funcionamento, começa a haver acúmulo de dióxido de carbono nos tecidos e, em suas células, inicia-se o processo autolítico, no qual enzimas lisossomais atuam no citoplasma da própria célula.

Ao se colocar um pedaço de carne na geladeira, esse processo é atrasado; porém, fora da geladeira a autólise é acelerada.

Assim, ao se analisar as estruturas teciduais de um determinado órgão ao microscópio, precisa-se preservar os tecidos, sendo imprescindível a realização do processo de *fixação*.

A fixação é uma das etapas mais importantes da técnica histológica, pois visa interromper o metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares, preservando e conservando os elementos teciduais, além de permitir a penetração de outras substâncias subsequentes à fixação.

Diversos protocolos de fixação e tipos de fixadores são citados na literatura técnica; porém, nenhum desses procedimentos de fixação é reconhecido como perfeito. Alguns fixadores se revelam excelentes para determinadas estruturas tissulares, enquanto outros são preferenciais para as células ou mesmo excelentes para análise da bioquímica tecidual. Além disso, há, também, fixadores indicados para a preservação da antigenicidade dos elementos teciduais que serão analisados pela imuno-histoquímica, em contraste com aqueles que não preservam as moléculas antigênicas. Porém, não existe um fixador ideal que

alcance todos os objetivos da fixação, mas deve-se investigar qual o fixador mais apropriado para o tipo de material a ser analisado. Por essa razão, deve-se consultar a literatura científica antes de se realizar qualquer tipo de experimento ou intervenção cirúrgica.

Basicamente, existem dois tipos de fixação: a física e a química. De fato, sempre se utiliza uma associação dos dois tipos de fixação, pois mesmo a fixação química sempre pode sofrer a influência de um fator físico ambiental, como a temperatura. Outros fatores físicos podem influenciar na fixação, como as ondas eletromagnéticas (micro-ondas) e a agitação molecular (ultrassom).

A fixação química é obtida quando se utilizam substâncias químicas capazes de formar reações com os sítios das biomoléculas, estabilizando-as e impedindo a alteração tecidual, tanto química quanto física.

Inicialmente, os fixadores eram divididos em duas classes: (1) fixadores coagulantes ou desnaturantes, que precipitam as proteínas dos tecidos. Esses fixadores também são chamados de fixadores não aditivos, pois não se ligam às proteínas; (2) fixadores não coagulantes ou aditivos, que se ligam às proteínas, precipitando-as.

Sabe-se pouco sobre os efeitos dos fixadores químicos; porém, na técnica histológica se utiliza uma ou mais substâncias químicas, denominadas líquidos ou misturas fixadoras, reunindo várias substâncias numa tentativa de superar as desvantagens de uma determinada substância pela vantagem de outra substância adicionada à mistura. Tais misturas são capazes de agir sobre os tecidos de forma a buscar a melhor preservação dos elementos teciduais.

A escolha de um fixador depende da natureza do processo patológico presente no tecido, da estrutura celular e/ou tecidual, ou, então, da natureza bioquímica do elemento que se deseja preservar. Por essas razões, o histotécnico deve conhecer os diversos tipos de fixadores e saber qual a compatibilidade do fixador com os diversos métodos de coloração, com a propriedade antigênica

do elemento tecidual, visando adequar o tipo de fixador com a propriedade dos vários tipos de tecidos. Essas informações são importantes para auxiliar o pesquisador ou o patologista.

Atualmente, com frequência se utiliza a classificação de fixadores descrita por Leong (1996), que teve como base a classificação desenvolvida por Hopwood (1977), sem muitas alterações. Leong classificou as substâncias fixadoras da seguinte maneira:

- **Fixadores aldeídos:** formaldeído, glutaraldeído e paraformaldeído comercial.
- **Agentes oxidantes:** tetróxido de ósmio, dicromato de potássio, permanganato de potássio e ácido crômico.
- **Agentes desnaturantes ou coagulantes de proteínas:** metanol, etanol, acetona e ácido acético.
- **Mecanismo desconhecido:** cloreto de mercúrio, ácido pícrico e sais de zinco.
- **Combinação de reagentes:** tetróxido de ósmio e glutaraldeído, tetróxido de ósmio e iodeto de zinco, glutaraldeído e carbodiamida e formaldeído com glutaraldeído.
- **Fixação a seco:** carbowax 6000 (20% de polivinil – álcool ou 20% de polietileno glicol) ou fixação no vapor.
- **Micro-ondas:** fixação pelas ondas eletromagnéticas com ou sem a utilização de agentes fixadores.

Será dada maior atenção aos fixadores aldeídos, pois estes são fixadores à base de aldeídos de amplo uso nos laboratórios de anatomia patológica e de histologia.

Os fixadores aldeídos comumente utilizados são o formaldeído, o glutaraldeído, e o paraformaldeído, que é o próprio formaldeído na sua forma

pura polimerizada. Esses fixadores formam ligações cruzadas com as proteínas tissulares, tornando-as insolúveis em forma de um gel.

Dentre os fixadores aldeídos, o formaldeído comercial é o mais usado na rotina histológica devido ao seu baixo custo financeiro, além de ser de fácil preparo. Contudo, algumas considerações se fazem necessárias. O formaldeído comercial, um gás incolor, é comercialmente fornecido em solução na concentração de 37% ou 40%. Ao se preparar uma solução à base de formaldeído comercial a 10%, de fato a solução estará a 3,7% ou 4%; apesar disso, convencionou-se chamar essa solução de formalina, ou formaldeído a 10%. Outro ponto importante a se mencionar é que o formaldeído, na presença de água, encontra-se na sua forma monomérica. Já o paraformaldeído, por ser livre de metanol, é muito utilizado para a fixação de tecidos a serem analisados pela microscopia eletrônica, pois o metanol pode ocasionar grandes prejuízos, interferindo nas análises ultraestruturais. Porém, o paraformaldeído comercial tem sido recomendado para análise imuno-histoquímica. Na realidade, o formaldeído contém polímeros de paraformaldeído comercial, mas que só serão hidrolisados quando diluídos em água.

Quando o formaldeído é exposto à luz, isto é, ao oxigênio atmosférico e tecidual, ocorre a oxidação do formaldeído, formando ácido fórmico. O ácido fórmico pode se precipitar nos tecidos sob a forma de um pigmento de coloração marrom, sendo considerado um artefato. Para se evitar a formação desse precipitado, deve-se preparar o fixador em soluções tamponadas, ou, então, adicionar carbonato de cálcio (giz) para neutralizar a ação do pH da solução. Contudo, o giz só é recomendado em último caso, pois poderá deixar áreas de pseudocalcificação tecidual.

A seguir, encontram-se alguns dos fixadores aldeídos e suas principais características:

• **Formalina 10%**

Formaldeído comercial	100 mL
Água destilada	900 mL

Características:

- solução hipotônica (células intumescidas);
- pode levar à deposição de pigmento formólico;
- baixo custo;
- fixa bem as proteínas.

Tempo de fixação: 24-48 horas.

Lavagem: água corrente por 1 ou 2 horas.

Tratamento prévio dos cortes para a retirada do pigmento formólico

- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.
- Imergir os cortes em uma solução saturada de ácido pícrico em etanol 95% por 24 horas.
- Lavar as lâminas em água corrente até desaparecer a cor amarela do ácido pícrico.
- Seguir com o protocolo da coloração desejada.

Notas de biossegurança

Ao manipular formaldeído, ou soluções contendo essa substância, deve-se fazer uso de luvas, máscara com filtro próprio para vapores orgânicos, em local arejado e com exaustão. O preparo de soluções fixadoras deve ser feito em capela de exaustão. Por serem muito voláteis e sensíveis à luz, as soluções contendo formaldeído devem ser guardadas ao abrigo da luz em vidro âmbar firmemente fechado. O formaldeído é tóxico quando ingerido, inalado ou em

contato com a pele. A inalação deste composto pode causar irritação nos olhos, nas mucosas e no trato respiratório superior. Em altas concentrações, pode causar bronquite, pneumonia ou laringite. Este composto é classificado como carcinogênico e teratogênico. Nunca descarte soluções contendo formaldeído ou outras soluções fixadoras em esgoto sanitário convencional; procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

• **Formol-salino**

Formaldeído comercial.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Cloreto de sódio.....	9 g

Características:

- solução isotônica;
- pode levar à deposição de pigmento formalínico;
- indicado para algumas reações histoquímicas.

Tempo de fixação: 24 a 48 horas.

Lavagem: água corrente por 1 a 2 horas.

Indicado para algumas reações histoquímicas.

• **Formalina tamponada de Carson ou formalina em tampão Millonig**

Formaldeído comercial	100 mL
Água destilada.....	900 mL
Fosfato de sódio monobásico.....	18,6 g
Hidróxido de sódio.....	4,2 g

Características:

- utilizar solução isotônica em pH 7,2 - 7,4 (310 mOsm);

- indicado para a microscopia eletrônica e microscopia de luz;
- provoca menor extração de elementos celulares;
- microtomia sofrível de tecidos com muito sangue;
- não interfere na maioria das colorações;
- fixa muito bem a maioria dos tecidos;
- preserva a imunoreatividade de hormônios gastrintestinais, quando preparado com paraformaldeído comercial no lugar do formaldeído comercial.

Tempo de fixação: 24 a 72 horas.

Lavagem: água corrente por 1 a 2 horas.

• Formalina-alcoólica

Formaldeído comercial.....100 mL

Álcool 95%.....900 mL

Características:

- utilizada para a observação de minerais (cobre, magnésio, ferro e cálcio); indicada para tecido nervoso, parasitas, glicogênio, amiloide e mucossubstâncias.

Tempo de fixação: 24 a 48 horas.

Lavagem: álcool 95% por 1 hora iniciando a desidratação.

• Formalina neutra tamponada 10%

Formaldeído comercial.....100 mL

Água destilada.....900 mL

Fosfato de sódio monobásico.....4 g

Fosfato de sódio dibásico.....6,5 g

Características:

- solução hipotônica (células intumescidas);
- aproximadamente 165 mOsm;
- pH 6,8;
- é indicada para células pancreáticas, bactérias, alguns tipos de carboidratos, células do tecido conjuntivo, fungos, minerais, tecido nervoso, pigmentos e glândulas.

Tempo de fixação: 24-72 horas.

Lavagem: água corrente por 1 ou 2 horas.

• **AFA ou FAA – álcool - formalina - ácido acético:**

Etanol (95 - 100%).....	85 mL
Formaldeído comercial.....	10 mL
Ácido acético glacial.....	5 mL

Características:

- é um fixador de rápida penetração;
- preserva relativamente bem a morfologia, ácidos nucleicos e carboidratos;
- os lipídeos não são preservados;
- misturar no momento do uso;
- muito utilizado para fixar helmintos.

Tempo de fixação: 4 a 48 horas em tecidos e 10 a 30 minutos para esfregaços e/ou distensões.

Lavagem: direto para o álcool 95% do processador.

Vários são os fatores que influenciam no processo da fixação, interferindo diretamente na preservação tecidual e, em última instância, no tecido que se deseja observar. Assim, deve-se analisar criteriosamente o protocolo de fixação para identificar os fatores que podem influenciar diretamente na fixação do tecido a ser analisado e conseqüentemente interferir na preservação tecidual.

Esses fatores são:

- temperatura;
- espessura do tecido;
- penetração;
- tempo de fixação;
- escolha do fixador;
- relação volume do fixador tamanho do espécime;
- estocagem apropriada;
- pH do fixador;
- osmolaridade da solução fixadora;
- adição de sais na mistura;
- concentração dos fixadores.

C. Clivagem

A clivagem consiste em reduzir as dimensões dos fragmentos dos tecidos coletados. Dependendo do tipo de fixador empregado, a clivagem poderá ocorrer em até algumas horas após a fixação. Na clivagem ideal, os fragmentos devem atingir cerca de 3 mm de espessura; porém, dependendo do tipo de órgão, esse fragmento pode chegar a mais do que 5 mm (Figuras 1 e 2).

Figura 1. Clivagem de coluna vertebral de camundongos Swiss webster.



Figura 2. Clivagem com 3mm de espessura.



A redução das dimensões do fragmento facilita a penetração dos fixadores e a difusão dos reagentes durante as demais etapas do processamento dos tecidos.

Para uma boa análise histológica, devemos respeitar algumas regras durante a coleta, a fixação e a clivagem:

- fixar o tecido logo após a coleta da amostra;
- retirar, primeiramente, os órgãos conhecidamente com alto metabolismo, pois são os primeiros a sofrer autólise;
- nunca comprimir o material a ser fixado com pinça ou qualquer outro instrumental, pois a força imprimida pode causar distorção da estrutura tecidual;
- para se obter uma boa fixação de órgãos encapsulados, a cápsula deve ser removida;
- os fragmentos devem possuir preferencialmente 3 mm de espessura, pois geralmente os fixadores não penetram mais do que isto em tempo hábil de evitar a autólise.

- para se obterem fatias delgadas de órgãos compactos, como fígado, baço, rins, entre outros, coloque-os sobre uma placa de cortiça ou placa de Petri, previamente revestida com parafina, e com uma gilete nova e afiada proceda à confecção dos fragmentos;
- como os fragmentos frequentemente se deformam durante a fixação, é conveniente que, após essa etapa, sejam novamente clivados com gilete, de modo que cada fragmento apresente uma superfície lisa de corte que servirá não somente de orientação ao técnico durante o processo de inclusão, mas também auxiliará a etapa subsequente, ao se desbastar o bloco;
- usar, no mínimo, vinte vezes o volume de fixador em relação ao volume dos fragmentos a serem fixados. Agitar, suave e periodicamente, os fragmentos dos órgãos durante a fixação do material para que o fixador se misture uniformemente no frasco;
- os frascos utilizados para a fixação devem ter boca larga, pois, além de facilitar o acesso aos fragmentos, ou mesmo aos órgãos inteiros, esses costumam aumentar seu volume após a fixação;
- nunca coloque o material a ser fixado em um frasco vazio, pois este pode se aderir à superfície do vidro, impedindo que o fixador penetre na área em contato com o vidro;
- acondicionar os tecidos clivados em cassetes histológicos identificados (Figuras 3 e 4).

Figura 3. Espécime clivado e acondicionado em cassetes histológicos.



Figura 4. Cassete identificado pronto para o processamento.



Notas de biossegurança

Durante o procedimento de clivagem do material, tome muito cuidado com as navalhas e giletes utilizadas. O material perfurocortante, bem como os restos de material biológico, devem ser descartados em lixo próprio.

2. Descalcificação

Em muitos tecidos, verifica-se a deposição de sais minerais, como cálcio e fosfato. Por exemplo, o tecido ósseo é uma especialização do tecido conjuntivo, sendo rígido e inflexível devido à presença de cristais de hidroxiapatita em sua matriz extracelular.

Em microscopia de luz, existem dois procedimentos técnicos que auxiliam o estudo do tecido ósseo: (1) a descalcificação, que remove a porção mineral e analisa somente os constituintes orgânicos do tecido ósseo; e (2) o desgaste, que permite analisar os componentes inorgânicos do tecido.

Comentaremos neste capítulo somente o procedimento da descalcificação, que visa à retirada dos componentes inorgânicos, como fosfato de cálcio presente em tecidos ósseos, em tumores ósseos ou em determinadas patologias.

A descalcificação, por remover os sais de cálcio, se faz necessária para tecidos mineralizados, pois os cristais de cálcio destroem o fio da navalha, criando “dentes” que impedem a confecção de bons cortes e levam à formação de artefatos técnicos, impedindo a análise histológica adequada.

A escolha do método de descalcificação depende da urgência, do grau de mineralização, do interesse da investigação, das técnicas de coloração que se pretende empregar e do tipo de fixador utilizado. Quanto mais rápida for a ação de um descalcificador, pior será a preservação morfológica do tecido.

A prática da descalcificação

Após a coleta o tecido, este deve ser fixado, lavado para retirar o excesso de fixador e, só então, submetido à descalcificação.

A descalcificação pode ser realizada por métodos químicos e físicos. Os métodos químicos utilizam soluções descalcificadoras em pH ácido, soluções quelantes e meios de troca iônica. Os métodos físicos estão sempre associados a descalcificação química, englobando a dissociação eletrolítica e submissão do material contido em soluções descalcificadoras, ao ultrassom e às micro-ondas, que aceleram o processo de descalcificação.

Descalcificação química

A. Descalcificação por ácidos

Os descalcificadores ácidos possuem a propriedade de solubilizar sais minerais. Na matriz inorgânica dos tecidos mineralizados, ocorrem principalmente sais de fosfato e de carbonato, que são pouco solúveis na água. Esse método possui a vantagem de ser simples; porém, recomenda-se fazer um banho neutralizante com hidróxido de amônia ou oxalato de amônia ou sódio após a descalcificação.

A desvantagem desse método é a ocorrência de dilatação e hidrólise da matriz óssea e destruição de enzimas, ácidos nucleicos e polissacarídeos.

A solução descalcificadora ácida age removendo o cálcio dos sais de carbonato ou fosfato presentes no osso, efetuando uma troca iônica que resulta na formação de um sal de cálcio solúvel. Algumas das soluções descalcificadoras constituem-se de ácidos orgânicos ou inorgânicos, que serão citados a seguir.

Existe um grande número de agentes descalcificadores ácidos, incluindo ácidos fracos ou fortes, que podem ser aquosos ou alcoólicos, diluídos ou não em agentes fixadores.

• **Ácidos fortes** - possuem maior poder descalcificante, causando dano aos tecidos, principalmente aos núcleos que são hidrolisados, o que prejudica a utilização posterior de corantes nucleares. Esse tipo de descalcificador é empregado para análises urgentes; para material não urgente, aconselham-se agentes quelantes pelos motivos que serão descritos mais adiante.

Ácido nítrico (HNO_3) - não causa o intumescimento dos tecidos e proporciona maior nitidez nas colorações. Geralmente é utilizado em concentrações de 5% a 10%, não se devendo expor o tecido a esta solução por mais de 48 horas. É um descalcificador rápido muito prejudicial ao tecido.

Ácido clorídrico (HCl) - é um dos ácidos de ação rápida mais utilizados. Geralmente é usado em solução tampão, como, por exemplo, o sulfato de sódio a 5% ou 10%, ou, ainda, diluído em álcool.

Ácido nítrico aquoso a 5%:

Ácido nítrico.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Ácido nítrico aquoso a 10%:

Ácido nítrico.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

Formalina - ácido nítrico:

Formaldeído.....	10 mL
Água destilada.....	80 mL
Ácido nítrico.....	10 mL

Fluido de Perennyi:

Ácido nítrico 10%.....	40 mL
Etanol absoluto.....	30 mL
Ácido crômico 0,5%.....	30 mL

• **Ácidos fracos** - os ácidos mais usados nas misturas descalcificadoras são o ácido acético, ácido pícrico e ácido fórmico. Os ácidos acético e pícrico também são muito utilizados em misturas fixadoras, fixando ao mesmo tempo em que descalcificam os tecidos pouco mineralizados, como os tecidos embrionários. Dentre os ácidos, o ácido fórmico é o mais utilizado na solução de 5% a 10 %.

Ácido fórmico (HCOOH) - pode ser utilizado em solução a 5% aquosa ou alcoólica, ou em mistura fixadora com o formol 10% a 20%. Geralmente é usado em soluções tampões, como o tampão citrato de sódio, que proporciona uma melhor coloração em relação ao método com ácido nítrico.

Ácido fórmico a 5%:

Ácido fórmico 90%.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Ácido fórmico a 5%:

Ácido fórmico 90%.....	5 mL
Água destilada.....	95 mL

Formalina – ácido fórmico:

Ácido fórmico 90%.....	10 mL
Formaldeído comercial.....	5 mL
Água destilada.....	85 mL

Mistura descalcificadora ácido fórmico-clorídrico:

Solução A – ácido clorídrico 8%:

Ácido clorídrico concentrado	40 mL
Água destilada.....	460 mL

Solução B – ácido fórmico 8%:

Ácido fórmico.....	40 mL
Água destilada.....	460 mL

Solução de uso: (preparar antes de usar):

Solução A.....	500 mL
Solução B.....	500 mL

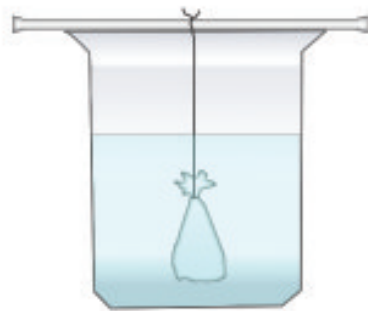
Ácido pícrico ($C_6H_2(NO_2)_3OH$) - esse ácido age muito lentamente e é utilizado principalmente em solução aquosa saturada para descalcificar tecidos embrionários. Os tecidos devem ser lavados em álcool 70% após a descalcificação para remover o precipitado amarelo.

Procedimentos gerais para a descalcificação por misturas ácidas:

1- A peça a ser descalcificada não deve possuir mais do que 5 mm de espessura. Esta deve ser clivada para isso.

- 2- O volume da mistura descalcificadora deve ser de dez a vinte vezes as dimensões da peça a ser descalcificada.
- 3- O material a ser descalcificado deve estar suspenso na mistura descalcificadora, pois o cálcio, ao sair do tecido, se deposita no fundo do frasco (Figura 5).
- 4- A mistura descalcificadora deve ser substituída a cada 24 horas. O tempo de descalcificação dependerá das dimensões da peça e do tipo de solução descalcificadora.
- 5- Ao término da descalcificação, deve-se neutralizar, os tecidos com uma solução alcalina de sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% por 24 horas.
- 6- Lavar com vários banhos de água por um período de 48 horas.
- 7- Seguir a rotina de processamento histológico.

Figura 5. Suspensão dos tecidos durante a descalcificação.



B. Descalcificação por resinas de troca iônica

Essa resina promove a aceleração do processo de descalcificação pela rápida troca iônica entre o ácido fórmico e os fosfatos ou carbonatos de cálcio tecidual, proporcionando, além da rapidez, boa preservação dos detalhes

celulares, com qualidade superior aos métodos de descalcificação por ácidos. Essa resina pode ser reaproveitada.

Resina :

WIN 3000 (resina de troca iônica)..... 100 g
Ácido fórmico em solução aquosa a 10%800 mL

Figura 6. Resina de troca iônica.



C. Métodos histoquímicos

São métodos escolhidos quando se deseja preservar enzimas (fosfatase alcalina e desidrogenases), ácidos nucleicos e polissacarídeos (glicogênio) presentes no tecido ósseo. Os métodos habituais que utilizam descalcificadores ácidos não permitem a análise dessas moléculas e substâncias.

Os métodos histoquímicos incluem dois procedimentos para a descalcificação.

• **Mistura de tampões** - nesse procedimento, os sais de cálcio são removidos do osso, quando imersos em solução tampão de citrato com pH 4,5. Uma desvantagem desse método é a inativação reversível da fosfatase alcalina, que se torna ativa após a neutralização com a solução de sódio barbital.

Procedimento para a descalcificação:

- 1- Fixar os tecidos em álcool 80% de 24 a 48 horas.
- 2- Descalcificar com a solução tampão (4°C) – o tempo de descalcificação varia de acordo com o tamanho da peça e seu grau de mineralização.
- 3- Lavar em água corrente e depois em água destilada.
- 4- Neutralizar em solução de sódio barbital a 37°C por 6 horas.
- 5- Lavar em água corrente por 6 horas.

Tampão ácido cítrico-citrato (pH 4,5):

Ácido cítrico 1N.....	50 mL
Citrato de amônio 1N.....	50 mL
Sulfato de zinco 1%.....	2 mL
Clorofórmio.....	0,1 mL

• **Agentes quelantes** - são compostos orgânicos que se ligam ao íon cálcio (metal, ver tabela periódica) formando um metal quelado, por exemplo, sequestrante ou versene (ácido etilenediaminetetracético ou EDTA). Esse método é bem lento, sem dano ao tecido. Assim, como as misturas de tampões, ele inativa a fosfatase alcalina, que é reativada após um banho de 2 a 6 horas em solução de cloreto de magnésio 6%. A descalcificação por agentes quelantes não produz artefatos durante a maioria das colorações histológicas, diferente da descalcificação por ácidos, que gera artefatos quase irreversíveis.

Descalcificantes quelantes (EDTA)

EDTA neutro:

Sal de EDTA dissódico.....250 g
Água destilada.....1.750 mL

A solução fica esbranquiçada e deve ser neutralizada ($\text{pH}=7,0$) pela adição de aproximadamente 25g de hidróxido de sódio.

Hilleman e EDTA de Lee:

Sal de EDTA dissódico.....5,5 g
Água destilada.....90 mL
Formaldeído comercial.....10 mL

Solução descalcificadora EDTA em Tampão Fosfato 0,1M:

1) Tampão fosfato 0,1 M para o preparo final da solução descalcificadora de EDTA:

Tampão fosfato 0,1 M ($\text{pH}=7,0$):

Solução A:

Fosfato monobásico de sódio.....13,7g
Água destilada.....1 L

Solução B:

Fosfato dibásico de sódio.....35,8g
Água destilada.....1 L

Para 1 litro coloca-se em um béquer 750 mL da solução B e adiciona-se gota a gota a solução A até o pH atingir o pH 7,0.

Solução de uso do descalcificador EDTA em tampão fosfato 0,1 M:
 EDTA.....100 g
 Tampão fosfato 0,1 M (solução 1)..... 1000 mL
 Acertar o pH do EDTA para 7,0 com hidróxido de sódio 10 M

Procedimento:

- 1- Suspender o espécime no líquido (Figura 5) descalcificador, com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça.
- 2- Trocar a solução descalcificadora diariamente. Se possível, manter o frasco em agitação.
- 3- Testar após duas a três semanas, para ver se já ocorreu a descalcificação.
- 4- Lavar em água por algumas horas.
- 5- Proceder ao processamento histológico.

Descalcificação física

A. Descalcificação eletrolítica ou ionização elétrica

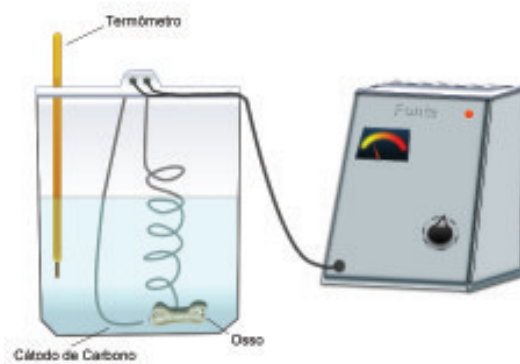
Esse método permite a formação de um campo elétrico entre dois eletrodos, fazendo os íons de cálcio migrarem rapidamente do osso (anodo) para o eletrodo de carbonato (catodo). Os radicais ácidos migram para o anodo.

É um método rápido; porém, a temperatura não deve exceder 45°C. Após a descalcificação, recomenda-se a neutralização das peças, com solução sulfato de sódio (Na_2SO_4) a 5% por 24 horas, para evitar a formação de artefatos durante a coloração. Após a neutralização, as peças devem ser lavadas em vários banhos de água por no máximo 48 horas.

Solução descalcificadora eletrolítica:

Ácido fórmico a 90%	100 mL
Ácido clorídrico.....	80 mL
Água destilada.....	820 mL

Figura 7. Descalcificação eletrolítica.



B. Descalcificação com auxílio das micro-ondas

O efeito benéfico do calor foi reconhecido antes da era das micro-ondas e foi primeiramente utilizado durante o procedimento de fixação por Ehrlich (1898) para acelerar a fixação química por meio de calor externo.

As micro-ondas penetram vários centímetros para dentro dos tecidos biológicos, e o calor produzido pode ser controlado pela potência e o tempo de exposição. O calor é o principal responsável pelos efeitos produzidos pelas micro-ondas, assim como a agitação molecular e o fluxo eletromagnético, acelerando o processo de descalcificação. Durante o aquecimento, a energia termal aumenta a dinâmica molecular, na qual a agitação molecular induzida pela oscilação do campo eletromagnético aumentará a colisão de moléculas, acelerando as reações químicas. Esse método reduz o tempo de descalcificação; o que normalmente levaria dias, nesse método levará somente algumas horas.

Deve-se imergir a peça na mistura descalcificadora de escolha e irradiar as micro-ondas.

C. Descalcificação com auxílio do ultrassom

Assim como as micro-ondas, o ultrassom acelera o processo de descalcificação, promovendo a agitação molecular, com a vantagem de não elevar a temperatura, mantendo as estruturas celulares.

Como é possível saber se a peça está totalmente descalcificada?

Existem métodos físicos e químicos que permitem controlar o momento de finalização da descalcificação.

Métodos físicos

- Manipulação do operador: tenta-se dobrar a peça ou inserir uma agulha bem fina e verificar, assim, o grau de mineralização.
- Teste radiológico: o raio-X é o método mais sensível e confiável para acompanhar a descalcificação.

Métodos químicos

- Teste do oxalato de amônia: esse método detecta a presença de cálcio no líquido descalcificador, indicando se a descalcificação está completa ou não.

Teste do oxalato de Amônia / Hidróxido de Amônia:

Soluções estoque:

Solução A – solução estoque de hidróxido de amônia 5%:

Hidróxido de amônia 28%.....5 mL
Água destilada.....95 mL

Solução B – estoque de oxalato de amônia 5%:

Oxalato de amônia.....5 mL
Água destilada.....95 mL

Solução de uso de oxalato de amônia / hidróxido de amônia

Solução A – solução estoque de hidróxido de amônia 5% - 5 mL

Solução B – solução estoque de oxalato de amônia 5% - 5 mL

A solução deve ser preparada no momento do uso.

Procedimento:

- 1- retirar 5 mL de líquido descalcificador do fundo do frasco que em se encontra a peça;
- 2- colocar em um tubo Falcon de 15 mL;
- 3- adicionar ao tubo 10 mL da solução de uso de oxalato de amônia-hidróxido de amônia;
- 4- misturar bem e deixar repousar em pé por 12 horas;
- 5- se a descalcificação for completa, o líquido se manterá límpido; caso contrário, haverá precipitação do cálcio;
- 6- esse processo deve ser repetido até que o líquido descalcificante se encontre límpido por dois dias.

Muitos inconvenientes podem ser gerados durante o processo de descalcificação e, para minimizá-los, devemos tomar alguns cuidados

Regras gerais para uma boa descalcificação:

- somente descalcificar tecidos muito bem fixados;
- reduzir ao máximo o tamanho da peça a ser descalcificada, reduzindo assim o tempo de descalcificação;

- a lavagem do material é essencial antes da descalcificação e antes do processamento subsequente;
- renovar o descalcificador diariamente, pois esse vai perdendo sua concentração original;
- o volume do líquido descalcificador deve ser no mínimo vinte vezes o tamanho da peça;
- verificar constantemente se a descalcificação foi finalizada;
- neutralizar sempre os tecidos após a descalcificação por substâncias ácidas.

Notas de biossegurança

Ao manipular soluções ácidas e agentes quelantes, deve-se fazer uso de luvas específicas para manipulação química, de máscara com filtro próprio para vapores ácidos e orgânicos, e deve-se fazê-lo em local arejado e com exaustão. O preparo dessas soluções deve ser feito em capela de exaustão. Deve-se, previamente, consultar as fichas de emergência química das soluções ácidas e quelantes antes da sua manipulação. A inalação destes compostos pode causar irritação e queimaduras.

Nunca descarte soluções ácidas em esgoto sanitário convencional, procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

3. Processamento

○ princípio do processamento histológico consiste na difusão de reagentes para o interior dos tecidos e na remoção do líquido tecidual que, após a fixação do material, é o próprio fixador empregado.

○ processamento tecidual também torna os fragmentos rígidos capazes de proporcionar o seccionamento de fatias finas e delicadas para a observação ao microscópio.

Diversas substâncias podem ser utilizadas como meio de inclusão; porém, no processamento convencional, comumente se utiliza a parafina.

O processamento para inclusão de material em parafina passa por três etapas: desidratação, clarificação e impregnação.

A. Desidratação

A desidratação consiste na remoção da água dos tecidos, pois as substâncias previamente utilizadas para inclusão em parafina não se combinam homogeneamente com a água.

Vários são os agentes desidratantes. A substância utilizada na rotina histológica é o álcool etílico, por produzir bons resultados e possuir baixo custo. Contudo, outros agentes desidratantes também são eficientes, variando apenas o tempo de desidratação.

B. Clarificação ou diafanização

A clarificação visa remover completamente o álcool do interior dos tecidos, preparando-os para as etapas subsequentes. A remoção do álcool é de extrema importância, pois a parafina não se mistura homogeneamente com o álcool. Dessa forma, é fundamental a completa remoção do álcool para que a parafina possa penetrar completamente no interior dos tecidos.

Para remover o álcool e preparar o tecido para a penetração da parafina utiliza-se, nessa etapa, o xilol. Conforme o xilol penetra o tecido, em substituição ao álcool, o material se torna mais claro, transparente. Por essa razão, essa etapa é denominada clarificação.

C. Infiltração em parafina

A infiltração dos elementos teciduais em parafina é importante, pois a parafina também é o meio de inclusão tecidual. Para a infiltração, ela deve ter

sido previamente aquecida, pois a parafina é líquida somente em temperatura entre 56°C a 60°C, sendo sólida à temperatura ambiente.

Os tecidos também podem ser infiltrados por outros meios de inclusão, necessitando de processamentos especiais dependendo do meio de inclusão.

Meios de inclusão como polietilenoglicol (carbowax), resinas hidrofílicas e hidrófobas, gelatina, dentre outros, funcionam como meios alternativos de inclusão dependendo do objetivo da análise.

O processamento dos tecidos possui variáveis que podem afetar consideravelmente os resultados do processo histológico. Dentre as variáveis, temos: condições de operação (manual ou equipamentos automático), temperatura, características e concentração dos reagentes utilizados e as propriedades químicas dos tecidos.

- **Processamento manual** (Figura 9)

Limitaremos aqui a descrição para material destinado a inclusão em parafina.

Desidratação

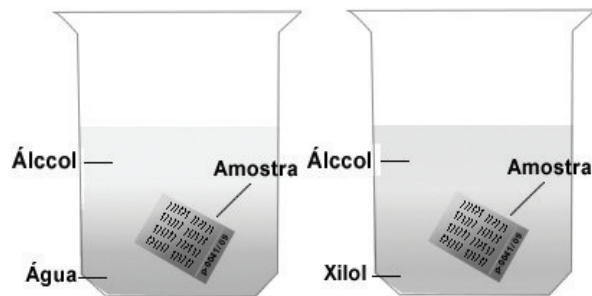
Para a desidratação adequada, é necessário que o volume do álcool seja vinte vezes o volume da amostra. Contudo, sendo a água mais densa do que o álcool, ela tende a se localizar no fundo do frasco após a sua retirada do tecido, exatamente onde a amostra se encontra (Figura 8).

Para que a desidratação seja satisfatória e a água se acumule no fundo do frasco, recomenda-se:

- agitar constantemente o recipiente, para que a água se misture ao álcool;
- realizar várias trocas de álcool, pois a água será eliminada com o álcool desprezado;

- usar recipientes de fundo largo para diminuir o nível de água;
- nunca aquecer o álcool, pois, além de ser perigoso, o meio ficará hidratado mais facilmente.

Figura 8. Material sendo desidratado e clarificado.



Clarificação

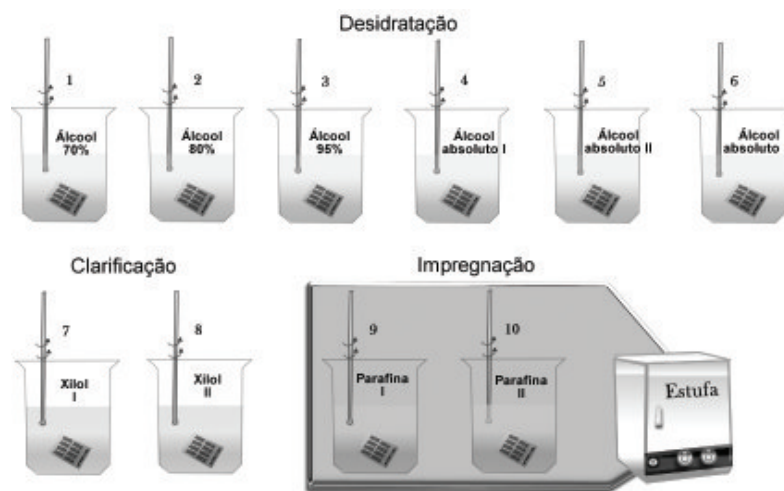
Apesar de as substâncias diafanizadoras serem insolúveis em água e solúveis no álcool, que é removido da peça durante a clarificação, deve-se tomar algumas precauções:

- agitar o frasco para melhorar a difusão (saída do álcool e entrada do xilol); antigamente, esse procedimento seria reprovado, pois como o álcool é menos denso do que a água, ele ficaria na superfície do frasco e não estaria em contato com a peça (Figura 8);
- proceder, no mínimo, a duas trocas com a substância clarificadora;
- não deixar o material por muito tempo em xilol, pois ele resseca muito o material, interferindo na sua qualidade.

Impregnação

A impregnação deve ser realizada em estufa a 60°C. Os fragmentos serão transportados de uma parafina a outra em intervalos de tempo predeterminados. Não se deve realizar somente uma passagem pela parafina, pois será insuficiente para remover todo o xilol dos tecidos. Contudo, recomenda-se nunca deixar o material permanecer na parafina por muito tempo, pois como a parafina somente é líquida em temperatura alta, o calor em um longo período de tempo poderá causar grande dano ao tecido.

Figura 9. Processamento manual de tecidos.



• Processamento automático

Existem dois tipos de equipamentos automáticos (processadores) acessíveis no mercado e que são também chamados histotécnicos ou autotécnicos.

Um tipo de processador é o carrossel (Figura 10), mais tradicional e de baixo custo, no qual os cassetes contendo os fragmentos são colocados em uma cesta que é transportada mecanicamente de forma a imergir os cassetes em cada reagente. Outro tipo possui uma câmara fechada, na qual

os reagentes são transferidos de recipiente a recipiente e, esses processadores automáticos, chamados processadores com transferência de fluidos. Ambos os equipamentos possuem doze estágios de processamento.

Alguns processadores estão acoplados a um sistema de vácuo (Figura 11) que, no do tipo carrossel, está no último banho de parafina. Nos processadores com transferência de fluidos, o vácuo pode ser incluído em todos os banhos do processo. Todo o processamento ocorre em vácuo, revelando significativa melhoria dos resultados em períodos de tempo reduzido, em comparação aos resultados obtidos no processamento sem vácuo.

É importante salientar que os recipientes com parafina para infiltração possuem termostatos que controlam a temperatura ideal de infiltração. Além disso, todos os processadores possuem agitação automática.

O trabalho com processadores automáticos é mais confiável, pois não ocorre falha humana durante o processamento. O técnico somente deve programar o aparelho e trocar os reagentes para obter um bom processamento do material. O protocolo de execução também é elaborado pelo próprio técnico e pode ser alterado a qualquer momento de forma simples e rápida.

Geralmente, os aparelhos são programados para trabalhar durante toda a noite e, no dia seguinte pela manhã, o material estará pronto para ser incluído. Outro fato considerado é quando se quer ganhar tempo na rotina laboratorial, pois se pode programar o equipamento para trabalhar durante feriados e finais de semana.

Figura 10. Processador de tecidos automático.



Figura 11. Sistema de vácuo.



Protocolos de processamento

Os protocolos de processamento variam de acordo com:

- as dimensões dos fragmentos do material a ser processado;
- tipo de reagentes utilizados;
- tipo do espécime biológico (material humano, de rato, de camundongo, entre outros);
- tipo de tecido;
- processamento automático ou manual;
- presença de vácuo.

Citaremos um dos protocolos utilizados para processamento de tecidos clivados com 3mm de espessura:

Passo	Estágio	Reagente	Duração
1	Desidratação	Álcool 70 %	1 h
2	Desidratação	Álcool 80 %	1 h
3	Desidratação	Álcool 90 %	1 h
4	Desidratação	Álcool 95 %	1 h

5	Desidratação	Álcool 100 %	1 h
6	Desidratação	Álcool 100%	1 h
7	Desidratação	Álcool 100%	1 h
8	Desidratação	Álcool 100%	1 h
9	Clarificação	Xilol I	1 h
10	Clarificação	Xilol II	1 h
11	Impregnação	Parafina I	1 h
12	Impregnação	Parafina II	2 h

Fatores que influenciam no processamento

- Temperatura;
- Vácuo;
- Agitação.

Notas de biossegurança

Todo material utilizado no processamento de tecidos é altamente inflamável. Use luvas, jaleco e máscara com filtro de proteção contra vapores orgânicos. Durante a manipulação dos reagentes, evite contato com o líquido e o vapor de xilol. Este elemento é tóxico para as vias aéreas. Quando inalado por tempo prolongado, pode causar a morte. Em caso de incêndio, extinguir com espuma, pó químico seco ou dióxido de carbono. O vapor de xilol é mais pesado do que o ar, exigindo capela com exaustão inferior. Não descarte os resíduos do processamento em esgoto sanitário comum, procure saber em sua instituição qual é a política de descarte de substâncias químicas.

4. Inclusão

A inclusão se baseia em colocar, com o auxílio de uma pinça previamente aquecida, os tecidos que foram previamente infiltrados em parafina no interior de um molde que já contém parafina líquida com a superfície a ser seccionada (a ser cortada ao micrótomo) para baixo (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Os fragmentos devem ser colocados na parafina enquanto aquecidos, evitando-se a formação de bolhas de ar em torno deles. Após o resfriamento, os blocos de parafina com o material incluído são obtidos.

Para se realizar uma boa inclusão, é necessário que o fragmento esteja completamente desidratado, clarificado e corretamente impregnado.

Quando se observa que uma dessas etapas não foi corretamente efetuada (observando áreas opacas ou esbranquiçadas no material), deve-se, nesse caso, retroceder o processamento executando-o da seguinte forma:

- remover a parafina de infiltração com vários banhos do agente clarificador (xilol);
- após a completa remoção da parafina, proceder à remoção do xilol, passando o fragmento por várias trocas do agente desidratante (álcool), ou mesmo água, caso o tecido não tenha sido desidratado corretamente;
- em seguida, desidratar e clarificar novamente;
- infiltrar e incluir o material novamente em parafina.

É importante que logo após o término da infiltração seja efetuada a inclusão, evitando que o material se torne quebradiço e retraído pelo efeito da temperatura da parafina aquecida.

Figura 12. Central de inclusão.



Figura 13. Inclusão do material.

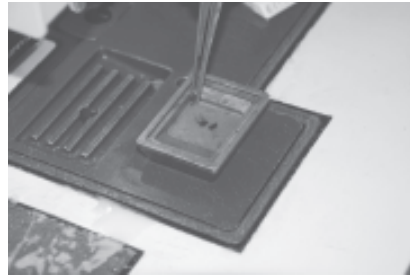
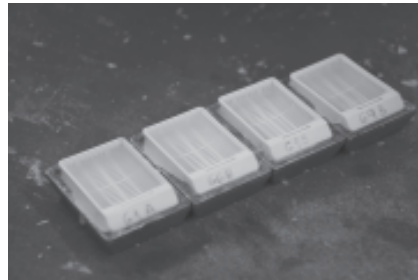


Figura 14. Coloração do suporte com identificação do tecido.



Figura 15. Blocos prontos para a microtomia.



Em alguns laboratórios de histologia, observa-se que o técnico remove os fragmentos da parafina de infiltração e deixa-os esfriar até o momento da inclusão. Esse comportamento está totalmente errado. O fragmento, ao ser novamente submetido à ação da temperatura elevada (56-58°C), pode ter sua textura consideravelmente prejudicada pelo calor. Assim, devemos incluir o fragmento logo após o término da infiltração.

A temperatura da parafina de inclusão pode estar cerca de 5°C acima do ponto de fusão da parafina. Essa temperatura é necessária para que possamos manusear o fragmento dentro do molde, que por vezes é metálico e esfria rapidamente. No mercado existem aparelhos que possuem dispositivos que auxiliam no processo de inclusão, como tanques de acondicionamento da

amostra. Nesses equipamentos, o termostato permite o controle mais preciso da temperatura.

As centrais de inclusão (Figura 12) possuem normalmente duas placas, uma aquecedora para efetuar a inclusão, e outra refrigerada para resfriar os moldes com as amostras incluídas. Essas centrais também possuem um local para aquecimento das pinças que serão utilizadas durante a inclusão. Esses aparelhos facilitam o procedimento da inclusão, principalmente por manterem a mesma temperatura de infiltração em todos os tanques e placas, diminuindo consideravelmente o tempo gasto com a inclusão propriamente dita.

Dependendo do fabricante, alguns produtos, ao serem adicionados à parafina de inclusão, alteram a sua consistência, tornando-a mais macia ou mais densa. A mudança de consistência deve ser avaliada, pois sua consistência é um fator importante na microtomia. Dentre as substâncias que podem ser adicionadas à parafina, têm-se: cera de abelha, estearina, cera de carnaúba, dietileno glicol, dentre outras.

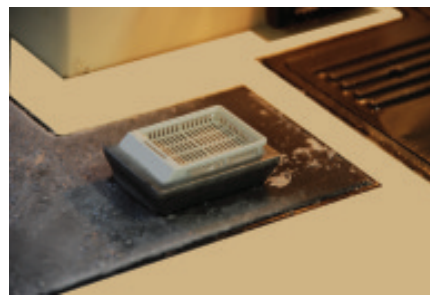
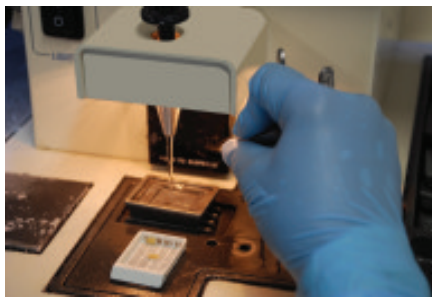
Outro fato a ser considerado é o uso de cassetes durante o procedimento até a inclusão. Os cassetes de plástico são aconselhados, pois permitem escrever, a lápis, o número de registro do material. Os cassetes também são importantes para a microtomia, pois podem ser adaptados ao micrótomo.

Procedimentos para inclusão (Figuras 13, 14, 15, 16 e 17)

- Abrir o cassete e verificar o número de fragmentos contidos no cassete.
- Selecionar o molde a ser utilizado de acordo com as dimensões dos fragmentos a serem incluídos de maneira a sobrar cerca de 2 mm de parafina nas margens do bloco.
- Preencher o molde com parafina líquida pré-aquecida.
- Com o auxílio de uma pinça, selecionar o fragmento, sem deixá-lo esfriar, e colocá-lo no molde preenchido previamente com parafina.

- Colocar a base do cassete, ou suportes, sobre o molde de maneira que a parafina entre em contato com o cassete. Se para a inclusão não se utilizar o cassete, deve-se utilizar um papel para escrever a identificação do bloco.
- Levantar o molde com o material incluído para a placa resfriada.
- Quando o molde começar a “suar”, é o momento certo de retirar o bloco do molde.

Figura 16. Procedimento de inclusão. Figura 17. Molde com material que foi incluído.



Orientação dos fragmentos

A orientação dos fragmentos de órgãos no molde é um processo importante na confecção dos cortes e análise dos tecidos. Por exemplo, órgãos tubulares, como intestinos, devem ser incluídos no plano transversal; fragmentos de músculos também devem ser incluídos, considerando-se seus planos longitudinais e transversais. Ao se incluir um fragmento de pele, deve-se considerar a análise de suas estruturas básicas, isto é, a epiderme e a derme.

Pequenos fragmentos de tecidos podem ser incluídos paralelamente, enquanto fragmentos alongados são orientados longitudinalmente.

Para melhor compreensão do sentido desses materiais durante a inclusão, sugere-se que o técnico procure atualizar seu conhecimento básico sobre a

histologia, consultando a literatura especializada ou buscando orientação com o chefe ou pesquisador do setor.

Notas de biossegurança

A parafina é altamente inflamável, mantenha esta substância longe de chamas. Evite queimaduras, pois as placas e pinças utilizadas neste procedimento são aquecidas. A inclusão deve ser realizada em local arejado ou com exaustão. Os vapores de parafina são tóxicos às vias respiratórias.

5. Microtomia

Para permitir a análise dos tecidos ao microscópio de luz, eles devem ser seccionados em fatias bem finas e uniformes. A espessura ideal varia de acordo com o objetivo de estudo; recomenda-se a espessura de 4 a 6 μm na rotina dos laboratórios.

O instrumento capaz de confeccionar cortes com tal precisão é o **micrótomo** (Figura 18), sendo constituído por três partes: corpo, porta-bloco e porta-objeto. Considera-se, ainda, que em alguns modelos possua duas manivelas, uma manivela de ajuste e outra de corte.

Existem dois tipos de micrótomos: do tipo **rotatório**, também conhecido como do tipo Minot, em que o material, no porta-objeto, vai de encontro à navalha que está imóvel no porta-navalha; e o do tipo **corrediça**, que avança o porta-navalha e vai de encontro ao porta-objeto onde se encontra a amostra.

Encontram-se à venda no mercado diversos modelos dos dois tipos de micrótomo, podendo ser automáticos ou manuais. Muitos micrótomos foram desenvolvidos para confeccionar cortes a partir de blocos de parafina, outros, para realizar cortes congelados, e há ainda aqueles micrótomos específicos para a microscopia eletrônica, chamados ultramicrótomos, capazes de confeccionar cortes ultrafinos. A título de conhecimento geral, iremos descrever alguns destes modelos.

Figura 18. Micrótomo.



Micrótomos

- *Micrótomo rotativo* – ou modelo Minot: são instrumentos pequenos e mais utilizados para microscopia de luz para tecidos incluídos em parafina.
- *Criostato*: é utilizado para confeccionar cortes de tecidos que foram congelados. Esse equipamento consiste de um micrótomo rotatório acondicionado dentro de uma câmara frigorífica com temperatura abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 19).

Figura 19. Criostato.



- *Micrótomo de corredeira*: é indicado quando os blocos contêm fragmentos grandes, podendo ser utilizado para bloco de gelatina ou parafina. É um micrótomo muito pesado, o que evita qualquer tipo de vibração mecânica. Muito utilizado para a confecção de cortes de tecido nervoso.
- *Micrótomo de congelação*: esse tipo de micrótomo é usado para cortes de material fresco congelado. O sistema desse micrótomo é igual ao do micrótomo de corredeira, em que a navalha é que se move em direção à amostra, que permanece imóvel. É equipado com um cilindro de dióxido de carbono líquido que congela as amostras de tecidos e a navalha. Esse tipo de micrótomo é muito utilizado em centros cirúrgicos para um diagnóstico rápido.
- *Ultramicrótomo*: é utilizado para confeccionar cortes de material incluído em resinas acrílicas ou epoxi. Esse equipamento permite seções semifinas (com espessura em micrômetros) de pequenas amostras para microscopia de luz, e ultrafinas (com espessura em nanômetros) em microscopia eletrônica. O ultramicrótomo vem adaptado com suporte para navalhas de vidro para a confecção de cortes semifinos, e suportes para facas de diamante ou safira, utilizadas para confeccionar cortes ultrafinos. É um micrótomo automático que possui um controle de operação mecânica.
- *Micrótomo do tipo serra*: é um micrótomo especial utilizado para cortar ossos calcificados, vidros ou cerâmicas. As amostras incluídas em resinas são movidas contra uma serra de diamante.
- *Micrótomo vibratório*: é utilizado para fazer seções de tecidos frescos de material não fixado, ou tecidos moles; também é utilizado para a obtenção de cortes de tecidos vegetais. O nome do micrótomo deriva do fato de ele possuir um sistema de alta vibração da navalha para cortar o tecido. Diferentes graus de vibrações podem ser produzidos para cortar os tecidos de diferentes densidades.

Notas de biossegurança

Utilize luvas ao cortar em criostatos, e lembre-se de que no caso de material congelado, os espécimes não estão fixados.

Navalhas (ou “facas”)

Existe uma variedade de navalhas disponíveis no mercado, variando de qualidade conforme o grau de dureza do material, o meio de inclusão ou o tipo de micrótomo.

- *Navalhas de aço*: são fabricadas com aço de alta qualidade. A superfície de corte do aço não deve possuir impurezas e nem ser revestida por substâncias anticorrosivas. Essas navalhas são tradicionalmente usadas para microtomia de material incluído em parafina.
- *Navalhas de aço para criostato*: são navalhas mais resistentes e totalmente livres de impurezas, contendo ainda 12% a 15% de material cromado ou de teflon, pois não oxidam na presença de água e oferecem maior durabilidade.
- *Navalhas descartáveis*: possuem adaptadores próprios, além de produzirem cortes de alta qualidade por não comprimirem os tecidos e permitirem cortes sequenciais, denominados cortes em fita. Essas navalhas são confeccionadas em platina ou material cromado para prolongar o uso do gume ou fio da navalha muito afiado. Para confecção de cortes incluídos em parafina, são comercializadas navalhas descartáveis de alto e baixo perfil; as navalhas de alto perfil servem para microtomia de tecidos mais sólidos, enquanto as de baixo perfil servem para cortar tecidos mais delicados.

As navalhas descartáveis são recomendadas por possuírem custo menor em relação às de aço, além de dispensarem a utilização de equipamentos, como afiadores automáticos, que são muito caros. Assim, representam economia de tempo para o técnico, que não mais precisará amolar suas navalhas.

Existem também navalhas descartáveis de tungstênio para a execução de cortes de órgãos ou osso inclusos em resinas acrílicas.

Execução dos cortes

Com o auxílio de uma navalha bem afiada, um micrótomo bem aferido e um bloco contendo material condizentemente incluído, é possível iniciar a microtomia.

Material e equipamento necessário:

- micrótomo;
- pinça histológica com ponta curva;
- banho-maria;
- cuba com gelo;
- pincel (opcional);
- gaze;
- bloco de tecido;
- navalha bem afiada;
- suporte para lâminas;
- lâminas com adesivo;
- placa aquecedora (opcional);
- estufa a 58°C.

Procedimento para a microtomia (Figuras 20, 21, 22 e 23)

- 1- Fixar o bloco no micrótomo.
- 2- Colocar o maior eixo do bloco verticalmente ao fio (gume) da navalha. Se o órgão possuir cápsula, essa deve ficar no lado superior do bloco.
- 3- Acertar o bloco para que a sua superfície fique paralela à navalha.

- 4- Colocar no micrótomo uma navalha já utilizada (velha) para desbastar o bloco (retirar o excesso de parafina até se alcançar o material).
- 5- Aparar o bloco (desbastar).
- 6- Substituir navalha velha por nova e afiada.
- 7- Resfriar o bloco para endurecer mais a parafina e umedecer a superfície do tecido. Pode-se utilizar um cubo de gelo, o qual deve ter a superfície lisa para entrar em contato com a superfície do material.
- 8- Secar a navalha e o bloco com cuidado para não atingir o fio da navalha nem causar ranhuras.
- 9- Efetuar a microtomia propriamente dita, obtendo os cortes com o auxílio de uma pinça, a qual auxilia na manipulação da fita formada.
- 10- Retirar a fita do micrótomo, com o auxílio da pinça, e transportá-la para o banho-maria, para realizar a distensão dos cortes. A temperatura do banho-maria deve estar em torno de 40°C para que os cortes se distendam sobre a superfície da água, evitando-se a formação de “pregas”. Pode-se, também, após a execução dos cortes, colocá-los em banho-maria em temperatura ambiente e distendê-los em placa aquecedora com a temperatura em torno de 40 °C a 45 °C.
- 11- Se o tecido formar dobras, ainda no banho-maria, elas devem ser removidas com o auxílio de uma pinça curva, pois tais dobras interferem na análise histológica.
- 12- Coletar o corte com lâmina limpa e adesivada.
- 13- Transferir a lâmina com o corte para uma placa aquecedora.
- 14- Levantar a lâmina à estufa aquecida a 60 °C para retirar o excesso de parafina e melhorar a adesão do corte a lâmina.

Figura 20. Microtomia de tecidos.

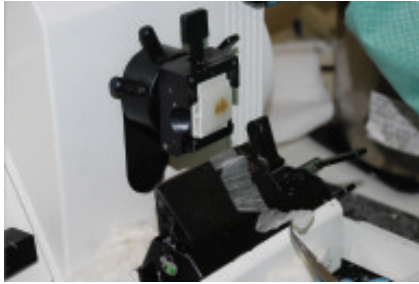


Figura 21. Distensão dos cortes em banho-maria.

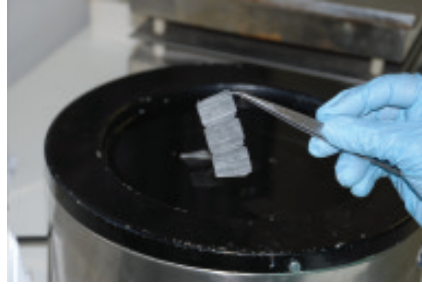


Figura 22. Coleta ou “pescagem” dos cortes.

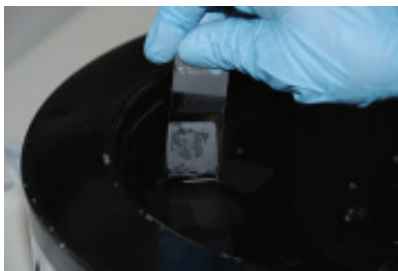
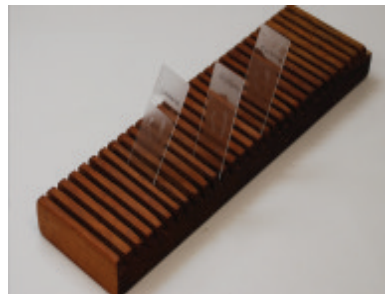


Figura 23. Lâminas em um suporte para secar.



Preparo prévio das lâminas

As lâminas devem ser muito bem limpas e desengorduradas para que os cortes não se desprendam da lâmina durante as etapas subsequentes.

- Marcação: as lâminas devem ser identificadas com o número de registro correspondente ao bloco, o que pode ser feito com lápis de diamante (permanente) ou lápis dermográfico.

Adesivos

Geralmente, como os cortes podem se soltar das lâminas durante a coloração, para evitar que se desprendam podem-se usar adesivos colocados antes da microtomia nas lâminas lavadas e secas.

Os adesivos mais usados são:

- albumina de Mayer;
- gelatina;
- celoidina
- polyisina (para imuno-histoquímica);
- silano (para técnicas imuno-histoquímicas, hibridização *in situ* e PCR).

Problemas que podem ocorrer durante a microtomia

A maioria dos artefatos observados nos cortes é causada por problemas com a navalha durante a microtomia ou durante o processamento. Vamos listar alguns dos problemas:

Problemas	Principais causas
1. Fitas de cortes curvas ou irregulares	<ol style="list-style-type: none"> 1. A navalha e o bloco não estão paralelos 2. O bloco de forma irregular de paredes não paralelas 3. Borda de corte da navalha irregular 4. Parafina misturada não homogeneamente ou impura
2. Cortes comprimidos, irregulares ou pregueados	<ol style="list-style-type: none"> 1. Faca mal afiada 2. Faca ou bloco quente 3. Ângulo irregular da navalha 4. Parafuso do micrótomo solto
3. Fragmentação dos cortes ou rasgados	<ol style="list-style-type: none"> 1. Inclusão imperfeita 2. Parafina quente demais durante a infiltração ou inclusão

4. Arranhaduras nos cortes ou cortes divididos em segmentos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Parafina suja (não filtrada durante a inclusão) 2. Sujeira no molde de inclusão 3. Sujeira no bloco ou na navalha 4. Dente na faca
5. Os cortes que se aderem no bloco ao subir o braço do micrótomo	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ângulo da navalha grande demais 2. Borda da faca suja 3. Faca sem fio 4. Borda do bloco suja de parafina
6. Espessura desigual no mesmo corte, lembrando veneziana	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tecido duro demais 2. Parafuso solto 3. Bancada do micrótomo com vibração 4. Tecido “queimado” durante a infiltração ou inclusão
7. Enrolamento dos cortes	<ol style="list-style-type: none"> 1. Parafina muito dura 2. Navalha cega 3. Ângulo incorreto da navalha
8. Fragmentação do tecido durante a microtomia ou separação do tecido do bloco de parafina	<ol style="list-style-type: none"> 1. O álcool ou o clarificador não foram completamente removidos 2. Parafina de infiltração ou inclusão muito quente 3. Excessiva clarificação do tecido 4. A infiltração foi insuficiente
9. Cortes aparecem alternadamente finos e grossos	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bloco grande demais 2. Parafusos soltos 3. Ângulo da faca pequeno demais

Notas de biossegurança

Uma causa frequente de acidente em laboratórios de histotécnica é a falta de atenção na manipulação de navalhas durante a confecção do corte. A microtomia deve ser realizada em local calmo, onde o técnico possa se concentrar exclusivamente no seu trabalho. Muito cuidado ao descartar as navalhas. Utilize sempre caixas de descarte especial para perfurocortantes. Lembre-se de que os funcionários do setor de limpeza podem se acidentar com navalhas descartadas indevidamente.

6. Coloração dos tecidos

A utilização de corantes é fundamental para visualizar os tecidos ao microscópio de luz. Após a microtomia, as células e o material extracelular são habitualmente transparentes e os corantes melhoram a visualização das estruturas teciduais.

Os corantes aplicados para corar tecidos que foram previamente fixados são chamados corantes não vitais, como a hematoxilina, eosina, fucsina, entre outros.

Podemos também corar células em cultura ou células de organismos ainda vivos; nesse caso, é necessária a utilização de corantes chamados vitais, que não causam danos às células e também não interferem no metabolismo celular. Dentre eles, temos: o azul de tripan, verde janus B, vermelho tripan, azul de metileno, vermelho neutro, entre outros.

Para compreender os conceitos básicos sobre colorações, devemos conhecer algumas definições importantes.

O que são corantes?

Os corantes (Figura 24) são compostos orgânicos, aromáticos e ionizáveis, fundamentalmente baseados na estrutura do benzeno. Contudo, esses corantes

são incolores e necessitam da adição de novos grupos químicos à sua estrutura chamados **cromóforos** ($C=O \rightarrow$ cetona, $C=N \rightarrow$ carboamínico, $N=N \rightarrow$ azoico, $N=O \rightarrow$ nitroso, $NO_2 \rightarrow$ nitro e $C=C \rightarrow$ etileno). Quanto mais cromóforos em um corante, mais intensa será a sua cor.

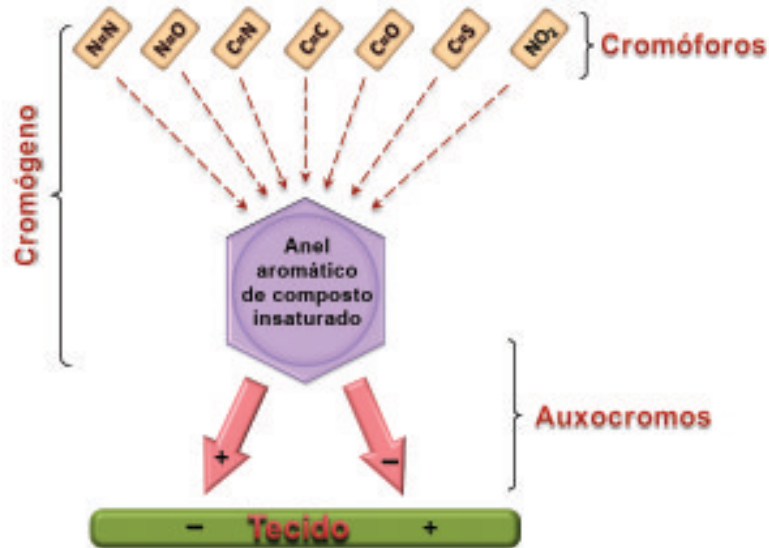
A união do cromóforo aos compostos aromáticos constitui os **cromógenos**, compostos benzênicos contendo grupamentos cromóforos. Para que o corante se ligue especificamente aos elementos tissulares, é necessário que um grupo auxiliar do corante, denominado **auxocromo**, se ligue ao cromógeno. O auxocromo determina o caráter ácido ou básico do corante. As aminas básicas ($-NH_2$) e os grupos hidroxila ácidos ($-OH$) são exemplos de auxocromos.

Simplificando:

Corantes são compostos orgânicos aromáticos formados pelo cromógeno e auxocromo e coram seletivamente os componentes teciduais, como as células e a matriz extracelular. De acordo com a carga iônica, os corantes podem ser ácidos, básicos ou neutros.

- **Corantes ácidos:** possuem auxocromo aniônico (carga elétrica negativa (-)), com afinidade por componentes básicos do tecido (catiônico (+)). As estruturas coradas pelos corantes ácidos são chamadas **acidófilas**, como, por exemplo, o citoplasma e matriz extracelular. Um exemplo de corante ácido é a eosina.
- **Corantes básicos:** possuem auxocromo catiônico (+) com afinidade por componentes ácidos dos tecidos (aniônico (-)). As estruturas coradas pelos corantes básicos são chamadas **basófilas**, como o núcleo. A hematoxilina é um exemplo clássico de corante básico.

Figura 24. Esquema da associação do corante com os tecidos.



Os corantes podem ser naturais ou sintéticos (artificiais), sendo também chamados corantes biológicos, por revelar estruturas biológicas dos tecidos.

- **Naturais:** hematoxilina, índigo, orceína, brasilina, entre outros.
- **Artificiais:** são aqueles derivados do benzeno.

As colorações podem ser classificadas segundo a **ação** do corante, o **tempo** de coloração e a sua **cromatização**.

Para compreender essa caracterização, é necessário conhecer a definição de dois termos da técnica histológica: o *mordente* e a *diferenciação*.

Mordente: é um elemento, metal ou íons de metal, que se liga covalentemente ao corante e facilita a ligação do corante ao tecido. O mordente é empregado para reforçar a ação dos corantes e tornar as colorações mais seletivas, podendo ser usado antes, durante (adicionado à solução corante) ou após a utilização do corante.

Diferenciação: esse termo se refere à remoção do excesso de corante do tecido, descorando seletivamente determinada estrutura e melhorando a sua visualização.

As colorações podem ainda se caracterizar segundo a:

A. Ação

- **Diretas:** quando o corante penetra no interior dos tecidos sem tratamento intermediário com mordente.
- **Indiretas:** quando é necessário um tratamento intermediário com uma solução mordente para o corante se ligar ao tecido durante a coloração.

B. Tempo

- **Progressiva:** a coloração é feita gradualmente sem a necessidade de se proceder à sua diferenciação, isto é, que seja retirado o excesso do corante.
- **Regressiva:** hipercora-se o tecido e posteriormente remove-se seu excesso pela diferenciação para melhor visualização dos elementos teciduais.

B. Cromatização

Depende da quantidade de corantes utilizados durante a execução de uma determinada técnica de coloração.

- **Monocrômica** = 1 cor.
- **Bicrômica** = 2 cores.
- **Tricrômica** = 3 cores.
- **Policrômica** = mais de 3 cores.

Após os comentários apresentados, deve-se ainda aprofundar alguns conhecimentos sobre a coloração.

Após a microtomia, o preparado histológico está pronto para ser corado. Deve-se, inicialmente, utilizar uma coloração que proporcione uma visão geral de todo o tecido de modo a permitir a identificação dos elementos teciduais, propiciando o diagnóstico histológico. A coloração pela hematoxilina (H) e pela eosina (E) cumpre muito bem esse papel. Nessa coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, sendo evidenciados em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizados em rosa. Havendo a necessidade de se identificar certos elementos teciduais específicos, empregam-se técnicas histoquímicas especiais.

Há diversos métodos especiais de coloração que propiciam uma melhor identificação de determinados componentes teciduais. Por exemplo, a coloração pelo método tricromático de Masson, que utiliza corantes especiais, permite evidenciar tecido muscular e fibras colágenas; a coloração pela resorcina fucsina de Weigert demonstra fibras do sistema elástico; o azul de toluidina em pH ácido é uma coloração específica para mastócitos.

Outros métodos utilizados para identificação de elementos teciduais podem utilizar sais pesados a base de prata metálica e não corantes. Nessa categoria podem-se citar o método da reticulina de Gomori, que identifica especificamente as fibras reticulares do tecido conjuntivo, sendo o método de Grocott específico para fungos, e o método de PAMS, específico para membrana basal.

Em determinadas colorações histoquímicas, certas substâncias, ao se combinarem com o tecido, formam uma nova substância, e essa ligação pode ser irreversível. Essa é a base da coloração com o azul da Prússia (ou Perls) e do método que utiliza o ácido periódico associado ao reativo de Schiff (PAS). Na coloração com o azul da Prússia, devido à ação do ácido clorídrico, o ferro

conjugado às proteínas é ionizado e evidenciado após reação com o ferrocianeto de potássio. O resultado dessa reação produz um precipitado azul e insolúvel de ferrocianeto férrico.

Na reação do método do PAS, o ácido periódico oxida os grupos hidroxila vicinal dos hidratos de carbono do glicogênio, mucoproteínas e glicoproteínas, os quais são convertidos a grupamentos aldeídicos, de modo que a cadeia polissacarídica se transforma numa cadeia polialdeídica. Os compostos aldeídos se combinam com o reagente de Schiff, que é incolor, e esse complexo formado revela-se como um composto colorido.

As colorações histológicas de rotina e especiais, quando surgiram na patologia clássica, constituíram uma grande revolução e avanço na metodologia de estudo da célula, fornecendo subsídios importantes para a análise dos tecidos, e representam o ponto de partida para o uso de técnicas mais modernas incorporadas à rotina de investigação.

A seguir, encontram-se algumas sugestões de técnicas histoquímicas.

Para evidenciar	Células
Núcleo e citoplasma	HE, Feulgen, Papanicolau, Shorr, Giemsa, azul de toluidina, metil green-pironina
Melanócitos	Fontana-Masson
Células do tecido nervoso	Violeta cresil, azul de toluidina, Golgi (Prata)
Secreções celulares	PAS, PAS alcian blue pH 1,0 ou 2,5
Mastócitos e eosinófilos	AB-safranina, Geimsa, azul de toluidina, sirius red em pH 10,2

Para evidenciar	Elementos da matriz extracelular
Glicoproteínas neutras	PAS
Proteoglicanos	PAS-alcian blue em pH 1,0 ou pH2,5
Glicoproteínas não colagenosas	PAMS, reticulina
Elementos fibrosos à base de colágenos	Tricomática de Masson, tricomática de Gomori, picrossirius red
Fibras do sistema elástico	Resorcina fucsina de Weirgert

Para evidenciar	Tecidos específicos
Tecido conjuntivo	Tricomática de Masson, tricomática de Gomori, Goldner, picrossirius red, reticulina de Gomori
Tecido linfoide e mieloide	Giemsa, reticulina de Gomori
Tecido adiposo	Sudan black
Tecido muscular	Colorações tricromáticas, azul de toluidina
Tecido cartilagionoso	Colorações tricromáticas, PAS - alcian blue em pH1,0 ou pH 2,5

Para evidenciar	Micro-organismos
Fungos de forma geral	Grocott e PAS
<i>Treponema pallidum</i> , <i>Leptospira</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	Warthin-Starry, Giemsa
<i>Mycobacterium leprae</i>	Método de Fite, Wade, Kinyoun
<i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoebahistolytica</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i>	Giemsa, HE, leishman, PAS, hematoxilina férrica, Feulgen
Helmintos	HE
Inclusões virais	HE
Criptococcus	Mucicarmin, PAS, prata metenamina

Considerações importantes

Geralmente as estruturas teciduais são visualizadas na mesma cor, ou muito semelhante em tom ao do corante utilizado. Essa propriedade é conhecida como **ortocromasia**. Porém, em alguns casos, certos elementos teciduais, ao serem visualizados após a sua interação com o corante, exibem uma cor distinta do corante. Esse fenômeno é designado **metacromasia**. Algumas técnicas de coloração podem demonstrar a metacromasia, como a coloração pelo azul de toluidina em condições específicas, que evidencia em magenta os grânulos dos mastócitos e os proteoglicanos da matriz cartilaginosa.

Procedimentos gerais para colorações

Antes de iniciar qualquer coloração, devemos nos lembrar de que, após a microtomia, os cortes dos tecidos estão impregnados pela parafina, que precisa ser removida para que os corantes penetrem e se combinem com os elementos teciduais.

O procedimento geral para qualquer coloração é o seguinte:

- *Desparafinização*: visa à retirada da parafina dos cortes após a microtomia. Esse procedimento é realizado com o auxílio do xilol, a mesma substância utilizada para a clarificação dos tecidos durante o processamento para a confecção do bloco contendo o fragmento do material a ser analisado.
- *Hidratação*: é realizada por meio de sequências alcoólicas em concentrações decrescentes, ou seja, álcool 100%, 95%, 80%, 70%, até a água destilada. Cabe ressaltar que a maioria dos corantes se encontra diluída em água, devendo o último banho ser com água. Porém, quando se utiliza um corante alcoólico, deve-se interromper a hidratação em álcool 70%.
- *Coloração*: é a imersão propriamente dita dos cortes no corante, favorecendo a combinação de suas estruturas com o corante para posterior visualização em microscópio de luz.
- *Desidratação*: retira a água do tecido, pois os meios de selagem não são miscíveis em água, e são necessários para a confecção dos preparados histológicos permanentes. Assim, utiliza-se com concentrações alcoólicas crescentes: álcool 70%, 80%, 95% e 100%.
- *Clarificação*: utiliza-se o xilol como líquido intermediário entre o álcool e o meio de selagem.
- *Selagem* ou *montagem da lâmina* propriamente dita: é a etapa final da preparação da lâmina para análise ao microscópio de luz. Essa etapa consta em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando uma substância para fixar a lâmina à lamínula (selagem).

Protocolos de coloração para os tecidos

• Coloração pela hematoxilina mayer e eosina-floxina

Soluções:

A) Hematoxilina de Mayer (Mayer, 1903):

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

Dissolver a hematoxilina na água destilada agitando (aquecer um pouco até 60 °C). Acrescentar o iodato de sódio e o alúmen. Agitar até dissolver totalmente. Adicionar, então, o ácido cítrico e o hidrato de cloral. Deixar agitando para que todos os componentes se dissolvam totalmente. A cor final do corante é vermelho-violeta. O corante estará pronto para o uso imediato e poderá ser usado por cerca seis meses (no máximo), sem que ocorra o amadurecimento exagerado.

Nota técnica: existem vários tipos distintos de soluções para o preparo da hematoxilina, como a de Mayer, Harris, Delafield e Erlich. Esses tipos de soluções variam de acordo com o tempo de coloração, aplicação e composição química do corante. A hematoxilina de Harris é muito utilizada nos laboratórios de anatomia patológica por produzir bons resultados com um tempo curto de coloração. A hematoxilina de Mayer apresenta bons resultados, porém com um tempo maior de coloração. As hematoxilinas de Erlich e

Delafield são empregadas em tecidos ósseos que sofrerão a ação por descalcificadores contendo ácidos fortes. A seguir, serão descritos os métodos de coloração pela hematoxilina e eosina, utilizando a hematoxilina de Mayer e a de Harris.

B) Eosina-floxina:

1- Solução estoque de eosina 1% em água destilada.

2- Solução estoque de floxina 1% em água destilada.

3- Solução de uso de eosina-floxina:

Eosina 1% (solução estoque 1)..... 100 mL

Floxina 1% (solução estoque 2)..... 10 mL

Álcool etílico 95%..... 780 mL

Ácido acético glacial PA..... 4 mL

Procedimento:

1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.

2- Corar com a hematoxilina de Mayer durante 20 minutos¹.

3- Lavar em água corrente durante 25 minutos.

4- Começar a desidratação com álcool 70% durante 1 minutos.

5- Corar pela eosina-floxina durante 2 minutos.

6- Lavar rapidamente em álcool 95%.

7- Desidratar em 3 banhos de álcool absoluto por 1 minuto cada.

8- Clarificar em 3 banhos de xilol e selar.

Resultados: núcleos em azul e citoplasma em várias tonalidades de rosa.

¹ Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

Notas de biossegurança

Atenção, pois o xilol e o álcool são altamente inflamáveis. Use luvas nitrílicas, jaleco e máscara com filtro de proteção contra vapores orgânicos. Durante a manipulação dos reagentes, evite contato com o líquido e o vapor de xilol. Esse elemento é tóxico para as vias aéreas e, quando inalado por tempo prolongado, pode causar a morte. Em caso de incêndio, extinguir com espuma, pó químico seco ou dióxido de carbono. O vapor de xilol é mais pesado do que o ar, exigindo capela com exaustão inferior.

- **Coloração pela hematoxilina de Harris e eosina-floxina**

Soluções:

A) Ácido-álcool a 1%:

Ácido clorídrico (HCl).....	1 mL
Etanol a 70%.....	99 mL

B) Água amoniacal:

Hidróxido de amônio (NH ₄ OH).....	2 a 4 mL
Água destilada.....	800 a 1000 mL

C) Carbonato de lítio saturado:

Carbonato de lítio (LiCO ₃).....	1,54 g
Água destilada.....	100 mL

D) Eosina-floxina (ver o método de hematoxilina de Mayer e eosina-floxina)

E) Hematoxilina de Harris (Harris, 1900):

Hematoxilina	5,0 g
Etanol a 100%.....	50,0 mL
Alúmen de potássio ou de amônio.....	100 g
Água destilada.....	1.000 mL
Óxido mercúrio (pó vermelho) (HgO).....	2,5 g

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente. Dissolva a hematoxilina no álcool à temperatura ambiente, em recipiente separado. Lentamente, misture as duas soluções aquecendo em placa aquecedora, até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e, com cuidado, acrescente lentamente o óxido mercúrio, que faz com que a solução entre rapidamente em ebulição, podendo transbordar do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que adquira a cor púrpura-escura. Esfrie, e a solução estará pronta.

Para o uso:

Acrescente 20 mL de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos.

Filtre sempre antes de cada uso.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Corar com solução recém-filtrada de hematoxilina de Harris por 6 a 10 minutos².

² Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

- 3- Lavar em água de torneira por 5 minutos.
- 4- Diferenciar em álcool-ácido, com 1 ou 2 mergulhos.
- 5- Lavar rapidamente em água de torneira.
- 6- Colocar em solução fraca de água amoniacal ou de carbonato de lítio saturada até que os cortes fiquem azul-brilhantes.
- 7- Lavar completamente em água de torneira por 10 minutos.
- 8- Colocar em álcool etílico a 80% por 1 a 2 minutos.
- 9- Contracorar em solução de eosina-floxina por 2 minutos³.
- 10- Desidratar a partir do álcool 95%.
- 11- Desidratar com 3 banhos de álcool absoluto.
- 12- Clarificar em 3 banhos de xilol e selar.

Resultados:

Núcleos.....azul
Citoplasma.....róseo a vermelho
Demais estruturas tissulares.....róseo a vermelho

Nota de biossegurança: O óxido mercúrio é tóxico, venenoso e combustível (oxidante).

• **Método de coloração pelo Giemsa de Lennert (Lennert, 1978)**

Soluções:

A) Ácido acético 0,5%.

B) Álcool isopropílico.

³ Recomendamos fazer um teste prévio, pois, conforme o material, esse tempo poderá ser reduzido e ainda se obterem bons resultados.

C) Álcool etílico 95%.

D) Xilol

E) Solução de Giemsa:

Giemsa Merck em solução estoque.....	20 mL
Água destilada.....	80 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até a água destilada.
- 2- Corar utilizando a solução de uso de Giemsa por 1 hora.
- 3- Diferenciar em ácido acético 0,5% - 3 mergulhos
- 4- Continuar a diferenciação em álcool etílico 95%, olhando sempre ao microscópio (o tempo varia de acordo com o tipo e espessura do tecido).
- 5- Desidratar em álcool isopropílico - 3 banhos, de 3 minutos cada.
- 6- Clarificar em xilol e selar.

Nota: A solução de Giemsa descora com o tempo; aconselha-se examiná-la e fotografá-la o mais rápido possível.

Resultados:

Citoplasma.....	rosa
Núcleos.....	azul
Hemácias.....	vermelho

Grânulos de mastócitos.....	púrpura
Bactérias.....	azul
Parasitas da malária.....	azul

• **Método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS)
(McManus, 1946)**

Soluções:

A) Ácido Periódico 0,5%.

B) Reagente de Schiff:

Fucsina básica.....	1 g
Metabissulfito de sódio ou bissulfito de sódio.....	2 g
Água destilada.....	200 mL
Ácido clorídrico 1 N.....	20 mL

Procedimento:

- 1- Dissolver em 200 mL de água destilada quente, 1 g de fucsina básica.
- 2- Deixar entrar em ebulição.
- 3- Esfriar até 50 °C.
- 4- Adicionar 2 g de metabissulfito ou dissulfito ou bissulfito de sódio anidro.
- 5- Filtrar.
- 6- Colocar uma pitada de metabissulfito de sódio anidro e em seguida adicionar 20 mL de ácido clorídrico 1 N.
- 7- Agitar, esfriar e guardar na geladeira em frasco âmbar ou envolvido em papel alumínio.

8- No dia seguinte, colocar uma pitada de carvão ativado e filtrar. O filtrado deve ficar branco ou cor-de-palha; caso contrário, deve-se colocar mais uma pitada de metabissulfito de sódio anidro e filtrar novamente.

C) Solução sulfurosa:

Solução estoque:

Metabissulfito de potássio ou bissulfito de potássio...	10 g
Água destilada.....	200 mL
Ácido clorídrico 1 N.....	10 mL

Solução de uso:

Solução estoque.....	6 mL
Água destilada.....	114 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Colocar as lâminas na solução de ácido periódico 1% por 15 minutos.
- 3- Lavar em água destilada por 5 minutos.
- 4- Corar pelo Schiff (guardado na geladeira e no escuro⁴), por 15 minutos à temperatura ambiente.
- 5- Colocar em três trocas de solução sulfurosa de uso durante 5 minutos cada e desprezar após o uso.

⁴ Envolver o vidro com papel alumínio.

- 6- Lavar em água destilada por 4 minutos.
- 7- Corar pela hematoxilina de Mayer durante 10 minutos.
- 8- Lavar em água corrente durante 5 minutos.
- 9- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Membrana basal, mesângio, fibrina, muco, amiloide, coloide, de coloração rósea a vermelho púrpura.

• **Método de Gomori para fibras reticulares (Gomori, 1937)**

Soluções:

A) Solução de permanganato de potássio 1%.

B) Solução de ácido oxálico 3%.

C) Solução de alúmen de ferro 2%.

D) Solução de nitrato de prata amoniacal de uso:

Nitrato de prata 10% (aquoso).....20 mL

Hidróxido de potássio 10% (aquoso).....5 mL

Hidróxido de amônia 28% (aquoso): adicionar aos poucos, gotejando até que o precipitado marrom desapareça, sempre agitando.

A solução se tornará transparente. Acrescentar então 3 gotas de nitrato de prata 10%, agitando. Acrescentar água destilada na proporção de 1:1. Acrescentar finalmente 25 mL de água.

E) Formaldeído 10%: (1 parte de formaldeído comercial + 3 partes de água destilada)

F) Cloreto de ouro 1%.

G) Tiosulfato de sódio 5%.

Observação: Os cortes devem ser aderidos em lâminas quimicamente limpas e desengorduradas, com uma fina camada de albumina de Mayer.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Mergulhar em solução de permanganato de potássio 1% por 1 minuto.
- 3- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 4- Descorar pelo ácido oxálico 3% por 3 minutos.
- 5- Lavar em água corrente por 3 minutos.
- 6- Colocar as lâminas no alúmen de ferro 2% ou sulfato de ferro e alumínio por 1 minuto.
- 7- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 8- Solução de nitrato de prata amoniacal (solução de uso) por 1 minuto.
- 9- Lavar em água destilada por 5 minutos.
- 10- Formaldeído 10% por 3 minutos.
- 11- Água corrente por 5 minutos.

- 12- Solução de cloreto de ouro 1% por 10 minutos.
- 13- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 14- Tioossulfato de sódio 5% por 1 minuto.
- 15- Lavar em água corrente por 2 minutos.
- 16- Desidratar, clarificar e selar.

Resultado:

Fibras reticularesnegro.

Método de coloração tricromática de Masson (Masson, 1929)

Soluções:

A) Solução aquosa, saturada, de ácido pícrico:

Ácido pícrico.....1,2 g
Água destilada.....100 mL

B) Solução fixadora de Bouin:

Solução aquosa, saturada, de ácido pícrico ...750 mL
Formalina (37-40%).....250 mL
Ácido acético, glacial.....50 mL

C) Solução de uso de hematoxilina férrica de Weigert:

Misturar, em partes iguais, as soluções estoques A e B (100 mL da solução A + 100 mL da solução B).

Solução estoque 1:

Hematoxilina, cristais.....1 g
Etanol, 95%.....100 mL

Solução estoque 2:

Cloreto férrico (FeCl_3), 29%.....	4 mL
Água destilada.....	95 mL
Ácido clorídrico concentrado (HCl).....	1 mL

D) Solução de fucsina ácida - Biebrich Scarlet:

Biebrich Scarlet (C.I. 26905), solução aquosa a 1%....	90 mL
Fucsina ácida (C.I. 42685), solução aquosa a 1%.....	10 mL
Ácido acético glacial.....	1 mL

E) Solução de ácido fosfotúngstico - fosfomolibdico:

Ácido fosfotúngstico.....	5 g
Ácido fosfomolibdico.....	5 g
Água destilada.....	200 mL

F) Solução de azul de anilina:

Azul de anilina.....	2,5 g
Ácido acético glacial.....	2 mL
Água destilada.....	100 mL

G) Solução de ácido acético glacial a 1%:

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até a água destilada.
- 2- Colocar no líquido de *Bouin* por 1 hora a 56 °C ou à

temperatura ambiente, por uma noite, se os cortes foram fixados em formalina. *Essa etapa não é necessária se a fixação for feita no líquido de Bouin.*

- 3- Deixar esfriar por 10 minutos.
- 4- Lavar em água corrente até que os cortes fiquem claros. Em seguida, enxaguar em água destilada.
- 5- Corar na solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos.
- 6- Lavar em água corrente por 10 minutos. Após, enxaguar em água destilada.
- 7- Corar em solução aquosa de Biebrich Scarlet a 1% por 5 minutos.
- 8- Enxaguar em água destilada.
- 9- Colocar na solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 a 30 minutos.
- 10- Corar em solução de azul de anilina por 15 a 30 minutos.
- 11- Enxaguar em água destilada.
- 12- Diferenciar na solução aquosa de ácido acético a 1%, por 3 a 5 minutos.
- 13- Desidratar a partir do etanol a 95%, clarificar com xilol e selar.

Resultados:

Núcleos.....preto
Músculo, citoplasma, queratina.....vermelho
Colágeno.....azul

• **Método de Weigert (Weigert, 1898)**

Soluções:

A) Resorcina fucsina de Weigert:

Fucsina básica.....	2 g
Resorcina.....	4 g
Água destilada.....	200 mL
Cloreto férrico 30 %.....	25 mL

Dissolver 2 g de Fucsina básica e 4 g de Resorcina em 200 mL de água destilada em ebulição. Adicionar 25 mL de cloreto férrico a 30%, deixando ferver por mais 5 minutos. Filtrar e desprezar o filtrado. O precipitado que ficou no papel de filtro deve ser dissolvido em 200 mL de etanol 90% aquecido. Após esfriar, completar para 200 mL com etanol 90% e juntar 4 mL de ácido clorídrico concentrado. O corante deve ser guardado na geladeira, pois o álcool pode evaporar com o calor.

B) Solução de persulfato de potássio 10% ou monopersulfato de potássio 10% ou oxona 10%

C) Solução de Van Gieson:

Fucsina ácida, solução aquosa a 1%.....	5 mL
Ácido pícrico, solução saturada aquosa (21 g para 1 L de água)	100 mL
Ácido clorídrico concentrado.....	0,25 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até o álcool 70%.
- 2- Oxidar pela oxona 10% (desprezar após o uso).
- 3- Corar pela resorcina-fucsina durante 1 hora.
- 4- Passar por 3 banhos de álcool 95% (em borréis), para retirar o excesso de corante por alguns segundos em cada banho.
- 5- Lavar em água destilada.
- 6- Contracorar ou não com a solução de Van Gieson
- 7- Desidratar rapidamente em 3 banhos de álcool absoluto (em borréis).
- 8- Clarificar em 3 banhos de 3 minutos de xilol.

Resultados:

Fibras elásticas marrom-avermelhado.

• **Método da prata metenamina de Grocott (Grocott, 1955)**

Soluções:

- A) Solução de ácido crômico (trióxido de cromo) a 4%.
- B) Solução de nitrato de prata a 5%.
- C) Solução de metenamina (hexametenotetramina) a 3%.
- D) Solução de bórax a 5%.

E) Solução estoque de nitrato de prata-metenamina:

Solução de nitrato de prata a 5%.....5 mL
Solução de metenamina a 3%.....100 mL

F) Solução de trabalho de nitrato de prata-metenamina:

Solução estoque de nitrato de prata-metenamina.....25 mL
Água destilada.....25 mL
Solução de bórax a 5%.....2 mL
Prepare no momento de usar. Não use se ficar turva.

G) Solução de bissulfito de sódio ou metabissulfito de sódio a 1%:

Prepare no momento de usar.

H) Solução de cloreto de ouro a 0,1%.

I) Solução de tiosulfato de sódio (hipossulfato de sódio) a 5%.

J) Solução estoque de *light green* a 0,2%:

Light green SF yellow.....0,2 g
Água destilada.....100 mL
Após misturar, acrescente 0,2 mL ácido acético glacial.

K) Solução de uso de *light green*:

Solução estoque de *light green*10 mL
Água destilada.....50 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Oxidar pela solução de trióxido de cromo a 4%, preparada no momento de usar, e deixar por 1 hora.
- 3- Lavar em água de torneira por poucos segundos.
- 4- Colocar na solução de bissulfito de sódio a 1% por 1 minuto.
- 5- Lavar em água corrente por 5 a 10 minutos.
- 6- Enxaguar em água destilada; 3 trocas.
- 7- Colocar os preparados na solução de trabalho de nitrato de prata-metenamina, preparada no momento de usar, e deixar na estufa a 58°C - 60°C, por 50 a 60 minutos.
- 8- Enxaguar em água destilada várias vezes.
- 9- Colocar na solução de cloreto de ouro a 0,1% e deixar por 2 a 5 minutos.
- 10- Enxaguar em água destilada.
- 11- Colocar na solução de tiosulfato de sódio a 5%, e deixar por 2 a 5 minutos.
- 12- Lavar em água de torneira.
- 13- Contracorar na solução de trabalho de *light green* por 30 a 45 segundos (esse tempo pode variar).
- 14- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Fungosnitidamente delineados em preto
Mucina.....cinza-escuro
Parte interna de micélios e hifas.....rosa-acinzentado
Fundo.....verde

• **Método de Warthin-Starry (Kerr, 1938)**

Soluções:

A) Ácido cítrico 1%.

B) Solução de Água acidulada:

Água tridestilada deionizada.....1000 mL

Acrescentar a solução de ácido cítrico a 1%, o suficiente para alcançar o pH 4,0.

C) Solução impregnante de nitrato de prata a 1%:

Nitrato de prata.....1 g

Água acidulada.....100 mL

D) Solução de nitrato de prata 2% para revelação:

Nitrato de prata.....2 g

Água acidulada.....100 mL

E) Solução de hidroquinona a 0,15%:

Hidroquinona cristalina qualidade fotográfica.....0,15 g

Água acidulada.....100 mL

F) Solução de gelatina a 5%:

Gelatina pura.....10 g

Água acidulada.....200 mL

Conservar as soluções de nitrato de prata 2%, gelatina 5% e hidroquinona 0,15% em frascos de Erlenmayer de 50 mL, em banho-maria 54 °C, até preparar a solução G:

G) Solução reveladora:

Nitrato de prata 2%.....	1,5 mL
Gelatina 5%.....	3,75 mL
Hidroquinona 0,15%.....	2,0 mL

Misturar num pequeno béquer os ingredientes acima na ordem descrita, assegurando-se que a mistura do nitrato de prata e gelatina esteja totalmente completa. Após isso, adicionar a hidroquinona. **Preparar a solução somente na hora de usar.**

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Impregnar pela solução de nitrato de prata a 1%, por 30 minutos em banho-maria pré-aquecido à 43 °C.
- 3- Preparar a solução reveladora. Usar a solução imediatamente após colocar a hidroquinona.
- 4- Recobrir os cortes com a solução reveladora, preparada no momento do uso. Os cortes tornam-se marrons-claros ou amarelos. Controlar ao microscópio. As espiroquetas aparecem em negro com fundo amarelo ou marrom-claro.
- 5- Lavar rapidamente em água morna comum (56°C).
- 6- Mergulhar em água destilada.
- 7- Desidratar a partir do álcool 95%, clarificar e selar.

Resultados:

Espiroquetas, corpos de Donovan...negro

Coloração de fundo.....de amarelo a marrom-claro

Referências:

C. H. Bridges e L. G. Luna estudaram várias modificações da técnica, que se encontra publicada em *Lab. Invest.*, 1957.

• **Sirius red em pH 10,2 (Bogomoletz, 1980; Luque, 1989)**

Solução:

A) Solução de *sirius red* em pH 10,2:

Sirius red ou *direct red* 80.....0,5g

Água destilada.....45 mL

Álcool absoluto.....50 mL

- Adicionar NaOH 0,1N, até atingir o pH 10,2.
- Deixar repousar por 2 horas.
- Gotejar lentamente o cloreto de sódio 20% em baixo de luz forte até aparecer o precipitado.
- Deixar repousar durante a noite sob luz forte e filtrar na manhã seguinte.

Esta solução dura um mês à temperatura ambiente; mas pode durar mais, caso fique na geladeira. Após um mês, aumentar o tempo de coloração.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Corar por 5 minutos pela hematoxilina de Mayer.
- 3- Lavar em água corrente por 5 minutos.
- 4- Lavar em água destilada por 2 minutos.
- 5- Passar pelo álcool 70% por 3 minutos.
- 6- Corar pela solução de *sirius red* pH 10,2 por 1 hora ou mais.
- 7- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- 8- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Grânulos do eosinófilos.....vermelho
Núcleos.....azul

• Método de Fite (Fite, 1947)

Soluções:

A) Vaselina terebentina:

Terebentina.....70 mL
Vaselina.....30 mL

ou Solução de Óleo de Anilina - Xilol:

Óleo de anilina.....30 mL
Xilol.....70 mL

B) Solução de carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen:

Fenol, cristais fundidos.....	2,5 mL
Etanol absoluto.....	5 mL
Fucsina básica.....	0,5 g
Água destilada.....	50 mL

Primeiro, deve-se dissolver a fucsina básica no etanol, juntar o fenol e, por último, adicionar a água destilada. Esta solução deve ser filtrada.

C) Solução de álcool-ácido a 1%:

Ácido clorídrico.....	1 mL
Álcool etílico (etanol) a 70%.....	99 mL

D) Solução estoque de azul de metileno:

Azul de metileno.....	1,4 g
Etanol a 95%.....	100 mL

E) Solução de trabalho de azul de metileno:

Solução estoque de azul de metileno.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL
Ácido acético glacial.....	0,5 mL

Procedimento:

1- Desparafinizar as lâminas em 2 trocas, de 10 minutos cada, em solução de vaselina terebentina ou óleo de anilina – xilol em estufa 60°C. *Lembrar-se de que essas soluções devem estar a 60°C antes de imergir as lâminas.*

- 2- Deixar os cortes secarem ao ar por 15 minutos. O filme de óleo remanescente prevenirá a retração e os danos aos cortes.
- 3- Corar na solução filtrada de carbol-fucsina de Ziehl-Neelsen por 30 minutos.
- 4- Lavar em água de torneira por 10 minutos.
- 5- Diferenciar os cortes na solução de álcool-ácido a 1% até que fiquem rosa-pálidos.
- 6- Lavar em água corrente por 3 minutos.
- 7- Contracorar com a solução de trabalho de azul de metileno por 30 segundos a 1 minuto.
- 8- Enxaguar, em água de torneira, o excesso de solução de trabalho de azul de metileno.
- 9- Desidratar os cortes rapidamente, em 2 trocas cada, em etanol a 95% e etanol absoluto.
- 10- Clarificar em xilol; 2 trocas de 2 minutos cada.
- 11- Selar.

Resultados:

Bacilos da lepra e outros ácido resistentes.....vermelho.
Fundo..... azul-pálido.

• **Método do mucicarmim** (Southgate, 1927)

Soluções:

A) Solução estoque mucicarmim de Southgate:

Carmim..... 1 g
Hidróxido de alumínio..... 1 g

Etanol a 50%.....100 mL
Cloreto de alumínio, anidro.....5 g
Faça essa solução em banho-maria. Quando frio, filtre.

B) Solução de trabalho de mucicarmim de Southgate:

Solução-estoque de mucicarmim de Southgate.....10 mL
Água destilada.....90 mL

C) Solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weigert:

Partes iguais das soluções estoque A e B (100 mL de A + 100 mL de B). Ver o método de coloração pela tricromática de Masson.

D) Solução de amarelo metanil a 0,25%:

Amarelo metanil.....0,25 g
Água destilada.....100 mL
Ácido acético glacial.....0,25 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até a água destilada.
- 2- Deixar na solução de trabalho de hematoxilina férrica de Weigert por 7 minutos.
- 3- Lavar em água corrente de torneira por 10 minutos.
- 4- Corar na solução de trabalho de mucicarmim de Southgate por 30 minutos e descartá-la após o uso.
- 5- Enxaguar rapidamente em água destilada.

- 6- Contracorar na solução de amarelo metanil por 1 minuto.
- 7- Desidratar a partir do etanol 95%.
- 8- Clarificar e selar.

Resultados:

Mucina.....	rosa-escuro
Cápsula de <i>Cryptococcus sp</i>	rosa-escuro
Núcleos.....	preto
Fundo.....	amarelo

Método de Feulgen para DNA (Feulgen e Rossenbeck, 1924)

Soluções:

A) Ácido clorídrico 1N:

Ácido clorídrico.....	8,3 mL
Água destilada.....	91,7 mL

B) Metabissulfito de sódio 0,5%.

C) Reagente leuco fucsina de Schiff (ver método do ácido periódico + reativo de Schiff (PAS)).

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar dos cortes até a água destilada.
- 2- Lavar os cortes em ácido clorídrico 1N em temperatura ambiente.

3- Transferir para o ácido clorídrico 1N pré-aquecido, a 60°C para hidrolisar os cortes.

○ tempo de hidrólise depende do fixador utilizado:

- Formaldeído = de 8 a 12 minutos.
- Bouin = de 5 a 8 minutos.
- Helly = em torno de 5 minutos.

4- Transferir para a solução o reagente leuco fucsina de Schiff durante 45 minutos.

5- Lavar em 3 banhos de metabissulfito de sódio 0,5%, de 2 minutos.

6- É opcional contracorar com light green 1% durante 1 minuto.

7- Desidratar, clarear e montar.

Resultados:

DNA..... vermelho-púrpura

Citoplasma.....verde

• **Método de Coloração pelo *alcian blue* em pH 2,5 (Lev. e Spicer, 1964).**

Soluções:

A) Solução de ácido acético glacial a 3%.

B) Solução de *alcian blue*:

alcian blue, 8GX..... 1 g

Solução de ácido acético a 3%..... 100 mL

C) Solução de *nuclear fast red* (*kernechtrot*):

Nuclear fast red (*kernechtrot*)0,1 g

Solução de sulfato de alumínio a 5% 100 mL

Aqueça a solução lentamente, até ferver. Esfriar e filtrar. Acrescente timol para preservar.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar até água destilada.
- 2- Colocar em solução de ácido acético glacial a 3% e deixar por 3 minutos.
- 3- Corar na solução de *alcian blue* por 30 minutos.
- 4- Lavar em água corrente por 10 minutos.
- 5- Enxaguar em água destilada.
- 6- Contracorar com a solução de *nuclear fast red* filtrada por 5 minutos.
- 7- Lavar em água corrente por 1 minuto.
- 8- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Mucossubstâncias ácidas sulfatadas e carboxiladas..... azul escuro
Núcleos.....vermelho a rosa
Citoplasma.....rosa-pálido

• **Método de coloração pelo *alcian blue*, pH 1,0
(Lev e Spicer, 1964)**

Soluções:

A) Solução de ácido clorídrico 1N:

Ácido clorídrico.....	83,5 mL
Água destilada.....	916,5 mL

B) Solução de ácido clorídrico 0,1 N:

Solução de ácido clorídrico 1N.....	10 mL
Água destilada.....	90 mL

C) Solução de *alcian blue*:

<i>Alcian blue</i> , 8GX.....	1 g
Solução de ácido clorídrico 0,1 N.....	100 mL

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar as lâminas até água destilada.
- 2- Colocar na solução ácido clorídrico 0,1N e deixar por 3 minutos.
- 3- Corar pela solução de *alcian blue* por 30 minutos.
- 4- Retirar o excesso de corante com papel de filtro. Não enxaguar em água.
- 5- Desidratar, clarificar e selar.

Resultados:

Mucossubstâncias sulfatadas azul-escuro

Notas de biossegurança

Ao manipular vários produtos químicos para os métodos de coloração, use máscara com filtro próprio para vapores orgânicos, em local arejado e com exaustão. O preparo dessas soluções deve ser feito em capela de exaustão, evitando sempre o contato com a pele ou a vias respiratórias. Observe a ficha de segurança de cada produto químico utilizado para os métodos de coloração, muitos são danosos à saúde se inalados, engolidos, ou se entram em contato com a pele. Nunca descarte as soluções corantes ou qualquer solução preparada para o desenvolvimento das colorações em esgoto sanitário convencional, procure saber a política de descarte de produtos tóxicos de sua instituição.

7. Técnicas imuno-histoquímicas

Os corantes auxiliam o estudo histológico das características químicas teciduais e, no caso de algumas colorações especiais, destacam regiões específicas do tecido ou até mesmo classes de proteínas. Contudo, para se identificar alguns elementos teciduais, em situações normais ou patológicas, é preciso reconhecer certas proteínas específicas, o que não é possível por meio das técnicas histoquímicas. Para tal, recomenda-se a utilização de métodos imuno-histoquímicos, que, como o próprio nome sugere, reúnem conhecimentos próprios da imunologia, histologia e química.

A imuno-histoquímica se baseia na capacidade de certas substâncias com afinidade específica para determinados elementos, isto é, anticorpos. Os anticorpos, ao reconhecerem especificamente uma proteína-alvo, possibilitam a identificação molecular de elementos teciduais com observação nos diferentes tipos de microscópio.

A imuno-histoquímica tem diversas aplicações como método de auxílio ao diagnóstico de doenças inflamatórias, infecciosas e neoplasias, além de ser utilizada para determinar fatores preditivos e prognósticos no câncer.

O que são anticorpos?

Os anticorpos (Ac) ou imunoglobulinas (Ig) são um grupo especial de glicoproteínas produzidas naturalmente por células do sistema imunológico de diversas espécies animais e são classificados em cinco isotipos (tipos de imunoglobulinas): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.

O antígeno é uma substância que, em condições apropriadas, é capaz de estimular a produção de um determinado anticorpo. Quando um antígeno originário, por exemplo, de bactérias, fungos, vacinas, penetra no organismo, ele é reconhecido como elemento estranho, desencadeando uma série de eventos, como a produção de anticorpos que reconhecerão especificamente esse antígeno.

O reconhecimento do antígeno pelo anticorpo ocorre de duas formas: *química*, pela afinidade entre essas moléculas; e *estrutural*, pois os anticorpos possuem uma estrutura tridimensional que se adapta perfeitamente à estrutura do antígeno, realizando uma ligação designada *chave-fechadura*.

Ao se introduzir um antígeno específico em um animal, este reagirá contra esse antígeno e, após um determinado tempo, será possível isolar anticorpos que reconheçam o antígeno do soro desse animal. Os anticorpos são utilizados para determinar a presença desse antígeno em um tecido de outro animal. Atualmente, os anticorpos comercializados por grandes empresas são obtidos a partir de diferentes animais, como, por exemplo: camundongo, rato, coelho, macaco, porco, dentre outros, utilizando metodologias avançadas.

Aplicabilidade do uso de anticorpos

Os anticorpos podem ser utilizados em células em cultura, ou em cortes histológicos de tecidos processados segundo a técnica de inclusão em parafina, em cortes obtidos pelo método de congelação ou ainda incluído em resina.

É importante notar que, independentemente do método de processamento histológico, deve-se ter o cuidado de preservar o antígeno no tecido, evitando modificações na sua conformação tridimensional ou na composição química.

A preservação adequada dos antígenos depende de uma boa fixação e de um bom processamento. O fixador utilizado em imuno-histoquímica deve ser capaz de preservar tanto a morfologia tecidual quanto o antígeno, além de impedir sua extração e deslocamento durante o processamento do material. Não existe o fixador ideal; porém, deve-se conhecer o mecanismo de ação tecidual de cada solução fixadora para escolher o método de fixação mais adequado.

O formol, assim como os demais fixadores aldeídicos, ao estabelecer ligações cruzadas com as proteínas teciduais, torna as proteínas insolúveis na forma de um gel. Essas ligações formam uma malha que pode impedir a ligação do anticorpo ao antígeno tecidual, além de mudar a configuração tridimensional dos antígenos. Quanto maior o tempo de fixação, isto é, o tempo em que um determinado tecido é submetido ao fixador, mais pontes serão formadas. Por essa razão, é importante controlar o tempo de fixação necessário para preservar as estruturas teciduais.

Para haver reação entre o antígeno e o anticorpo em materiais fixados por aldeídos, é necessário “desmascarar” os antígenos, desfazendo as pontes intermoleculares formadas durante a fixação. Com esse objetivo, utiliza-se um procedimento denominado *recuperação antigênica*. Existem diversos mecanismos para se recuperar os antígenos em um tecido. A escolha do método ideal depende do tipo de tecido a ser analisado e da prática do laboratório.

Os principais métodos de recuperação antigênica são:

- Método enzimático, empregando-se enzimas como a tripsina ou pepsina.

- Método físico-químico por aquecimento, utilizando-se panela de pressão, panela a vapor, banho-maria e micro-ondas, devendo o material ser imerso em uma solução de tampão citrato ou tris-EDTA.
- Método físico-químico por sonicação⁵, isto é, realiza-se a sonicação em tampão citrato ou tampão tris-EDTA.

A reação imuno-histoquímica deve ocorrer em temperatura e pH controlados. Por essa razão, as lâminas devem ser mantidas em estufa ou geladeira durante o procedimento e os cortes cobertos por uma solução tamponada. Temperaturas elevadas aceleram a reação entre antígeno e anticorpo, embora diminuam a especificidade do anticorpo ao antígeno. Temperaturas mais baixas diminuem a velocidade da reação, aumentando tal especificidade.

Geralmente, na rotina laboratorial, utilizam-se estufas reguladas a 37°C em um tempo de reação de 1 hora, ou geladeira a 4°C em um tempo de reação de um dia para o outro (*over night*).

A reação imuno-histoquímica também pode variar dependendo do pH do meio em que a reação ocorre. Assim, utiliza-se uma solução de tampão fosfato (PBS) ou tampão tris (TBS) em pH 7,0 para recobrir os cortes durante as lavagens ou para diluir as demais soluções.

Tampão fosfato (PBS) pH 7,2 0,1M:

Fosfato de sódio, dibásico (Na_2HPO_4), anidro.....	1,48 g
Fosfato de sódio, monobásico (NaH_2PO_4), anidro.....	0,43 g
Cloreto de sódio (NaCl).....	7,2 g
Água destilada.....	1000 mL

⁵ **Sonicação** é o procedimento que utiliza a energia das ondas sonoras, mais comumente o ultrassom, aplicado sobre determinados sistemas químicos.

Outro fator que influencia a reação é a concentração do anticorpo. Os anticorpos devem estar diluídos em uma concentração que permita o reconhecimento do antígeno pelo seu respectivo anticorpo, sem haver perda de sua especificidade. Para se encontrar a diluição ideal de cada anticorpo, deve-se proceder a um teste utilizando-se um controle positivo, isto é, um material que se tenha conhecimento prévio da sua positividade ao anticorpo que se deseja testar. Assim, usam-se diversas diluições até se encontrar a diluição onde a marcação seja bem evidente e não haja reação inespecífica de modo a mascarar a reação.

Para visualizar a reação, os anticorpos devem estar marcados com alguma substância capaz de exibir cor. Em geral, utiliza-se um anticorpo associado a enzimas que, em etapa posterior, reagirão com substâncias cromógenas, ou anticorpos diretamente associados a fluoróforos, radioisótopos ou ouro coloidal.

A técnica enzimática mais usual na rotina laboratorial utiliza várias substâncias. Inicialmente, empregam-se anticorpos associados a uma vitamina chamada biotina (anticorpo biotinilado). Esse anticorpo reage com a estreptavidina, uma proteína que possui quatro sítios de ligação. A estreptavidina que se encontra complexada a três moléculas de biotina ligadas à enzima peroxidase reconhecerá, através de um sítio vazio, a biotina presente no anticorpo secundário. A peroxidase reage com o peróxido de hidrogênio na presença de 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que funciona como um doador de elétrons para a reação. O DAB reduzido se precipita no local da reação, sendo o produto dessa reação visualizado como um precipitado castanho (Figuras 25 e 26).

Figura 25. Representação da técnica imuno-histoquímica indireta. O antígeno presente no tecido é reconhecido pelo anticorpo primário. Um anticorpo secundário biotilado se liga ao anticorpo primário. A estreptavidina se ligará por meio do seu sítio livre à biotina, que está associada a peroxidase. Uma solução contendo peróxido de hidrogênio reage com a peroxidase na presença do DAB, formando um precipitado insolúvel castanho no local da reação.

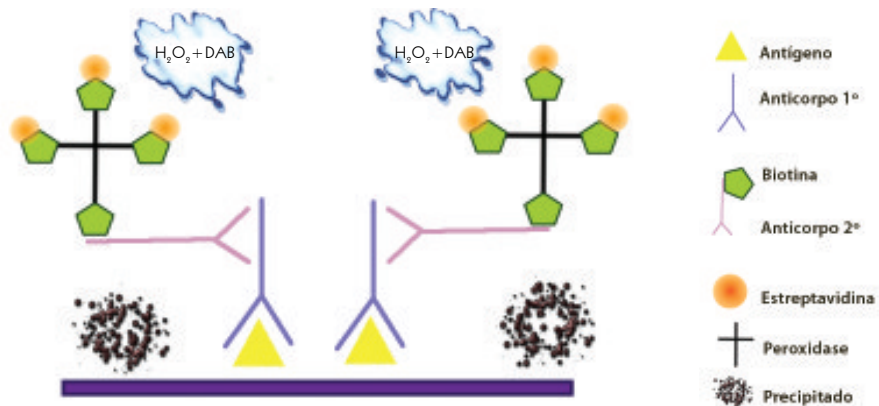
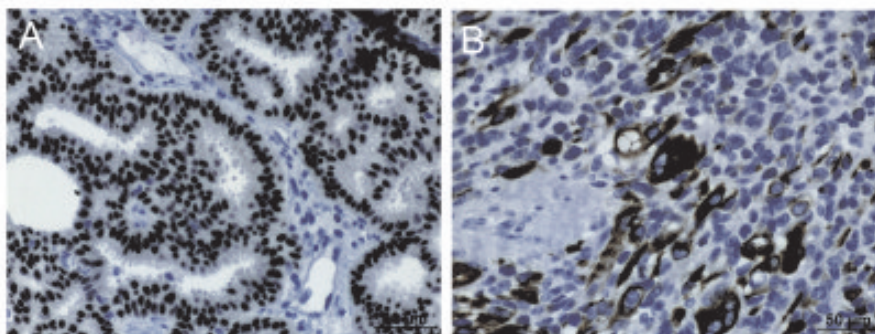


Figura 26. Técnica imuno-histoquímica indireta utilizando o método de estreptavidina biotina-peroxidase revelada por DAB. (A) Marcação nuclear identificando o receptor de progesterona. (B) Marcação citoplasmática identificando a desmina.



Existem outros métodos enzimáticos, assim como outros cromógenos, que são relatados em literatura mais específica.

Pode-se também utilizar anticorpos associados a fluoróforos. As primeiras técnicas imuno-histoquímicas descritas utilizavam fluoróforos associados a anticorpos como marcadores, e são utilizadas até hoje. Diversas substâncias são utilizadas com este propósito, como FITC (isotiociano de fluoresceína), TRITC (isotiocianato de tetraodamina), Alexa 488, Cy5, dentre outras, mas necessitam de um microscópio de fluorescência para visualizar a reação, o que torna por vezes esta técnica mais onerosa.

Normalmente, os anticorpos que fazem ligação com os antígenos teciduais (anticorpos primários) não estão associados a enzimas ou fluoróforos. Dessa forma, para visualizá-los, utilizam-se anticorpos secundários complexados à peroxidase ou a fluoróforos. Assim, denomina-se esse método como *método indireto*. Contudo, há anticorpos primários comerciais já associados com enzimas, e, por essa razão, chama-se esse tipo de reação *método direto*. A marcação direta diminui o risco de reações inespecíficas pela diminuição de etapas, em contraste com reações indiretas, que amplificam o sinal facilitando a identificação dos antígenos.

Mesmo com o cuidado na escolha da concentração adequada dos anticorpos e na manutenção da temperatura e do pH, podem ocorrer reações inespecíficas com componentes teciduais carregados eletricamente ou com receptores de imunoglobulinas teciduais. Podemos eliminar essa marcação “recobrando” esses sítios inespecíficos antes da reação com uma solução contendo albumina e um soro.

Solução de bloqueio de sítios inespecíficos :

PBS.....200 mL

Leite em pó desnatado.....5 g

Filtrar a solução.

Solução de uso:

Filtrado de leite 2,5%.....	100 mL
Albumina bovina.....	2,0 g
Soro fetal bovino.....	8 mL
Guardar solução em geladeira.	

Outro elemento capaz de causar reações inespecíficas é a peroxidase endógena tecidual. Esse problema só ocorre quando o método escolhido é o enzimático, pois o substrato cromógeno reagirá tanto com a peroxidase ligada ao anticorpo da reação quanto com a peroxidase tecidual. Nesse caso, devemos inibir a ação da enzima, utilizando uma solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3%.

Para garantir a sua qualidade, é sempre importante incluir um controle positivo e controle negativo da reação. O controle positivo é obtido com um material que sabidamente possui o antígeno analisado. Esse material permitirá confirmar, por sua marcação positiva, a qualidade da reação, caso as lâminas testadas forem negativas. O controle negativo é feito omitindo-se o anticorpo primário nas lâminas testadas, ou utilizando o mesmo isotipo do mesmo animal no qual foi produzido o anticorpo primário. Assim, com esses cuidados, o resultado da reação permite garantir que as demais etapas da reação não estão reconhecendo inespecificamente nenhum componente tecidual.

A seguir, segue uma sugestão de protocolo de reação indireta para material incluído em parafina. Nesse procedimento, utiliza-se a panela de pressão como equipamento para auxiliar na etapa de recuperação antigênica e um anticorpo secundário biotinilado, isto é, associado à biotina.

Protocolo:

- 1- Após confeccionar os cortes e aderi-los em lâminas previamente tratadas com adesivo, deixar o corte aderir à lâmina por um dia em estufa à 37 °C.
- 2- Desparafinizar e hidratar as lâminas, deixando-as por 5 minutos em cada banho nas respectivas soluções (ver pré- etapa da coloração).
- 3- Colocar cerca de 2 litros de tampão citrato em pH 6,0 em uma panela de pressão. Deixar esquentar e, quando o tampão estiver fervendo, colocar as lâminas imersas no tampão e fechar a panela. Quando a panela começar a “apitar”, deixar por mais 1 minuto e apagar o fogo. Aliviar a pressão pela válvula de segurança da panela e deixar a panela destampada para esfriar um pouco a solução (cerca de 10 minutos). Após esse tempo, lavar os cortes em água corrente por mais 10 minutos.
- 4- Lavar as lâminas por 10 minutos em PBS (tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7,2) trocando o tampão por duas vezes.
- 5- Incubar com anticorpo primário de um dia para o outro (*overnight*) em geladeira a 4°C. Cobrir os cortes delicadamente com o anticorpo, mantendo as lâminas em câmara úmida.
- 6- Lavar as lâminas em PBS em três banhos consecutivos de 5 minutos.
- 7- Incubar as lâminas por 20 minutos em uma solução de peróxido de hidrogênio 3% em PBS.
- 8- Lavar as lâminas em PBS em três banhos consecutivos de 5 minutos.

9- Incubar com anticorpo secundário biotilado por 1 hora em estufa a 37°C. Cobrir os cortes delicadamente com o anticorpo, mantendo as lâminas em câmara úmida.

10- Lavar as lâminas em PBS em 3 banhos consecutivos de 5 minutos.

11- Incubar com a estreptavidina-peroxidase por 30 minutos em câmara úmida, em temperatura ambiente.

12- Lavar as lâminas em PBS em 3 banhos consecutivos de 5 minutos.

13- Incubar as lâminas em uma solução contendo 10mg de DAB diluídos em 10 mL de PBS e cerca de 150 mL de peróxido de hidrogênio 3%. Controlar o tempo de reação ao microscópio, observando o precipitado castanho se formar nos locais onde o anticorpo reagiu. Essa reação pode durar em torno de 3 minutos.

14- Lavar as lâminas em água por 5 minutos.

15- Contracorar as lâminas em hematoxilina diluída por 30 segundos.

16- Lavar as lâminas em água corrente por 5 minutos.

17- Desidratar, clarificar e montar.

Importante: nunca deixe secar os cortes durante a reação imuno-histoquímica!

Notas de biossegurança

Durante o procedimento, tomar os cuidados citados anteriormente para o manuseio do xilol e do álcool. Manusear a panela de pressão com cuidado para evitar queimaduras ou explosões. Como o DAB é um produto altamente tóxico e tem potencial carcinogênico por exposição prolongada, evite respirar o pó seco e o contato com a pele ou mucosas e sempre utilize luvas

e jaleco durante a manipulação. Esse elemento também é tóxico para o meio ambiente, despreze a solução de DAB num frasco plástico e adicione 10 mL de hipoclorito de sódio para cada 100 mL dessa solução. Procure saber a política de descarte de substâncias prejudiciais ao meio ambiente de sua instituição.

8. Meios de selagem

Os meios de selagem, comumente chamados montagem, podem ser permanentes ou provisórios. Os meios permanentes são meios resinosos e hidrofóbicos, sendo necessária a completa remoção da água do interior dos tecidos pela desidratação e pela clarificação com o diluente do meio de selagem. Os meios provisórios são meios hidrofílicos e não necessitam da remoção da água dos tecidos, sendo os preparados descartados após a observação ao microscópio.

Meios de selagem hidrofóbicos e permanentes

Esses meios podem ser sintéticos, como o DPX e o Entelan®, ou naturais, como o bálsamo do Canadá ou a goma de Damar. Existem vários protocolos para diluição desses meios. Citaremos apenas o da goma de Damar.

Goma de Damar.....	200 g
Xilol.....	100 mL

Misturar, e esperar dissolver. Acrescentar mais goma ou xilol caso se queira uma textura mais ou menos viscosa.

Meios de selagem hidrofílicos ou provisórios

Esses meios são utilizados quando os corantes aplicados perdem a sua capacidade tintorial, ou mesmo quando o conteúdo de determinadas estruturas teciduais se altera quando os tecidos são submetidos a desidratação ou aos meios de selagem que tem o xilol como diluente.

A seguir, citamos um dos meios de selagem hidrofílicos mais utilizados, a gelatina - glicerina, por ser de baixo custo e de fácil aplicação.

Gelatina.....10 g
Água destilada.....60 mL

Aqueça até que a gelatina esteja dissolvida. Acrescente, depois, 70 mL de glicerina.

9. Artefatos de técnica

São alterações das imagens de tecidos quando os preparados histológicos são observados ao microscópio. Isso pode ocorrer devido a manipulações físicas ou químicas durante as etapas da técnica histológica.

Os artefatos, por exemplo, podem ser ocasionados por:

- dente na navalha de corte, causando fendas;
- talco na luva utilizada pelo técnico;
- precipitado de corantes ou mesmo pigmentos que se depositaram sobre o tecido;
- retração ou intumescimento tecidual provocado por algum componente químico do fixador;
- autólise associada à proliferação bacteriana devido à demora em se fixar o material;
- fragmentação e/ou rachadura do tecido provocada por elevação da temperatura da parafina durante o processamento.

- dobras no tecido formadas durante a microtomia;
- bolhas provocadas durante a selagem da lamínula sobre o preparado histológico.

Referências bibliográficas

- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4. ed. Nova York: Churchill Livingstone, 1996.
- BOGOMOLETZ, W. Avantages de la coloration par le rouge sirius de l'amyloïde et des eosinophiles. *Arch. Anat. Cytol. Pathol.*, n. 28, p. 253-253, 1980.
- CAPUTO, L. F. G. *Manual da disciplina de Histotecnologia do curso técnico de Pesquisa em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.
- CARSON, F. L. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. 2. ed. Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1997.
- CARSON, F. L.; MARTIN, J. H.; LYNN, J. A. Formalin Fixation for Electron Microscopy: A Re-evaluation. *Am. J. Clin. Pathol.*, n. 59, p. 365-373, 1973.
- FEULGEN, R.; ROSSENBECK, H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thyminucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung vom Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Z. Phys. Chem.*, n. 135, p. 203-248, 1924.
- FITE, G. L.; CAMBRE, P. J.; TURNER, M. H. Procedure for Demonstrating Lepra Bacilli in Paraffin Sections. *Arch. Pathol.*, n. 43, p. 624, 1947.
- GOMORI, G. Silver Impregnation of Reticulum in Paraffin Sections. *Amer. J. Path.*, n. 13, p. 993-1.002, 1937.
- GRIMALDI FILHO, G. *Manual de técnica histológica*. Rio de Janeiro: CME/IOC/Fiocruz, 1981.
- GROCOTT, R. G. A Stain for Fungi in Tissue Sections and Smears using Gomori Methenamine Silver Nitrate Technique. *Am. J. Clin. Pathol.*, n. 25, p. 975, 1955.
- JUNQUEIRA C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. *Técnicas básicas de citologia e histologia*. São Paulo: Santos, 1983.
- KERR, D. A. Improved Warthin-Starry Method for Tissue Sections. *Amer. J. Clin. Path. Tech.*, supp. 8, p. 63-67, 1938.

- KIERNAN, J. A. *Histological & Histochemical Methods. Theory & Practice*. 3. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2000.
- LENNERT, K. *Malignant Lymphomas other than Hodgkin's Disease*. Histology. Cytology. Ultrastructure. Immunology. Berlin: Springer-Verlag, 1978.
- LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulfate Groups with Alcian Blue at Low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, n. 12, p. 309, 1964.
- LUNA, L. G. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3. ed. Nova York: McGraw-Hill, 1968.
- LUQUE, E. H.; MONTES, G. S. Progesteron Promotes a Massive Infiltration of the Rat Uterine Cervix by Eosinophilic Polymorfonuclear Leukocytes. *Anatomical Records*, v. 223, n. 3, p. 257-265, 1989.
- MASSON, P. J. Trichrome Stainings and their Preliminary Techniques. *J. Tech. Met.*, v. 12, p. 75, 1929.
- MAYER, P. Notiz über Hämatein und Hämalan. *Z. Wiss. Mikrosk. Mikrosk. Tech.*, n. 20, p. 409, 1903.
- MCMANUS, J. F. A. Histological Demonstration of Mucin after Periodic Acid. *Nature*, n. 158, p. 202, 1946.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica*. 3. ed. São Paulo: Michelany, 1981.
- PROPHET, E. B. et al. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992.
- SHEEHAN, D. C.; HRAPCHAK, B. B. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2. ed. St. Louis: C. V. Mosby, 1980.
- SOUTHGATE, H. W. Note on Preparing Mucicarmine. *J. Path. Bact.*, v. 30, p. 729, 1927.
- WOODS, A. E.; ELLIS, R. C. *Laboratory Histopathology: A Complete Reference*. Nova York: Churchill Livingstone, 1994. 2 v.