



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
NÚCLEO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO/2021

Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações

Katharine Raquel Pereira dos Santos

Doutorado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Paraíba. Docente do Núcleo de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória.

Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Doutorado em Estomatopatologia pela Universidade Estadual de Campinas. Docente do Núcleo de Biologia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória.

Erivaldo Alves Antonio

Doutorando em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife.

Fabricya Roberta da Silva

Doutorado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife.

Keila Tamires da Silva

Doutoranda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco. Departamento de Bioquímica, Recife.

Ketsia Sabrina do Nascimento Marinho

Doutorado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife.

Nivaldo Bernardo de Lima Junior

Doutorado em Biociência Animal pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife.

Catálogo na Fonte
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB4/2005

M294 Manual de técnica histológica de rotina e de colorações/ Katharine Raquel Pereira dos Santos [et al.] - Vitória de Santo Antão, 2021.
32 p. (1,51 MB); il.

Inclui referências.

1. Histologia. 2. Microscopia. 3. Citologia. I. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás. II. Antonio, Erivaldo Alves. III. Silva, Fabricya Roberta da. IV. Silva, Keila Tamires da. V. Marinho, Ketsia Sabrina do Nascimento. VI. Lima Junior, Nivaldo Bernardo de. VII. Título.

611.01 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE - 072/2021

APRESENTAÇÃO

O Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações tem como objetivo fornecer informações sobre os procedimentos que servirão como guia para a obtenção de preparados histológicos através da técnica histológica de rotina, assim como as colorações básicas e alguns métodos histoquímicos mais utilizados para a análise das estruturas e componentes citológicos e teciduais. Estas técnicas possibilitam a produção de lâminas histológicas para diversos fins, como: ensino, pesquisas e diagnósticos.

O presente manual foi elaborado através do projeto de Extensão “Histologia em Foco: Aperfeiçoamento do Acervo Didático para o Ensino Básico e da Graduação” e dos Cursos de Extensão em Histotecnologia, realizados ao longo do desenvolvimento do projeto para proporcionar aos monitores e alunos da graduação e da pós-graduação, treinamento para a confecção de recursos didáticos utilizados nas atividades práticas, originando assim, uma maior integração entre os professores e alunos que atualmente utilizam os Laboratórios de Biotecnologia e Fármacos e de Microscopia I e II no âmbito do Ensino, da Pesquisa e da Extensão.

SUMÁRIO

TÉCNICA HISTOLÓGICA DE ROTINA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA	1
1. Coleta de Material	1
2. Fixação	2
3. Descalcificação	3
4. Clivagem	4
5. Processamento Histológico	5
6. Inclusão	8
7. Microtomia	9
COLORAÇÕES PARA CITOLOGIA E HISTOLOGIA	11
1. Coloração de rotina com H.E. (Hematoxilina e Eosina)	13
2. Colorações citológicas	
2.1. Coloração May Grunwald – Giemsa	15
2.2. Coloração de Papanicolaou	16
2.3. Coloração de SHORR	17
3. Colorações Histoquímicas	
3.1. Coloração de Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.)	19
3.2. Coloração de Alcian Blue pH 1,0 e 2,5	20
3.3. Coloração de AgNOR	22
3.4. Coloração de Picrosírius	23
3.5. Coloração de Tricômico de Gomori	24
3.6. Coloração de Tricômico de Mallory	24
3.7. Coloração de Tricômico de Masson	25
3.8. Coloração de Verhoeff	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

TÉCNICA HISTOLÓGICA DE ROTINA PARA MICROSCOPIA ÓPTICA

A técnica histológica compreende uma série de procedimentos técnicos, os quais visam a obtenção de preparados histológicos através de amostras biológicas para a análise do tecido sob o microscópio óptico, seja por interesse do ensino, da pesquisa científica ou do diagnóstico patológico. Entre os procedimentos realizados, estão: a coleta do material, a fixação, a descalcificação, a clivagem, o processamento, a inclusão, a microtomia e a coloração, esta última de rotina ou histoquímica.

1. Coleta do Material

O objetivo da coleta é retirar os órgãos a serem analisados de um determinado organismo. Dependendo do material a ser coletado, a remoção pode ser realizada com o organismo ainda vivo por biópsia ou durante uma cirurgia, assim como, após a morte pela realização de necropsia. A técnica de perfusão cardíaca (Fig. 1) também é muito utilizada para obtenção do material e resulta em boas preparações histológicas, uma vez que simula o funcionamento do sistema circulatório para levar através dos vasos sanguíneos, soluções químicas que perfundem até os tecidos, preservando a sua estrutura de forma mais eficaz. O processo consiste inicialmente na retirada da circulação sanguínea através da lavagem feita com uma solução salina de pH neutro e anticoagulante, em seguida, procede-se à injeção da solução fixadora.

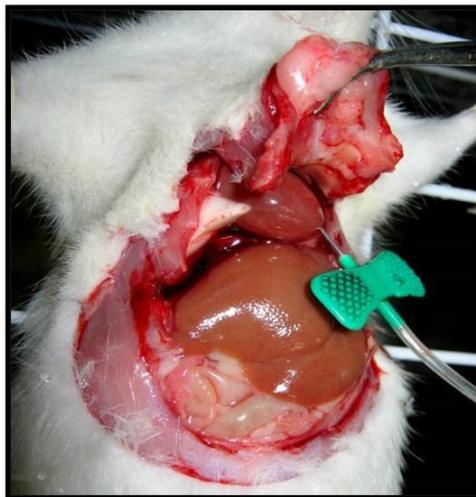


Figura 1: Técnica de perfusão cardíaca, com injeção de substâncias através de cateter no ventrículo esquerdo (Fonte: Xavier, 2012).

Após a retirada dos órgãos de interesse, os mesmos devem ser identificados e registrados em livros de protocolos sob um número de registro, o qual acompanhará o material durante todo o processamento, até o seu arquivamento.

Dica: Manusear as peças com delicadeza, devido à fragilidade dos tecidos. Uma pressão exagerada ou mesmo o uso de instrumentos inadequados, além de dificultar o exame histopatológico, altera o tecido de tal maneira que pode simular uma lesão.

2. Fixação

A fixação consiste em uma das etapas mais importante da técnica histológica e tem por finalidade a interrupção do metabolismo celular, estabilizando as estruturas e os componentes bioquímicos intra e extracelulares para preservar e conservar os elementos teciduais. Também permite a penetração de outras substâncias subsequentes à fixação.

Ela pode ser realizada por meio de agentes físicos (frio e calor) ou químicos (líquidos fixadores). A fixação química é a mais utilizada na técnica histológica de rotina. Os mais utilizados são os fixadores formaldeídos, como formalina a 10%; formol-salino; formalina tamponada de Carson ou formalina em tampão Millonig; formalina-alcoólica e a mais utilizada rotineiramente, é a formalina neutra tamponada a 10%. Outras substâncias também são utilizadas como a acetona, os ácidos acético e pícrico, o álcool etílico e o fixador de Bouïn. Alguns fatores podem influenciar na fixação do tecido a ser analisado, como temperatura, espessura do tecido, tempo de fixação (depende do tamanho da peça, mas varia de 12 a 48 horas em temperatura ambiente), escolha do fixador, Ph e concentração do fixador.

Preparação da Formalina neutra tamponada 10%

Formalina 37 – 40%	100 ml
Água destilada	900 ml
Fosfato de Sódio Monobásico	4,0 g
Fosfato de Sódio Dibásico (Anidro)	6,5 g

Dicas: Não é indicado coletar fragmentos grandes do material biológico. Uma vez que, pode interferir na penetração do fixador no tecido, ocorrendo uma fixação superficial do material. Também é importante estar atento às características do recipiente que contém as peças. Um recipiente muito pequeno, além de não proporcionar um volume adequado do fixador para o tamanho e a quantidade do material biológico (volume do fixador deve ser, no mínimo, 10 vezes o volume do material), também pode fazer com que a peça se dobre, resultando num aumento de espessura e consequente na má penetração pelo fixador.

3. Descalcificação

A descalcificação consiste em retirar os componentes inorgânicos do tecido, como o fosfato de cálcio, presente em tecidos ósseos. Este procedimento pode ser realizado por meios químicos (pH ácido, soluções quelantes e meios de troca iônica) e físicos (ultrassom e micro-ondas). O método físico acelera o processo de descalcificação, por isso, é sempre associado ao químico. Os meios químicos são os mais utilizados, como a descalcificação por ácidos. Dentre os descalcificadores ácidos, há os fortes (ácido nítrico e ácido clorídrico) e os fracos (ácido fórmico, ácido acético e ácido pícrico), sendo os fracos os mais utilizados por possuir ação fixadora e causar menos danos aos tecidos.

É imprescindível que durante a manipulação destas substâncias, sejam utilizadas luvas específicas para a manipulação química e máscara com filtro próprio para vapores ácidos. O preparo dessas soluções deve ser feito em capela de exaustão.

Dicas: Reduza ao máximo o tamanho do material a ser descalcificado, assim reduzirá o tempo de descalcificação. Renove o descalcificador diariamente, pois ele vai perdendo a sua concentração original. É essencial a lavagem do material antes e após a descalcificação. O volume do descalcificador deve ser, no mínimo, vinte vezes o tamanho da peça. Para verificar se o material está totalmente descalcificado, podem ser utilizados meios físicos (inserir uma agulha bem fina para verificar o grau de mineralização) ou químicos (através do oxalato de amônia).

4. Clivagem

A clivagem tem por objetivo reduzir o tamanho do material biológico a ser analisado com a finalidade de facilitar a penetração do fixador em menor tempo, evitando assim, o processo de autólise. O corte do material (sagital, transversal ou oblíquo) determina como os tecidos serão incluídos no bloco para serem cortados no micrótomo. Após a clivagem o material será acondicionado em cassetes histológicos identificados (Fig. 2).

Dicas: Nunca comprima o material a ser clivado com pinça ou qualquer outro instrumento, pois a força imprimida pode causar distorção da estrutura tecidual. O ideal é que, na clivagem, os fragmentos tenham cerca de 3 mm de espessura, entretanto, dependendo do tipo de órgão, esse fragmento pode chegar a mais do que 5 mm.



Figura 2: Cassete histológico contendo o fragmento de tecido com sua respectiva identificação.

5. Processamento histológico

O processamento histológico consiste na difusão de reagentes químicos para o interior dos tecidos e na remoção do líquido tecidual. Este procedimento torna os fragmentos dos tecidos rígidos facilitando a obtenção de cortes finos para a observação ao microscópio. No processamento de rotina, o material passa pelas etapas de desidratação, diafanização, impregnação e inclusão, sendo a parafina, a substância mais utilizada nas duas últimas etapas indicadas.

● Desidratação

O objetivo da desidratação é retirar a água presente no tecido, visto que a parafina é insolúvel em água. O álcool etílico é o produto mais utilizado para esse fim. O processo de desidratação é realizado de forma progressiva quanto à graduação alcoólica.

- Álcool 70%
- Álcool 80%
- Álcool 90%
- Absoluto I (Álcool 100%)
- Absoluto II (Álcool 100%)

(1h para cada banho de álcool).

● Diafanização ou Clarificação

A finalidade da diafanização ou clarificação é remover completamente o álcool do interior dos tecidos, visto que a parafina não se mistura homoganeamente com o álcool. Desta forma, é necessário substituir o álcool por um produto com o qual a parafina tenha afinidade. Este reagente intermediário deve ser miscível com o desidratante (álcool) e o impregnador (parafina). O xilol é o agente utilizado nesta etapa do processo histológico de rotina. Ao substituir o álcool esse diafanizador vai deixando o tecido mais claro (quase transparente), por isso este processo também é chamado de clarificação. Nesse processo é recomendado o tecido passar mais de uma vez no diafanizador (xilol) para que obtenha um maior sucesso nesta etapa.

- Xilol I
- Xilol II

(1h para cada banho de xilol).

- **Impregnação**

A impregnação consiste na infiltração da parafina líquida no material biológico para que o tecido adquira rigidez suficiente e seja possível a realização de cortes finos. O objetivo desta etapa é eliminar completamente o xilol contido na peça e a total penetração da parafina nos espaços deixados pela água e pela gordura, antes existentes no tecido. Neste procedimento, também é recomendável passar o material mais de uma vez na parafina líquida, visando garantir uma impregnação eficiente. Esta etapa deve ser realizada em estufa regulada a 60° C. Lembrar que a parafina deve ser colocada na estufa, anteriormente à realização desta etapa, para que ela possa derreter.

- Parafina I
- Parafina II

(1h para cada banho de parafina em estufa regulada a 60° C).

As etapas do processamento histológico citadas acima, podem ser realizadas manualmente (Fig. 3), utilizando recipientes contendo cada um dos banhos dos reagentes e a troca é feita também de forma manual do material em cada banho, ou automaticamente, por meio de processador automático, chamado histotécnico (Fig. 4). Nestes processadores, os cassetes contendo os materiais biológicos são colocados em uma cesta que é transportada mecanicamente de forma a imergir os cassetes em cada reagente.

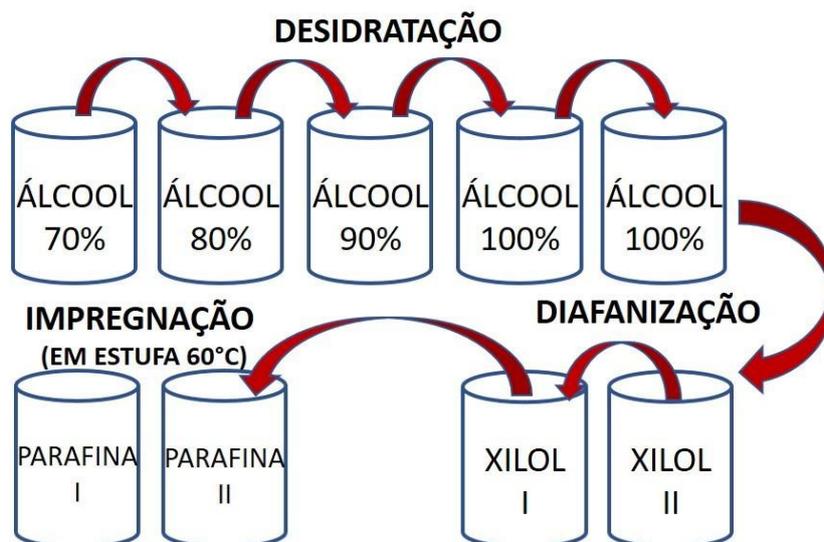


Figura 3: Etapas do processamento histológico realizado manualmente, utilizando recipientes contendo os reagentes.



Figura 4: Equipamento histotécnico que realiza o processamento automático do tecido.

Alguns fatores que podem influenciar no processamento histológico são a temperatura (temperatura não controlada pode acelerar ou retardar a ação dos reagentes), o vácuo (aumento de ar no tecido interfere na velocidade de penetração dos reagentes) e a agitação (agitação não eficiente). Estes fatores são fundamentais para a obtenção de preparados histológicos de boa qualidade.

Dicas: Para a realização do procedimento histológico manual:

Na **desidratação** do tecido realize, várias trocas de álcool, pois a água será eliminada com o álcool desprezado. Na **clarificação**, não deixe o material por muito tempo em xilol, pois ele resseca muito o material, interferindo na sua qualidade. Enquanto na **impregnação**, nunca deixe 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.

6. Inclusão

O objetivo da inclusão é envolver o exterior do material biológico com a parafina líquida para formar blocos que serão submetidos posteriormente à microtomia.

Nesta etapa o material é colocado com a superfície (clivada) a ser cortada para baixo em um molde para inclusão (Fig. 5), que será preenchido com a parafina líquida (Fig. 6), e em seguida coberto com o cassete. Após o resfriamento, os blocos de parafina com o material incluído são obtidos (Fig. 7). É importante estar atento à posição em que as peças serão colocadas no molde, visto que isso determinará a incidência de corte que será realizada.



Figura 5: Molde de metal para inclusão do fragmento do material após a impregnação do tecido.



Figura 6: Dispensador de parafina. Equipamento no qual a parafina sólida (barra ou lentilha) é colocada para derreter e ser utilizada para encher os moldes de inclusão.



Figura 7: Fragmento do material biológico incluído em bloco de parafina para ser cortado.

Dicas: Nunca coloque o material biológico em contato direto com o molde, sempre coloque um pouco de parafina antes de inserir o seu fragmento e depois, termine de preencher o molde com a parafina. Desta forma, evita-se a aderência do material no metal do molde e a subsequente formação de buracos no bloco de parafina.

7. Microtomia

A microtomia consiste em executar cortes bem finos com espessura de 3 a 6 micrômetros para a passagem de luz e observação do tecido ao microscópio. O equipamento utilizado para a obtenção dos cortes é o micrótomo (Fig. 8). Há vários tipos de micrótomos, porém, o mais utilizado na técnica histológica de rotina é o micrótomo rotatório (tipo Minot). A navalha é uma das peças fundamentais nesse equipamento, sendo responsável por executar os cortes que podem ser de diversos tipos. As navalhas mais utilizadas são as descartáveis por possuírem custo menor em relação às de aço.

Para a realização da microtomia, o bloco precisa estar resfriado e fixo no micrótomo para obter uma fatia fina do material. Os cortes obtidos devem ser levados com o auxílio de uma pinça ao banho-maria (Fig. 8) à temperatura aproximada de 40 a 50°C para que as fitas de parafina se distendam sobre a água, evitando a formação de dobras no tecido. Em seguida, os cortes são pescados com lâminas previamente limpas e

identificadas, que serão encaminhadas à estufa à 60° C por um período mínimo de 2 horas. Para evitar que os cortes se desprendam das lâminas durante o processo de coloração utilizam-se adesivos, como a albumina de Mayer.

Dicas: Resfrie os blocos a serem cortados uma hora antes, ou mais, da microtomia, para endurecer mais a parafina e umedecer a superfície do tecido. Pode-se utilizar cubos de gelo. Para facilitar o corte de material muito ressecado, pode colocá-lo em solução de glicerina (50% de água destilada e 50% de glicerina líquida) em geladeira por cerca de 2 horas. Não deixar o material nesta solução por períodos prolongados, visto que pode hidratar demais e estragar a peça. Colocar a superfície brilhante da fita para baixo, em contato com a água, e fazê-la caminhar sobre a superfície da água antes de soltá-la da pinça para facilitar o total estiramento do corte.



Figura 8: Micrótopo rotativo semi automático e banho-maria histológico.

COLORAÇÕES PARA CITOLOGIA E HISTOLOGIA

A coloração compreende uma etapa importantíssima para a visualização e interpretação do material citológico e histológico a ser observado em microscópio óptico. As lâminas citológicas obtidas através de esfregaços/estiraços, após a sua fixação, seguem a coloração que julgar mais adequada dentre as que estão descritas mais adiante neste manual. Enquanto para as lâminas histológicas, a coloração é imprescindível para a observação dos componentes teciduais, uma vez que o processamento de rotina deixa a peça translúcida devido ao xilol e à microtomia. A coloração a ser utilizada para as lâminas histológicas deve seguir o objetivo da análise. Para uma observação geral dos componentes teciduais, a técnica de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (H.E.) é a mais indicada. Já, para a análise de elementos específicos do tecido, é recomendável a utilização de técnicas histoquímicas.

Como os corantes utilizados para ambas as técnicas de coloração histológica (rotina e histoquímica), geralmente são hidrossolúveis, é necessário a remoção da parafina e a reidratação do corte antes da utilização dos corantes. Após a coloração, a desidratação e a clarificação são necessárias para possibilitarem a montagem da lâmina tanto citológica, quanto histológica. Seguem abaixo os procedimentos necessários para realizar a coloração de lâminas histológica e citológica, para esta última, após a fixação do material, seguem as etapas do procedimento a partir da coloração.

Procedimentos gerais para colorações

Este procedimento consiste em remover a parafina do tecido a ser corado, seguindo as etapas abaixo:

Desparafinização: tem por objetivo remover a parafina do tecido após a microtomia, utilizando dois banhos de xilol.

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

Hidratação: tem por finalidade hidratar o tecido com concentrações decrescentes de álcool.

- Álcool absoluto I (1 min)
- Álcool absoluto II (1 min)
- Álcool 90% (1 min)
- Álcool 80% (1 min)
- Álcool 70% (1 min)
- Água destilada (1 min)

Coloração: é o ato de corar o tecido com o corante escolhido para a posterior visualização em microscópio de luz.

Desidratação: tem por objetivo retirar a água do tecido por meio de concentrações de álcool crescentes, visto que os meios de selagem não são miscíveis em água.

- Álcool 70% (1 min)
- Álcool 80% (1 min)
- Álcool 95% (1 min)
- Álcool absoluto I (3 min)
- Álcool absoluto II (3 min)

Clarificação: tem por finalidade usar o xilol para remover o álcool, que este último também não é miscível com o meio de montagem, e após esta etapa, realizar a montagem da lâmina.

- Xilol I (10 min)
- Xilol II (10 min)

Selagem ou montagem da lâmina: esta etapa consiste em cobrir o tecido com uma lamínula de vidro, usando um meio de montagem para fixar a lâmina à lamínula (selagem). Os meios de montagem mais utilizados são com Bálsamo do Canadá, Ethelan etc.

Dicas: No ato da selagem, cuidado com a formação de bolhas nas lâminas, pois elas dificultam a análise do tecido.

1. Coloração de rotina com H.E. (Hematoxilina e Eosina)

Objetivo da coloração: essa coloração é utilizada para visualizar as características estruturais gerais do tecido.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Hematoxilina de Harris

- 1 g de hematoxilina cristalizada
- 10 ml de álcool absoluto
- 20 g de alúmen de potássio ou de amônio
- 200 ml de água destilada
- 0,5 g de óxido de mercúrio (vermelho)
- 8 ml de ácido acético glacial (optativo)

Dissolver a hematoxilina no álcool ligeiramente aquecido, dissolver o alúmen em água aquecida. Misturar as soluções e aquecer até ferver. Tirar do fogo e adicionar imediatamente e aos poucos, o óxido de mercúrio (agitando para não explodir). Resfriar a solução o mais rapidamente possível, mergulhando o frasco num vasilhame (ou na pia) contendo água fria. Acrescentar o ácido acético e filtrar. Estocar em vidro escuro. Dura cerca de 3 meses. Deve-se filtrar a solução toda vez que for usar.

B) Eosina

✓ Eosina alcoólica

Eosina a 1% (Solução Estoque)

- 1 g de eosina Y
- 20 ml de água destilada
- 80 ml de álcool etílico a 96%

✓ Eosina (Solução de trabalho)

- 100 ml de eosina a 1%
- 400 ml de álcool etílico a 96%
- 0,5 ml de ácido acético glacial

Para a preparação da solução estoque, diluir a eosina na água destilada, filtrar após adicionar o álcool. Já na solução para uso, após diluir a solução de eosina 1%, adicionar o ácido acético glacial e filtrar. O ácido acético permite ajustar o pH da solução para valores próximos de 5.

✓ Eosina aquosa

1 g de eosina Y

100 ml de água destilada

Após a dissolução da eosina na água, adicionar umas gotas de formol para evitar o crescimento de fungos. A adição de 0,5 ml de ácido acético a cada 500 ml de solução, ajusta o pH para valores próximos de 5.

✓ Eosina-Floxina B

Solução de Floxina a 1%

1 g de floxina B

100 ml de água destilada

✓ Solução Eosina-Floxina

100 ml de eosina Y aquosa a 1%

10 ml de floxina B a 1%

780 ml de álcool etílico a 96%

4 ml de ácido acético glacial

Misturar as soluções de eosina Y e eosina floxina no álcool, adicionar o ácido e filtrar.

Etapas da coloração Hematoxilina e Eosina

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto, para assim receber o primeiro corante, a hematoxilina. As lâminas ficam imersas no corante por 3 minutos (depende do tempo de preparo e uso do corante).
- 3ª Etapa: lavar as lâminas com água corrente por 10 minutos e corar com eosina por 7 minutos (depende do tempo de preparo e uso do corante).
- 4ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: os núcleos coram-se de azul a roxo pela hematoxilina, enquanto que o citoplasma e os espaços extracelulares são corados pela eosina, em róseo ou avermelhado.

Dicas: É aconselhável sempre filtrar os corantes antes do uso. Se a lâmina ficar muito corada quando passar pela Hematoxilina, pode lavar rapidamente em solução álcool ácido (99,5 ml de álcool P.A. + 0,5 ml de ácido clorídrico concentrado) e após, em água corrente por 2 minutos.

2. Colorações Citológicas

2.1. Coloração May Grunwald – Giemsa

Objetivo da coloração: utilizada para coloração de células. Esta coloração consiste em uma mistura de corantes com características neutras, que coram os componentes nucleares e citoplasmáticos das células. É um método que obtém um resultado final melhor e mais detalhado quando comparado com a coloração Giemsa simples.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Giemsa

6 g de giemsa

500 ml de metanol

500 ml de glicerol

B) May Grunwald

2 g de May Grunwald

1000 ml de metanol

Etapas da coloração May Grunwald – Giemsa

- 1ª Etapa: coleta e fixação do material em solução álcool/éter em partes iguais.
- 2ª Etapa: cobrir a lâmina com o corante de May Grunwald e deixar atuar por 2 minutos.
- 3ª Etapa: acrescentar 20 gotas (1 ml) de água destilada tamponada pH 7,0-7,2 deixar atuar por 1 minuto e homogeneizar. Escorrer sem lavar.

- 4ª Etapa: cobrir com a solução de Giemsa diluída (1 gota de corante Giemsa para cada 1 ml de água destilada) e deixar atuar por 13-15 minutos (avaliar o tempo em função da espessura dos esfregaços ou da sua preferência). Após isso, lavar com água destilada.
- 5ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: as colorações evidenciadas são: citoplasma em rosa, núcleos e plaquetas em azul, hemácias em vermelho e grânulos em púrpura.

2.2. Coloração de Papanicolaou

Objetivo da coloração: utilizada para detectar alterações em células do colo uterino. Também é utilizada para células colhidas por raspagem em cavidades como: vagina ou cervico-vaginal, mucosa bucal e fluidos com células (escarro, urina, líquido cefalorraquidiano, líquido abdominal, líquido pleural, líquido sinovial e líquido seminal).

Preparo dos corantes e soluções:

A) Hematoxina de Harris

A mesma preparada para a coloração de H.E.

B) EA-36

2 g de ácido fosfotúngstico

900 ml de álcool etílico anidro

2,25 g de eosina amarelada

2,25 g de light green

0,5 g de marrom bismark Y

100 ml de água destilada

0,5 ml de solução saturada de carbonato de lítio

B) Orange G-6

0,15 g de ácido fosfotúngstico

800 ml álcool etílico

5 g de orange G

200 ml de água destilada

Diluir os corantes na água destilada e no álcool. Filtrar antes de usar.

Etapas da coloração Papanicolaou

- 1ª Etapa: coleta e fixação do material em álcool etílico 70-90%, isopropílico a 70-90% ou polietilenoglicol (este deve ser eliminado do esfregão antes da coloração por meio de imersão em álcool etílico 50% por 2 minutos). Em seguida, mergulhar em água destilada por 1 minuto.
- 2ª Etapa: corar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavar com água destilada por 2 minutos.
- 3ª Etapa: mergulhar em água amoniacal por 30 segundos e lavar em água corrente por 2-3 minutos.
- 4ª Etapa: desidratar em álcool etílico em concentrações crescentes.
- 5ª Etapa: colocar em Orange G por 2 minutos.
- 6ª Etapa: mergulhar em álcool absoluto (dois banhos I e II de 1 minuto cada).
- 7ª Etapa: corar em EA 36 por 2 minutos.
- 8ª Etapa: mergulhar em álcool absoluto (dois banhos I e II de 1 minuto cada).
- 9ª Etapa: clarificação e montagem.

Resultados: células superficiais: citoplasma rosa, núcleo piquinótico escuro. Células intermediárias e profundas: citoplasma azul, núcleo róseo. Células glandulares: células arredondadas com citoplasma azul e núcleo róseo Hemácias: vermelhas. Polimorfonucleares: azuis com núcleo visível. Flora normal: bacilos e cocos azuis a roxos.

2.3. Coloração de SHORR

Objetivo da coloração: semelhante ao método de Papanicolaou. Bastante utilizada também para detecção da fase do ciclo estral de ratas.

Preparo dos corantes e soluções:

A) SHORR

0,5 g de biebrich scarlat red

0,25 g de orange G

0,075 g de fast green FCF
0,5 g de ácido fosfotúngstico
0,5 g de ácido fosfomolibdico
1 ml de ácido acético glacial
100 ml de álcool 50°

Diluir os reagentes no álcool, adicionar o ácido acético e filtrar.

Etapas da coloração SHORR

- 1ª Etapa: coleta e fixação do material em solução álcool/éter em partes iguais.
- 2ª Etapa: hidratar, lavar em água destilada por 1 minuto e rapidamente em água corrente.
- 3ª Etapa: colocar em etanol 60% (5-10 mergulhos) e lavar em álcool 90° por 1 minuto.
- 4ª Etapa: corar com Shorr por 5-6 minutos.
- 5ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: células eosinofílicas: citoplasma vermelho/laranja. Células basofílicas: citoplasma azul/esverdeado. Núcleos: azul/violeta escuro/marrom.

Dicas: Reconhecimento das fases do ciclo estral de ratas: diestro atrófico, com poucas células epiteliais pequenas, arredondadas e nucleadas, enorme quantidade de polimorfonucleares e muco; proestro esfregaço compõe-se principalmente de células epiteliais arredondas ou ovaladas e nucleadas, enquanto no final desta fase predominam as células poligonais grandes, achatadas e com núcleo picnótico, sendo que já existem células anucleadas; estro, o esfregaço está constituído basicamente por células cornificadas (células poligonais, grandes, achatadas, anucleadas e acidófilas); metaestro constitui-se de células cornificadas, polimorfonucleares e muco, ao passo que, no final desta fase, a imagem é de muitas células epiteliais ovaladas ou arredondadas e nucleadas, associadas a polimorfonucleares e muco.

3. Colorações Histoquímicas

3.1. Coloração de Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.)

Objetivo da coloração: essa coloração tem utilidade tanto na histologia, quanto na patologia e objetiva detectar amido, mucina, base de membrana no tecido epitelial, reticulina, cápsula de fungos, grânulos zimogênicos pancreáticos, suspensão coloidal de tireoides, corpos de Russell, e corpos amiláceos.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Reativo de Schiff

1 g de fucsina básica

400 ml de água destilada

9 g de metabissulfito de sódio

10 ml de ácido clorídrico (HCL) concentrado

5 g de carvão ativado

Inicialmente, deve-se dissolver a fucsina na água destilada adicionada de HCL, e depois juntar ao metabissulfito de sódio. Com o frasco fechado, essa solução deverá ser agitada por 20 a 30 minutos, de modo que fique límpida e de cor marrom avermelhado. Na sequência, deverá ser acrescentado o carvão ativado para descolorir. Após isso, deverá agitar a solução, por cerca de 2 minutos e filtrar. O filtrado deverá ser incolor. O reativo só poderá ser usado, no mínimo, 6 horas depois da sua preparação, e deverá ser guardado na geladeira.

Dicas: Depois de preparar o Reativo de Schiff é importante testá-lo. Para tanto, deve-se pingar gotas dele em um pouco de formol a 10%. Caso a solução fique vermelho-púrpura, indica que o reativo poderá ser utilizado.

B) Ácido periódico (0,5 ou 1 %)

0,5 ou 1 g de ácido periódico cristalizado

100 ml de água destilada

C) Água Sulfurosa (fazer no momento do uso)

10 ml de metabissulfito de sódio a 10%

10 ml de HCL 1 N

180 ml de água destilada

Etapas da coloração do Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.)

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 3 minutos, para assim receber o corante.
- 3ª Etapa: tratar durante 15 minutos com Ácido Periódico a 1% (na geladeira).
- 4ª Etapa: lavar rapidamente em água destilada (3 minutos).
- 5ª Etapa: deixar 1h no Reativo de Schiff (no escuro e na geladeira).
- 6ª Etapa: dar 3 banhos em água sulfurosa (3 minutos em cada). É importante que seja preparada no momento em que será usada.
- 7ª Etapa: lavar as lâminas com água corrente por 10 minutos e corar com hematoxilina por 40 segundos (depende do tempo de preparo e uso do corante).
- 8ª Etapa: Lavar 10 minutos em água corrente.
- 9ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: as lâminas coradas com P.A.S. e que, reagirem positivamente, formarão um precipitado na cor magenta, indicando a presença de moléculas com elevado nível de glicogênio ou polissacarídeos neutros, contendo grupos 1,2 – glicol. Portanto, os monossacarídeos que não tem 1,2 – glicol ou tem grupos hidroxila que estejam relacionados numa ligação éster ou glicosídica, não são suscetíveis à oxidação do ácido periódico, por isso, não são detectados com a técnica de P.A.S.

3.2. Coloração de Alcian Blue pH 1,0 e 2,5

Objetivo da coloração: a técnica de coloração com Alcian Blue é utilizada para evidenciar os diferentes tipos de glicosaminoglicanas ácidas que podem estar presentes nas mucinas ou proteoglicanas ácidas, sulfatadas ou não sulfatadas, que podem ser encontradas no tecido conjuntivo. Através da coloração Alcian blue em pH 1,0, é possível evidenciar as

mucinas sulfatadas/os carboidratos ácidos sulfatados. Enquanto a coloração Alcian blue em pH 2,5 é possível detectar as mucinas ácidas/os carboidratos ácidos carboxilados.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Alcian Blue pH (1,0) (1% em ácido clorídrico (HCl) 0,2 N)

1 g de alcian blue 8GX;

100 ml de ácido clorídrico (HCl) 0,1N (para pH 1,0);

Para cada 100 ml de HCl 0,1N é necessário: 0,83 ml de HCl em 99,17 ml de água destilada.

Dicas: Depois de preparar a solução corante é necessário medir o seu pH. Desse modo, caso seja necessário, deverá acertá-lo com HCl 1N ou NaOH 1N.

A) Alcian Blue pH (2,5) (Alcian Blue 8GX 1% em solução aquosa de ácido acético a 3%)

97 ml de água destilada

3 ml de ácido acético glacial

1 g de alcian blue 8GX

Dicas: Depois de preparar a solução corante é preciso medir o seu pH para confirmar se realmente está com pH = 2,5. Com isso, caso seja necessário, deverá acertá-lo com HCl 1N ou NaOH 1N.

Etapas da coloração do Alcian Blue pH (1,0 e 2,5)

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: depois, deverão ser colocados no HCl 0,1N (Alcian Blue 1,0) ou em solução aquosa de ácido acético 3% (Alcian Blue 2,5) durante 3 minutos.
- 4ª Etapa: após isso, deverão ser colocados na solução corante de Alcian Blue 1,0 por 30 minutos. Já para o Alcian Blue 2,5, pelo período de 2 horas.
- 5ª Etapa: passar em HCl a 0,1N para Alcian Blue pH 1,0. Enquanto que para o Alcian Blue pH 2,5, lavar em ácido acético 3% durante 3 minutos.

- 6ª Etapa: lavar em água destilada (Alcian Blue pH 1,0) ou em água corrente (Alcian Blue pH 2,5).
- 9ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: nos tecidos em que a coloração de Alcian Blue pH 1,0 é utilizada, os locais ricos em polissacarídeos sulfatados irão ser corados em azul, portanto, não cora ácido hialurônico (não-sulfatado). Os cortes submetidos ao Alcian Blue pH 2,5, coram-se, em azul turquesa, caso apresentem carboidratos complexos ricos em grupos carboxilas, ácido hialurônico, carboidratos fracamente sulfatados ou carboidratos ricos em ácido siálico. Por outro lado, os carboidratos que são fortemente sulfatados coram-se fracamente ou não se coram.

3.3. Coloração de AgNOR

Objetivo da coloração: o objetivo dessa coloração é marcar as regiões organizadoras de nucléolos nas células. É uma técnica bastante utilizada que contribui para ajudar no diagnóstico de algumas patologias.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução A

2g de gelatina

100 ml de água destilada pré-aquecida

1g de ácido fórmico na solução

B) Solução B

Nitrato de prata a 50%

Etapas da coloração do AgNOR

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: misturar a solução de prata 50% com a solução de gelatina 1% na proporção de 2:1. Deixar as lâminas incubadas em câmara úmida nessa solução por 30 minutos na estufa à 45°C.
- 4ª Etapa: Lavar em água destilada.

- 5ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: ao olhar as lâminas no microscópio, os nucléolos corados aparecerão na coloração em negro.

3.4. Coloração de Picrosírius

Objetivo da coloração: demonstrar as fibras colágenas do tecido conjuntivo. Essa técnica permite a análise quantitativa das fibras de colágeno do tipo I e tipo III, que apresentam diferentes tonalidades quando observados sob a luz polarizada.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Picrosírius

0,5 g de Sírius Red

500 ml de solução saturada de ácido pícrico

Dicas: Para se obter a solução saturada de ácido pícrico, deve-se ir adicionando ácido pícrico (em pó) até que apareça um precipitado no fundo do frasco.

- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: corar as lâminas durante 1 hora na solução de picrosírius red 0,1%.
- 4ª Etapa: lavar em água corrente por 5 minutos.
- 5ª Etapa: as lâminas agora devem ser contracoradas com hematoxilina durante 5 minutos.
- 6ª Etapa: lavar por 10 minutos em água corrente.
- 7ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: ao observar as lâminas no microscópio, com o auxílio de uma lente polarizada, as fibras de colágeno tipo I aparecerão com um padrão de birrefringência laranja-avermelhado, e as fibras de colágeno do tipo III, com um padrão de birrefringência verde-amarelado.

3.5. Coloração de Tricômico de Gomori

Objetivo da coloração: utilizada para a visualização de diferentes estruturas do tecido conjuntivo, assim como, para fibras musculares.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução Tricômica

0,6 g de cromotrope 2R

0,3 g de verde luz (SF)

0,8 g ácido fosfotungstico

100 ml água destilada.

B) Solução de água acetificada a 0,5%

0,5 ml de ácido acético glacial

100 ml de água destilada

Etapas da coloração do Tricômico de Gomori

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: deixar na solução tricômica por 15-20 minutos.
- 4ª Etapa: colocar na solução acetificada por 2 minutos.
- 5ª Etapa: lavar em água destilada.
- 6ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: os núcleos são corados em azul a negro; as fibras musculares em vermelho; o colágeno em verde.

3.6. Coloração de Tricômico de Mallory

Objetivo da coloração: também utilizada para a visualização de diferentes estruturas do tecido conjuntivo em diferentes cores.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução A

0,5 g de fucsina ácida diluída em 100 ml de água destilada.

A) Solução B

0,5 g de azul de anilina (solúvel em água)

2 g de orange G

1 g de ácido fosfotúngstico

100 ml água destilada

Etapas da coloração do Tricômico de Mallory

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: Corar na hematoxilina e lavar em água corrente.
- 4ª Etapa: em seguida, corar na solução A por 5 minutos,
- 5ª Etapa: escorrer e passar diretamente para solução B e deixar entre 10-30 minutos.
- 6ª Etapa: Lavar em água destilada.
- 7ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: os núcleos serão corados em roxo; fibras colágenas em azul; citoplasma róseo e hemácias em amarelo.

3.7. Coloração de Tricômico de Masson

Objetivo da coloração: assim como as demais colorações tricrômicas, possibilita a visualização de diferentes estruturas do tecido conjuntivo em cores diferenciadas.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Solução de Bouin

75 ml de solução saturada de ácido pícrico

25 ml formaldeído puro

5 ml ácido acético glacial

B) Hematoxilina férrica de Weigert

Solução A - colocar 1 g de hematoxilina pó em 100 ml de álcool 95%.

Solução B- colocar 4 ml de solução aquosa de cloreto férrico a 29% em 95 ml de água destilada e 1 ml de ácido clorídrico concentrado.

Observação: juntar na hora do uso partes iguais da solução A e B.

C) Solução de Escarlate de Biebrich

90ml de solução aquosa de Escarlate de Biebrich 1%

10ml de solução aquosa de fucsina ácida 1%

1 ml de ácido acético glacial.

D) Solução ácida fosfotúngstica-fosfomolibdica

2,5 g de ácido fosfotúngstico

2,5 g de ácido fosfomolibdico

100 ml de água destilada

E) Solução de azul de anilina

2,5g de azul de anilina

2 ml de ácido acético glacial

100 ml de água destilada

F) Solução de água-ácido

100 ml de água destilada

1 ml de ácido acético glacial

Etapas da coloração do Tricômico de Masson

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas com água destilada por 1 minuto.
- 3ª Etapa: colocar em solução de Boiün por 1 hora na estufa a 60 graus ou preferencialmente deixar por uma noite em temperatura ambiente.
- 4ª Etapa: lavar em água corrente até desaparecer o amarelo deixado pela solução de Bouin e depois em água destilada.
- 5ª Etapa: corar pela solução de Hematoxilina Férrica de Weigert (A e B) por 10 minutos.
- 6ª Etapa: lavar em água corrente por 10 minutos e em água destilada.
- 7ª Etapa: corar pela solução de Escarlate de Biebrich por 5 minutos.
- 8ª Etapa: passar por água destilada.
- 9ª Etapa: diferenciar pela solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico durante 10 a 15 minutos.
- 10ª Etapa: lavar em água destilada.

- 11ª Etapa: corar pela solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos.
- 12ª Etapa: lavar em água destilada.
- 13ª Passar pela solução de Ácido Acético Glacial 1% por 3 a 5 minutos.
- 14ª Etapa: lavar em água destilada.
- 15ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: os núcleos serão corados em preto; o citoplasma, queratina e fibras em vermelho; colágeno e muco em azul.

3.8. Coloração de Verhoeff

Objetivo da coloração: o principal objetivo dessa coloração é demonstrar as fibras elásticas, que normalmente não se coram bem pela coloração de Hematoxilina e Eosina.

Preparo dos corantes e soluções:

A) Hematoxilina alcoólica 10%

10 g de hematoxilina

100 ml de álcool absoluto

B) Cloreto férrico 2% (diferenciador)

10 ml de cloreto de ferro

40 ml de água destilada

C) Cloreto férrico 10%

10 ml de cloreto de ferro

100 ml de água destilada

D) Solução de Iodo de Verhoeff

2 g de iodo

4 g de iodeto de Potássio

100 ml de água destilada

E) Solução corante de fibras elásticas

25 ml de hematoxilina alcoólica 10 %

25 ml de álcool absoluto

25 ml de cloreto férrico 10%

25 ml da solução de iodo de Verhoeff

F) Solução van Gieson

5 ml de fuccina ácida 1%

95 ml de ácido pícrico saturado

Etapas da coloração de Verhoeff

- 1ª Etapa: desparafinar e hidratar.
- 2ª Etapa: lavar as lâminas em água corrente por 1 minuto.
- 3ª Etapa: colocar as lâminas cerca de 15 a 30 minutos na solução para fibras elásticas de Verhoeff.
- 4ª Etapa: em seguida, lavar em água corrente por 20 minutos, posteriormente, lavar em água destilada.
- 5ª Etapa: diferenciar, usando a solução de cloreto férrico 2%. Essa diferenciação deve ser observada sob controle microscópico. Fibras elásticas devem corar-se em negro contra fundo cinza claro.
- 6ª Etapa: passar rapidamente em álcool a 96% durante 2 segundos.
- 7ª Etapa: contrastar com a solução de Van Gieson por 15 segundos. depois dos 15 segundos, retirar as lâminas da coloração, mas não é preciso lavar as lâminas.
- 8ª Etapa: coloque as lâminas em álcool a 96% durante 1 segundo. Em seguida, secar com papel de filtro.
- 9ª Etapa: desidratar e clarificar. Em seguida, realizar a montagem das lâminas.

Resultados: as fibras elásticas e núcleos coram-se em preto, os outros elementos teciduais coram-se em amarelo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULNOUR-NAKHOUL, S.; NAKHOUL, N. L.; WHEELER, S. A.; HAQUE, S.; WANG, P.; BROWN, K.; ORLANDO, G.; ORLANDO, R. C. Characterization of esophageal submucosal glands in pig tissue and cultures. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, n.11, p. 3054 – 3065, 2007.

BANCROFT'S. **Theory and Practitice of Histological Techniques**. 7th edhition, Churchill Livingstone, 2013.

BERKAN, T. K. et al. A protocol for papanicolaou staining of cytologic specimens following flow analysis. **Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 7, n. 1, p. 101-103, 1986.

BIOCLIN. **MAY GRÜNWARD – GIEMSA**. 2020. Disponível em: https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUCOES_MAY_GR%C3%9CNWARD-GIEMSA.pdf. Acesso em 29-07-2020.

CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; MANSO, P. P. A. Técnicas histológicas. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. In: CAPUTO; GITIRANA; MANSO (Org.). **Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2010. p. 89-188.

CARVALHO, I. S.; POLIVANOV, H.; FERNANDES, A. C. S. Utilização do Ácido Periódico de Schiff (P.A.S.) na definição de estruturas sedimentares biogênicas do Terciário Brasileiro. **An. Acad. bras. Ci.** v.60, n.2, 1988.

DAY, C. E. **Histopathology: Methods and Protocols**: Springer New York; 2014.

DE SOUZA NUNES, C.; CINSA, L. A. Princípios do processamento histológico de rotina. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos**, v. 8, n. 1, 2016.

EROSCHENKO, V. P.; DIFIORE, M. S. H. **Difiore's Atlas of Histology with Functional Correlations**. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

GANESH, I. M.; SUBRAMANI, D.; HALAGOWDER, D. Mucin glycoarray in gastric and gallbladder epithelia. **Journal of Carcinogenesis**, v.6, n.10, 2007.

INIGUEZ, C.; GAYOSO, M. J.; CARRERES, J. A versatile and simple method for staining nervous tissue using Giemsa dye. **Journal of neuroscience methods**, v. 13, n. 1, p. 77-86, 1985.

IHCWORLD. **Giemsa's Staining Protocol for Tissue Sections**. 2020. Disponível em: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/giemsa_ellis.htm. Acesso em 29-07-2020.

IHCWORLD. **PAPANICOLAOU STAIN (PAP STAIN) PROTOCOL. IHCWORLD (Life Science Products & Services)**. 2020. Disponível em: https://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/papanicolaou_stain.htm. Acesso em 28-07-2020.

JUNIOR, M. L. C. A. et al. Monitoramento da qualidade da coloração de Papanicolaou no Instituto Nacional de Câncer. **RBAC**, v. 48, n. 1, p. 58-62, 2016.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. Livraria e Editora Santos, São Paulo, 1ª ed. 123 p. 1983.

KIERSZENBAUM A. L.; TRES, L. **Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology**: Elsevier Health Sciences; 2015.

LABORCLIN. **COLORAÇÃO MAY GRUNWALD – GIEMSA**. 2020. Disponível em: https://www.laborclin.com.br/wpcontent/uploads/2019/06/May_GrunWald_Giemsa_620487_621221_620491_621220.pdf. Acesso em 29-07-2020.

LABORCLIN. **COLORAÇÃO PAPANICOLAOU. Conjunto para coloração de Papanicolaou em materiais citológicos ou histológicos. Registro ANVISA: 10097010-**

104. Rev. 09 – 06/2018. 2020. Disponível em: <https://www.laborclin.com.br/wp-content/uploads/2019/06/PAPANICOLAU.pdf>. Acesso em 28-07-2020.

LEV, R.; SPICER, S. S. Specific Staining of Sulfate Groups with Alcian Blue at Low pH. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, n. 12, p. 309, 1964.

LOPES, C.; MALHÃO, F. **Curso de Técnicas Histológicas**. Porto, 2016.

LOPES, V. A. A.; LUZ, M. R. L.; SOUZA, G. N.; FERNANDES JÚNIOR, J. A.; SIMÕES, M. J.; CAMANO, L.; SOUZA, E. Alterações histoquímicas das glicosaminoglicanas na cérvix uterina no final da prenhez da rata albina após ministração local de hialuronidase. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.30, n.7, 2008.

MELLO, R. P.; MELLO, L. P.; PEREZ, A. Identificação de cogumelos patogênicos por meio da coloração Ácido Periódico – Schiff. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 53, p.2, 3 e 4, 1955.

MERCK. **Giemsa Stain for Microscopy**. 2020. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/ivd-oem-materials-and-reagents/learning-center/giemsa-solution/r2ab.qB.aBwAAAFOqm811SAJ,nav#_Panoptic_Methods. Acesso em 29-07-2020.

MERCK. **Shorr staining solution**. 2020. Disponível em: https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/Shorr-staining-solution,MDA_CHEM-109275. Acesso em 29-07-2020.

MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; GITIRANA, L. B.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**, v. 2, cap 3. Rio de Janeiro: EPSJV, 254 p, 2010.

MOWRY, R.W.: The special value of methods that color with both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemistry of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue 8GX and their combinations with the periodic acid—Schiff reaction. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.106, p. 402–423, 1963.

PATRAQUIM, A.; C. **Controlo de qualidade do processamento histológico em histotecnologia: a realidade de 12 hospitais portugueses.** 2015. Tese de Doutoramento. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, 2015.

PIRES, M. A.; TRAVASSOS, F.S.; GÄRTNER, F.; **Atlas de Patologia Veterinária.** Lidel; Porto; pp. 157-171. 2004.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N.; BREWTON, B.R. On the history of basic fuchsin and aldehyde-schiff reactions from 1862 to 1935. **Histochemistry**, v.41, n.3, p.185-94, 1975.

PUCHTLER, H.; MELOAN, S.N. On Schiff's bases and aldehyde-fuchsin: A review from H. Schiff to R.D. Lillie. **Histochemistry**, v.72, n.3, p.321-32, 1981.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology:** Lippincott Williams & Wilki; 2015.

SILVEIRA, S. O. **Orientação para práticas de laboratório.** UFSM; 1960.

SUVARNA, S. K.; LAYTON, C.; BANCROFT, J. D. **Bancroft's theory and practice of histological techniques.** 7. ed. London: Churchill Livingstone Elsevier, p. 637, 2013.

TITFORD, M. A short history of histopathology technique. **The Journal of Histotechnology**, Alabama, v. 29, n. 2, p. 99-110, 2006.

USP (Universidade de São Paulo). **Manual de técnicas em histologia e biologi celular do laboratório de biologia celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo:** consolidação dos procedimentos. São Paulo: Universidade de São Paulo, p. 154, 2002.

ZACHARY, J.F.; MCGAVIN, M.D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease Expert Consult:** Elsevier Health Sciences; 2016.