

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
DIVISÃO NACIONAL DE CÂNCER  
SERVIÇO DE PROGRAMAÇÃO E ORIENTAÇÃO TÉCNICA

III. Ca.  
BIBLIOTECA



# ROTEIRO DO CURSO INTENSIVO DE HISTOTECNOLOGIA

Preparado pelo Setor de Técnica Histológica  
do Centro de Investigação e Treinamento  
em Patologia Pediátrica.

F  
616.9940182  
B823r  
Ex. 1

MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E TREINAMENTO EM PATOLOGIA



## ÍNDICE

### Noções Básicas de Física, Química, Matemática e Biologia

Pág.

Regra de Três . . . . .	3
Porcentagem . . . . .	4
Soluções e misturas . . . . .	4
Unidades Básicas de Medida . . . . .	5
Estados Físicos da Matéria . . . . .	6
Preparo de Soluções Aproximadamente Normais . . . . .	6
Células Livres . . . . .	8
Células Federadas . . . . .	9
Células Anastomosadas . . . . .	9
Células Não Individualizadas . . . . .	9
Tecidos, Órgãos, Aparelhos, Sistemas . . . . .	10
Obtenção de material para exame: Biópsia — Peça Cirúrgica (PC) — Necrópsia	
Fixação . . . . .	11
Descalcificação . . . . .	12
Corantes Naturais . . . . .	15
Corantes Artificiais . . . . .	15
Corantes Básicos . . . . .	15
Corantes Ácidos . . . . .	15
<b>Fixadores mais comuns</b>	
Solução de formalina comum . . . . .	16
Solução de formalina neutra . . . . .	16
Solução de formalina — acetato de sódio . . . . .	16
Fixador de Zenker (sol. estoque) . . . . .	17
Fixador de Bouin (variante para biópsias renais e hepáticas) . . . . .	17
Método para remoção de pigmento de formol ou malárico . . . . .	17
Descalcificador . . . . .	18
<b>Métodos de coloração:</b>	
Hematoxilina de Harris . . . . .	18
Hematoxilina de Mayer . . . . .	19
Coloração de contraste . . . . .	20
Hematoxilina Fosfotúngstica . . . . .	20
PAS . . . . .	21
Preparo de soluções aproximadamente normais . . . . .	22
Alcian-Blue . . . . .	23
PAS Alcian-Blue . . . . .	23
Retículo . . . . .	23
Azocarmin . . . . .	24
Tricrômico de Gomori . . . . .	25
Fucsina Resorcina de Weighert . . . . .	26
PERL'S . . . . .	27
KOSSA . . . . .	27
WADE . . . . .	28
FITE . . . . .	29
GROCOTT . . . . .	29
<b>Highman (modificação do método do Vermelho-Congo):</b>	
Gram . . . . .	31
Sudan III . . . . .	32
Papanicolau . . . . .	33
Solução sulfocrômica (para limpeza) . . . . .	34
Warthin — Starry Modificado . . . . .	34
Referências Bibliográficas . . . . .	37

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
DIVISÃO NACIONAL DE CÂNCER  
SERVIÇO DE PROGRAMAÇÃO E ORIENTAÇÃO TÉCNICA

**ROTEIRO DO CURSO INTENSIVO  
DE HISTOTECNOLOGIA**

Preparado pelo Setor de Técnica Histológica  
do Centro de Investigação e Treinamento  
em Patologia Pediátrica.

SECRETARIA DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO  
HOSPITAL JESUS  
CENTRO DE INVESTIGAÇÃO E TREINAMENTO EM PATOLOGIA  
PEDIÁTRICA

F  
616.9940182  
B823 n  
ex. 1

PB

FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION  
U. S. DEPARTMENT OF JUSTICE  
WASHINGTON, D. C. 20535

OFFICE OF THE DIRECTOR  
FEDERAL BUREAU OF INVESTIGATION

445

BIBLIOTECA DO	
I. N. C.	
N.	Data
229/83	22-9-83

445



## NOÇÕES BÁSICAS DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA

### 1 – REGRA DE TRÊS:

Operação matemática que envolve pares de quantidades, isto é, sempre será preciso ter conhecimento de pelo menos duas substâncias.

Ex: 50 ml de uma solução foram diluídos em 500 ml de água.  
Quantos ml da solução precisamos para 750 ml de água?

#### Resolução:

- 1 – Temos como uma substância os ml da solução.
- 2 – A outra substância, são os ml de água.

Colocando-se 1 e 2, formaremos uma proporção com os dados na mesma disposição em que se encontram:

50 ml da solução -----500 ml de água  
X ml da solução -----750 ml de água

$$\frac{50}{X} \times \frac{500}{750} = \frac{750 \times 50}{500} = \frac{37.500}{500} = 75$$

RESPOSTA: 75 ml da solução.

Dissolveu-se 0,5 g de um corante em 200 ml de água. Querendo-se o volume de 2.300 ml, quanto teremos que aumentar no corante, para que a proporção fique a mesma?

- a) 57,5 g.
- b) 5,75 g.
- c) 0,575 g.

## 2 – PORCENTAGEM:

É a proporção de um dado valor, que se determina sabendo-se o quanto corresponde a cada 100.

Ex: Quando dizemos 15% de um certo valor, queremos dizer que em cada 100 partes desse valor, tomamos 15 partes.

Um laboratorista misturou 35 ml de formol em 65 ml de água. A quantos por cento ficou esse formol? .....

Querendo-se fazer um álcool a 70%, como você mediria as duas substâncias?

- a) 70 ml de álcool a 30 ml de água.
- b) 30 ml de álcool e 70 ml de água.
- c) 70 ml de álcool.

Toda vez que você utilizar porcentagem em que todas as substâncias sejam líquidas, deverá ser mantido sempre como limite o 100.

Ex: álcool clorídrico (álcool a 70% com 1% de ácido clorídrico).

Primeira medida a ser tomada é medir a porcentagem maior: 70 ml de álcool e 30 ml de água. Perfazendo um total de 100 ml.

Como o ácido clorídrico é diluído a 1%, teremos: 99 ml de álcool a 70% e 1 ml de ácido clorídrico. Perfazendo um total de 100.

Unindo-se regra de três e porcentagem, pode-se calcular:

Preparar dois litros e meio de álcool clorídrico.

## 3 – SOLUÇÕES E MISTURAS.

**MISTURAS HOMOGÊNEAS** – misturam-se

EX: ÁLCOOL + ÁGUA

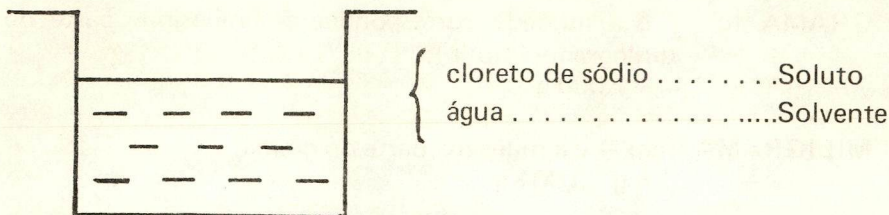
**MISTURAS NÃO HOMOGÊNEAS** – não se misturam

EX: XILOL + ÁGUA

**SOLUÇÕES** – são misturadas homogêneas de duas ou mais substâncias

EX: O sal de cozinha (cloreto de sódio) se dissolve em água, formando uma solução aquosa de cloreto de sódio.





**SOLUTO** -- substância que se dissolve.

**SOLVENTE** -- substância capaz de dissolver outra.

Nem sempre é fácil distinguir o soluto do solvente. Nesses casos considera-se como solvente a substância que está em maior quantidade.

O solvente mais importante é a água.

Ex:

SOLUÇÕES	SOLVENTE	SOLUTO	EXEMPLOS
SÓLIDAS	SÓLIDO	SÓLIDO	COBRE EM PRATA COBRE EM NÍQUEL
LÍQUIDAS	LÍQUIDO	SÓLIDO LÍQUIDO GASOSO	CLORETO DE SÓDIO EM ÁGUA ÁLCOOL EM ÁGUA GÁS CARBÔNICO EM BEBIDAS E REFRIGERANTES
GASOSAS	GASOSO	GASOSO	AR ATMOSFÉRICO

#### 4 -- UNIDADES BÁSICAS DE MEDIDAS.

Cada unidade é 10 vezes maior que a unidade imediatamente inferior. A mudança da vírgula para a direita ou para esquerda, significa que estamos passando para unidades imediatamente inferiores ou superiores.

**GRAMA (g)** — é a unidade correspondente à milésima parte do quilograma (quilo).  
1 kg = 1.000 g

**MILIGRAMA (mg)** — é a milésima parte do grama:  
1 mg = 0,001 g

**LITRO — (L)** — é a medida fundamental na medida de capacidade

**MILILITRO (ml)** — é a milésima parte do litro.  
1 ml = 0,001 L

Tem-se 2,5 g de um sal, quanto corresponde em miligrama? .....  
De 2 litros, retiram-se 7 ml, quantos mililitros restam? .....

Converta:

5 kg = ..... mg  
0,009 g = ..... mg  
7 L = ..... ml

## 5 — ESTADOS FÍSICOS DA MATÉRIA.

Uma substância pode apresentar-se em 4 estados físicos diferentes.

- 1 — **ESTADO SÓLIDO** — substância que possui forma e volume próprios. EX: GELO.
- 2 — **ESTADO LÍQUIDO** — a substância possui somente volume próprio. EX: ÁGUA.
- 3 — **ESTADO PASTOSO** — substância entre o estado sólido e o líquido EX: MANTEIGA.
- 4 — **ESTADO GASOSO** — a substância não possui forma nem volume próprio. EX: AR ATMOSFÉRICO.

## PREPARAÇÕES DE SOLUÇÕES APROXIMADAMENTE 1 NORMAL

Para fins histológicos e químicos, quando uma exatidão volumétrica não é exigida, soluções aproximadamente normais de ácidos e bases



podem ser feitas dissolvendo ou diluindo em um (1) litro de água as seguintes quantidades das substâncias relacionadas abaixo:

Ácido acético glacial . . . . .	.58,0 ml
Hidróxido de amônio, ap. gr. 0.89—0.90 . . . . .	.68,0 ml
Ácido bórico . . . . .	.20.7 ml
Ácido cítrico . . . . .	.70.0 ml
Ácido fórmico, 90% . . . . .	.43.0 ml
Ácido clorídrico, concentrado . . . . .	.83,0 ml
Ácido láctico, 88% . . . . .	.85.0 ml
Ácido nítrico concentrado . . . . .	.65.0 ml
Ácido nítrico concentrado . . . . .	.65.0 ml
Ácido perclórico, 70—72% . . . . .	.86.0 ml
Ácido fosfórico, (orto) . . . . .	.23.0 ml
Hidróxido de potássio . . . . .	56.0 gr
Carbonato de sódio (anidro) . . . . .	53.0 gr
Hidróxido de sódio . . . . .	40.0 gr
Ácido sulfúrico, concentrado . . . . .	.28.0 ml

#### OBSERVAÇÃO:

É importante observar, no preparo de qualquer solução, a fórmula de cada droga a ser usada. Citemos, como exemplo, o caso do preparo do formol neutro. Sua técnica indica o uso de 6,5 g de fosfato de sódio dibásico (anidro), isto é,  $\text{Na}_2 \text{HPO}_4$  sem água. Encontramos com maior facilidade e fosfato de sódio dibásico hepta-hidratado ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) e o dodeca-hidratado ( $\text{Na}_2 \text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ), nesses casos devemos fazer a correção de pesagem, ou seja, achar o peso em gramas do hidratado que seja proporcional ao do anidro, em seu nº de moléculas.

A solubilidade de uma droga ou corante também é importante, porque pode ser solúvel em água, ou em álcool, ou ainda se dissolver na mistura dos dois. Se em determinada técnica usamos o corante X em álcool a 70%, pode ser que o corante seja solúvel somente em água, e dessa forma devemos dissolvê-lo em 30 ml de água e completar os 100 ml com álcool.

Deve-se pois observar sempre qual o solvente e que proporção é a adequada, antes de iniciar o preparo de uma solução.

Qualquer um pode sentir que a natureza no seu poder de criação inter-relacionou as coisas com os seres. Face a tais considerações definimos a Biologia como o ramo das Ciências Naturais que tem por princípio o estudo não somente dos seres vivos, mas também de todos os fenômenos com eles observados, ainda que pertençam intimamente a outras categorias de ciências. Por isso não podemos desmembrar a Química da Biologia. Hoje o que estudamos em verdade é a Biologia Molecular, onde cada fenômeno tem sua explicação na estrutura de uma molécula ou no profundo conhecimento das reações enzimáticas envolvidas. O mesmo se pode dizer com relação à Física, quando se tem por estudo os colóides, quando se focalizam as relações físicas entre os átomos, no transporte de elétrons para poder haver respiração da célula.

O termo Biologia etimologicamente provém de: BIOS = VIDA e LOGUS=ESTUDO ou TRATADO.

Sendo a Biologia a ciência da vida e dos seres vivos, ela naturalmente se divide em Biologia Geral e Biologia Especial.

A Biologia Especial se subdivide em Zoologia e Botânica, mas nós só trataremos da Biologia Geral, pois esta procura estudar e explicar de maneira comum a todos os organismos vivos, quer sejam animais ou vegetais.

A Citologia, por exemplo, é um ramo de Biologia Geral, pois no seu conteúdo, não fazemos distinção da natureza animal ou vegetal da célula. É claro e compreensível que se deva dar o destaque devido aos elementos celulares exclusivos deste ou daquele reino, mas de um modo geral, procedemos como se tivéssemos diante de nós uma célula padrão, com todas as características de célula animal e célula vegetal, simultaneamente.

A célula é uma massa de substância viva caracterizada pelo seu perfeito equilíbrio físico-químico, delimitada por uma membrana e formada de citoplasma e núcleo, dotada de autonomia vital e capaz de realizar todas as funções biológicas a ela essenciais, representando por isso a unidade anatômica e fisiológica de todos os seres vivos.

As células podem ser classificadas em quatro grupos:

a) **CÉLULAS LIVRES** – mostram-se completamente separadas e



independentes entre si, ficando geralmente mergulhadas na substância fundamental. Têm o mais alto grau de individualidade.

EX: Esfregaço sangüíneo

b) **CÉLULAS FEDERADAS** — reúnem-se para formar camadas compactas.

Ex: Epitélios.

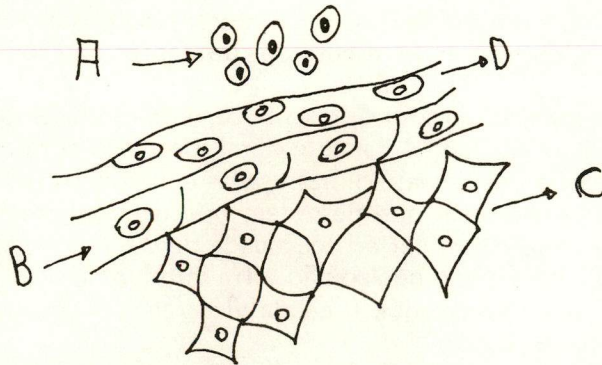
c) **CÉLULAS ANASTOMOSADAS** — encontram-se unidas por prolongamentos citoplasmáticos.

EX: Tecido conjuntivo.

d) **CÉLULAS NÃO INDIVIDUALIZADAS** — massa de protoplasma portadora de vários núcleos.

EX: Células Placentárias.

Em laboratório de Histopatologia é comum encontrarmos exames citológicos. Esses exames são feitos através da obtenção de um conjunto de células retiradas de um epitélio em descamação. A esse conjunto de células chamaremos de conglomerado que vem interligado por material viscoso, o qual deverá ser distendido em lâmina, em um só sentido e com a menor espessura possível.



Células: A — Livres; B — Federadas

C — Anastomosadas; D — Não individualizadas

A célula, considerada no espaço, é um corpo e, como tal, abrange um continente e um conteúdo.

O continente ou espaço celular é delimitado por uma membrana envoltora.

O conteúdo é formado pelo conjunto de substâncias e elementos figurados que dão forma e estrutura à célula. Nele vemos elementos que participam ativamente nos fenômenos biológicos das células.

A célula possui tanto no seu interior, quanto em seus espaços extracelulares, o componente fundamental que é a água, sendo este componente responsável pelos 85% de substâncias líquidas no nosso organismo.

A célula pode ser observada ainda em vida ou já morta e fixada por meios físicos ou químicos. A sua visualização ao microscópio se faz por transparência, por isso a grande necessidade de obedecer a micragem ao cortar-se um material, que é para que ele fique fino e dê boa transparência ao microscópio.

A espessura ideal para se visualizar uma célula perfeita é de 5 a 6 micra para a maioria das células, exceto para as células do Sistema Nervoso que varia de 6 a 30 micra.

O uso de corantes serve para mostrar mais nítidos os detalhes, ficando a célula colorida ou, pelo menos, alguns de seus elementos constituintes. Dizemos que a coloração é ortocromática quando a célula se tingem da mesma tonalidade do corante usado.

A eosina é um corante ácido ortocromático, pois sendo avermelhada, confere um tom róseo escuro ao citoplasma; não cora o núcleo.

A hematoxilina, ao contrário, é básica, de cor roxa, emprestando um tom violáceo ao núcleo. A hematoxilina ideal não cora o citoplasma, porém a maioria das hematoxilinas usadas em laboratório recebem em seu preparo substâncias que permitem que o citoplasma absorva um pouco a sua tonalidade, daí a necessidade de diferenciação que deverá ser observada, para que o núcleo não sofra interferência.

Sucedem, entretanto, que a célula viva reage à penetração em sua estrutura após sua morte.

Aos agrupamentos de células igualmente diferenciadas, da mesma natureza e da mesma estrutura, para o exercício de uma determinada função, damos o nome de **TECIDO** (ex: tecido conjuntivo). A associação de tecidos, formando um todo limitado, com atividade biológica particular, recebe o nome de **ÓRGÃO** (ex: fígado, baço). Quando os órgãos são da mesma natureza e, portanto, com a mesma função, denominamos **APARELHOS** (ex: Aparelho digestivo). **SISTEMAS** são formados de tecidos da mesma natureza, têm a mesma estrutura, e



se distribuem harmônica e uniformemente por todas as partes do organismo (ex: sistema nervoso).

Na maioria, as células que compõem um tecido não podem ser observadas tais quais aparecem no organismo, por isso têm que sofrer metodologia específica para poderem ser estudadas ao microscópio. Esta metodologia envolve desde a obtenção do material até às colorações.

Existem três fontes diferentes de obtenção de material:

a) **BIÓPSIA** — é um fragmento pequeno de tecido obtido de um paciente vivo, podendo esta biópsia ser feita em órgãos internos.

b) **PC** — são peças maiores ou órgãos internos obtidos através de uma grande cirurgia.

c) **NECRÓPSIA** — é o estudo anatômico e microscópico de todos os órgãos ou da maioria dos órgãos de um cadáver.

Através da necrópsia pode-se obter, também, material de histologia normal, quando se tratar de um cadáver com morte acidental.

Na obtenção de um preparado adequado para o exame histológico, observa-se a existência de duas etapas bem distintas que devem ser consideradas.

A primeira etapa, principal ou fundamental, da qual depende todo o resto do procedimento (fixação) e a 2ª, etapa secundária, a metodologia das técnicas ou métodos de coloração.

**ETAPA PRINCIPAL OU FUNDAMENTAL** — Está representada pelos métodos usados para fixação de um material. A escolha dos fixadores e a espessura do fragmento são os responsáveis pelo sucesso de um corte, de uma coloração e sobretudo de um possível diagnóstico, por parte do patologista.

A fixação serve para prevenir, ou melhor, preservar as estruturas a serem estudadas sem alterá-las, serve para evitar a autólise, etc.

Para obter-se um bom preparado histológico, deve-se selecionar criteriosamente o tipo de fixador a ser usado, pois cada método de coloração exige um determinado fixador. Todavia, deve-se esclarecer que

com finalidades práticas, e de um modo geral, o **formol a 10%** é o mais usado.

Oferece condições de fixação, ainda que grosseiras, porém satisfatórias e, a menos que se trate de um caso de importância particular, quando devemos lançar mão de um fixador determinado, o formol pode ser usado rotineiramente.

Quanto ao chamado "fixador ideal", pode-se dizer que ele não existe, e seria definido como aquele que conseguisse fixar tão bem a superfície externa quanto a mais interna do fragmento. Na seleção de um fixador deve-se optar por um que não seja capaz de provocar alterações celulares, e deverá ter uma ação rápida, porém pouco agressiva. Um fixador violento provoca o enrijecimento demasiado do tecido, o que nada mais é do que uma combinação exagerada do fixador com as proteínas celulares.

O fixador deverá agir de modo que o tecido ao ser colocado em contato com o corante ofereça condições de absorvê-lo, tornando evidentes as estruturas a serem estudadas.

É sabido que o fixador (ou qualquer outro líquido) penetra na célula por difusão, isto é, da superfície para o centro, dessa maneira, as células que estão em contato direto com o fixador ficarão mais fixadas. Por isso deve-se observar rigorosamente: o tempo exigido para cada fixador atuar, e a espessura do fragmento a ser fixado.

Esta última não deve ultrapassar de 5 mm, e, uma vez que a velocidade de penetração do fixador pelas superfícies é de 1 mm a cada 24 hs., a frio; e de 1 mm a cada 6 hs. a 37/40°C, a proporção material/fixador deve ser no mínimo de 1:10, isto é, 10 vezes o volume do fragmento.

A descalcificação, como o próprio nome indica, refere-se à remoção de sais de cálcio do material; ela pode ser física ou química. Existem alguns comportamentos a serem obedecidos para obter uma boa descalcificação, um deles é no que diz respeito à imersão do material no líquido descalcificador, este deverá obedecer à proporção líquido/material, e aquele ficará suspenso na solução, isto proporcionará uma descalcificação homogênea, porém, o ideal seria agitarmos periodicamente o material, porque tanto favorece a penetração do líquido quanto facilita a saída do produto da descalcificação. Todo material a descalcificar deverá ser previamente fixado. Após a descalcificação o material será lavado, sofrendo o processo normal de impregnação. A impregnação



e a inclusão têm como objetivo colocar o tecido em condições de suportar um corte fino sem alterar suas estruturas; para tal, estudiosos observaram: tempo, espessura e temperatura. O tempo não ultrapassando de uma hora à frio e 30 minutos a quente; a espessura em torno de 5 milímetros e a temperatura não mais de 70°C. Tanto a impregnação quanto a inclusão podem ser feitas por vários métodos, entre eles o de parafina, de celoidina e de gelatina, porém, para as técnicas habituais é suficiente o método de parafina. A celoidina é indicada para os tecidos com grandes cavidades, muito delicados e friáveis.

O fragmento sofre um processo de desidratação gradativa, geralmente o agente é o álcool, um processo de clarificação que é o intermediário entre o álcool e a parafina, e finalmente a parafina que deverá estar fundida a uma temperatura que varia de 15°C a 20°C acima de seu ponto de fusão. Ao término desse processo o material deverá ser imediatamente emblocado, êle será colocado em fôrma de papel ou bandeja de metal apropriada. A parafina deverá estar previamente aquecida na temperatura indicada acrescida de 1% de cera de abelha (isso dará maior elasticidade à parafina; no caso de parafina sintética a cera será dispensada). Esta mistura será colocada nas fôrmas e então nessa passagem observa-se a orientação do material para o corte, a face lesada ou superfície mais homogênea deverá ser colocada em contato com o fundo do recipiente na posição central e paralela ao bordo do mesmo, com uma pinça ligeiramente aquecida, será feita uma pequena pressão sobre o fundo. Se for caixa levá-la para uma superfície fria, se for bandeja colocar o gelo no sentido contrário, ou melhor, com pressão inversa à exercida pela pinça.

Quando se tratar de inclusão de intestino ou de outro órgão ôco, devemos procurar colocá-lo o mais distendido possível, e paralelo.

Quando a parafina obtiver uma consistência bem sólida, porém não totalmente fria, será retirada das fôrmas e cada material estará envolvido por ela. Eles serão aparados de modo que mantenham uma certa quantidade de parafina no seu redor.

**OBS.** Todo bloco deverá ser identificado imediatamente.

Como foi descrito, a finalidade da inclusão é permitir a execução de cortes delgados e perfeitos, se bem que os mesmos podem ser obtidos por outros meios, como por exemplo, por deslizamento (celoidina); ou por congelação, que nada mais é que a obtenção dos mesmos por



temperatura baixa, sendo esta a responsável pela rigidez necessária ao corte; em rotina o método de congelamento não é empregado, sendo somente usado para diagnóstico imediato. O mais comum é o corte com impregnação de parafina em micrótomo rotatório (micro-pequeno, tomo-pedaços). Os blocos depois de aparados e identificados serão presos a um suporte, quando for necessário. Coloca-se ao micrótomo orientando de tal modo que o bordo do bloco esteja paralelo ao fim da navalha, esta orientação se faz por meio de parafusos localizados na parte do micrótomo onde será introduzido o suporte ou o bloco. A posição do bloco ao ser colocado no micrótomo deverá ser observada a fim de evitar a separação de membranas, o deslocamento de vasos e sobretudo a trepidação que a má orientação provoca.

O ângulo de corte bloco/navalha (esta deverá ser assentada sempre em forma de 8 com dorso e cabo adequados), deverá ser orientado ao início de cada corte, uma vez que ele é sustentado por uma parte móvel que além da inclinação da navalha permite que ela se desloque para os lados, para frente e para traz. Esta parte móvel contém duas peças ajustáveis que facilitam o levantamento ou abaixamento da navalha.

Antes de girar a manivela para se efetuar os cortes, usa-se colocar uma pedra de gelo sobre o bloco a fim de que a temperatura baixa dê mais consistência ao bloco; o movimento rotatório deverá ser homogêneo e constante, nem rápido nem lento, o primeiro provoca aumento de espessura e o segundo a diminuição da mesma.

A uma seqüência de corte chamamos "fita" e esta deverá ser levada para um recipiente contendo água aquecida ( $15^{\circ}\text{C}$ — $20^{\circ}\text{C}$  abaixo do ponto de fusão da parafina) sendo distendida lentamente; o primeiro corte ao entrar em contato com a água será firmado com o indicador ao mesmo tempo em que o resto da fita vai sendo colocado na água. Nesse momento será feita a observação de pregas, dobras e riscos. Com habilidade tentaremos separar nas junções, um corte do outro. O transporte desse corte para lâmina consiste em mergulhar esta na água e com a pinça trazer o corte até ela. Quando estiver na porção mediana retirar e escorrer. Usa-se, porém, não é indispensável, a albumina de Mayer sobre a lâmina antes de proceder a pescagem.

Deixa-se a lâmina em estufa na temperatura indicada, (porque se muito elevada o material sofre desnaturação, ou melhor, altera toda a estrutura celular), até que a parafina derreta permitindo assim que o corte adira à lâmina. Após esta passagem a lâmina será desparafinada e sofrerá a ação de um corante, tendo este como definição: "é todo corpo



colorido capaz de passar sua coloração a outro corpo". Na maior parte os corantes são artificiais e alguns naturais que derivam de corpos incolores. Do ponto de vista histológico os corantes podem ser:

**CORANTES NATURAIS:** são corantes extraídos de produtos animais e vegetais.

EX: carmin, hematoxilina, etc...

**CORANTES ARTIFICIAIS:** são todos de natureza sintética

Para haver coloração é necessário que o material corante se fixe sobre o tecido, para isso devemos ter por um lado um material bem processado e na espessura ideal, e por outro o corante deverá estar dissolvido nas proporções indicadas e no solvente ideal. Os corantes se classificam também em básicos e ácidos. Os corantes básicos (com elemento ativo básico) coram os elementos ácidos do tecido, como o núcleo, que denominamos elementos basófilos.

Os corantes ácidos atuam de maneira inversa, coram os elementos básicos por meio de seu ácido, e esses elementos são denominados acidófilos.

**EX: DE CORANTES BÁSICOS:** Verde de metila, violeta de cresil, tionina, azul de toluidina, safranina, violeta genciana, fucsina básica, hematoxilina, . . . . .

**EX. DE CORANTES ÁCIDOS:** ácido pícrico, orange G, fucsina ácida, verde claro amarelado, carmin, eosina, . . . . .

A coloração pode ser progressiva e regressiva, a primeira não necessita diferenciação e a segunda necessita.

Em rotina o método utilizado é do H.E. (hematoxilina e eosina). Ele é composto da retirada de parafina da lâmina, ou melhor, desparafinização com posterior hidratação. Para isso deverá passar por uma bateria de xilóis, álcoois e água (bateria mais usada), dando-se a seguir o corante nuclear; êste deverá ser escolhido de acordo com as necessidades; se progressivo basta lavar bem em água, se regressivo diferencia-se e lava-se bem, esta lavagem ou viragem consiste em oxidar o corante na cor desejada. O corante de contraste deverá obedecer a seu preparo. Por exemplo, se for alcoólico, passar em álcool antes de entrar no corante, se aquoso, poderá entrar direto no corante, após este estágio os cortes sofrerão um processo de desidratação que é inverso da desparafinização,

sendo que ao chegar no xilol sofrerá o processo de montagem. Esta será feita pela adição de uma lamínula sobre o corte, tendo como intermediário (lâmina/lamínula) uma substância não muito viscosa, portanto, fluida, que permitirá ao corte, ser examinado com uma transparência total, sem desvio dos raios luminosos. Habitualmente usa-se como intermediário o bálsamo do Canadá, o Permout, o Entelan, as resinas sintéticas, etc....

### FIXADORES MAIS COMUNS

**FORMALDEIDO** — O formol que usamos e chamamos de puro, nada mais é que uma solução aquosa contendo 37% de formaldeido (gás). Com essa solução de formaldeido a 37%, é que preparamos o formol a 10%, ou melhor 10 ml de formaldeido a 37% e 90 ml de água.

Obs. — Quando o formol forma em seu frasco de origem um precipitado no fundo (polímeros) é porque o metanol que ele contém evaporou-se (este metanol é adicionado para manter a solução estável).

### SOLUÇÃO DE FORMALINA

Solução de formol a 37% . . . . .	10ml
Água . . . . .	90ml

Por este formol não ser tamponado poderá se transformar em ácido fórmico, e o tecido permanecendo muito tempo nele, depois de processado e corado, apresentará artefatos como por exemplo o que chamamos de pigmento de formol.

### SOLUÇÃO DE FORMALINA NEUTRA

Solução de formol a 37% . . . . .	100ml
Água destilada . . . . .	900ml
Fosfato de sódio monobásico . . . . .	4gr
Fosfato de sódio dibásico (anidro) . . . . .	6,5 gr

É o fixador indicado para uso em rotina.

### SOLUÇÃO DE FORMALINA — ACETATO DE SÓDIO

Solução de formalina a 37% . . . . .	100ml
Acetato de sódio . . . . .	20gr
Água . . . . .	900ml



## FIXADOR DE ZENKER

(scl. estoque)

Água destilada.....	1.000ml
Bicloreto de mercúrio .....	50gr
Bicromato de potássio.....	25gr
Sulfato de sódio .....	10gr

Adicionar 5 ml de ácido acético glacial a cada 95ml da solução de Zenker, no momento de usar. Após a fixação aconselha-se lavar os tecidos por 2 horas em solução aquosa de bicarbonato de potássio a 2,5%.

## FIXADOR DE BOUIN

(variante para biópsias renais,  
e hepáticas)

Álcool a 80%.....	150ml
Solução de formalina.....	.60ml
Ácido pícrico .....	1gr

Dissolver o ácido pícrico em álcool e depois juntar a formalina. Antes de usar adicionar 2 ml de ácido acético glacial para cada 28 ml da solução. O glicogênio do tecido hepático é melhor conservado se a fixação for feita à temperatura de 0 a  $-4^{\circ}\text{C}$ , em geladeira comum. Fragmentos de rim e fígado, obtidos por biópsia com agulha, fixam em 2-3 horas. Tempo mais longo torna as peças duras, os cortes fragmentados e os elementos histológicos distorcidos e com pouca afinidade pelos corantes.

OBS. Após a fixação as peças são passadas em várias mudanças de álcool a 50% para eliminar o ácido pícrico e, em seguida, desidratadas e clarificadas como usualmente se faz.

## PIGMENTOS DE FORMALINA E DE MALÁRIA

Os tempos registrados nos métodos que se descrevem a seguir são apenas indicativos, pois dependem do tempo de estocagem do material em formol. A lavagem das lâminas após a despigmentação deve durar 15 horas. Os pigmentos de formol se removem mais facilmente que o pigmento malárico.

## MÉTODO PARA REMOÇÃO DE PIGMENTO DE FORMOL OU MALÁRIO

- 1 – Desparafinar e hidratar as lâminas em água.
- 2 – Mergulhar várias vezes em água destilada
- 3 – Colocar por uma hora na seguinte solução:

Álcool a 95% . . . . .	50ml
Hidróxido de amônio (sol. aquosa) a 28% . . . . .	15ml

- 4 – Lavar bem em água corrente e corar pelo método escolhido.

### DESCALCIFICADOR (mais usado)

Colocar as peças já fixadas na seguinte solução:

Ácido nítrico . . . . .	7,5ml
Água destilada . . . . .	92,5ml

Controlar a descalcificação e mudar a solução diariamente.  
Lavar bem o material após a descalcificação.

### HEMATOXILINA DE HARRIS

Hematoxilina (cristais) . . . . .	7gr
Álcool absoluto . . . . .	50ml
Alúmen de potássio ou amônio . . . . .	100gr
Água destilada . . . . .	1.000ml
Óxido amarelo de mercúrio . . . . .	2,5gr

### MÉTODO DE PREPARAÇÃO

Dissolver a hematoxilina no álcool. Dissolver o alúmen na água, aquecendo (sem ferver). Retirar do fogo e misturar as duas soluções. Levar ao fogo até a ebulição. O tempo de ebulição não deve ultrapassar a 1 minuto. Colocar o óxido lentamente (com a solução fora do fogo). Agitar bem e retornar ao fogo até a solução adquirir cor púrpura. Levar o recipiente imediatamente à água fria. Na hora de usar adicionar 5 ml de ácido acético glacial para cada 200 ml de solução.



## TÉCNICA DE COLORAÇÃO

- 1 – Desparafinar e hidratar
- 2 – Corar na solução de hematoxilina . . . . . 5 min
- 3 – Lavar em água corrente para retirar o excesso do corante.
- 4 – Diferenciar em ácido clorídrico (álcool)

Álcool . . . . .	.70ml
Água . . . . .	.30ml

Em 99 ml dessa solução adicionar 1 ml de ácido clorídrico concentrado.

- 5 – Lavar bem em água corrente
- 6 – Dar a coloração de contraste
- 7 – Desidratar, clarear e montar.

## HEMATOXILINA DE MAYER

Hematoxilina (cristais) . . . . .	1,0gm
Água destilada . . . . .	1.000,0 ml
Iodato de sódio . . . . .	0,2 gm
Alúmen de amônio ou potássio . . . . .	50,0 gm
Ácido cítrico . . . . .	1,0 gm
Hidrato de cloral . . . . .	50,0 gm

Há dois métodos para preparar a hematoxilina:

**1º método:** dissolver o alúmen em água, a frio, juntar hematoxilina, adicionar o iodato de sódio, ácido cítrico e o cloral, agitando-os continuamente até solução completa. A cor final deve ser vermelho-violeta. A solução se mantém por meses. Identificar o vidro, incluindo a data.

**2º método:** dissolver o alúmen em 500 ml de água, a quente (não ferver). Dissolver o cloral, ácido e o iodato de sódio nos outros 500 ml de água. Dissolver a hematoxilina em 10 ml de álcool absoluto. Misturar 3 soluções. Guardar em vidro apropriado identificando a solução, inclusive a data de fabricação da hematoxilina.

Técnica de coloração

- 1 – Desparafinar e hidratar.
- 2 – Hematoxilina . . . 15 min.

- 3 – Lavar bem em água corrente.
- 4 – Coloração de contraste.
- 5 – Desidratar, clarear e montar.

## COLORAÇÃO DE CONTRASTE

### SOLUÇÃO DE VAN-GIESON

Fucsina ácida. . . . . (sol. aquosa 1%) . . . . .	2,5 ml.
Ácido pícrico . . . . . (sol. aquosa saturada) . . . . .	97,5 ml.

### EOSINA

Eosina . . . . .	0,5 g.
Água . . . . .	20 ml.
Álcool absoluto . . . . .	80 ml.

Dissolver a eosina na água e adicionar o álcool.

OBS.: No momento de usar, adicionar 0,5 ml de ácido acético glacial para cada 100 ml de solução de eosina.

### HEMATOXILINA FOSFOTÚNGSTICA

FIXADOR — Formol a 10%, formol neutro

TECNICA — cortes em parafina 6 micra

#### Solução de Hematoxilina

Hematoxilina. . . . .	0,1gr
Ácido fosfotúngstico. . . . .	2gr
Água destilada. . . . .	100ml

Dissolver a hematoxilina na água aquecida, quando fria juntar o ácido fosfotúngstico. Amadurecer adicionando 0,02 gr de permanganato de potássio (para ser usada imediatamente). Se não tiver pressa deixar de 2 a 3 semanas envelhecendo e, nesse caso dispensa-se o permanganato.

### IODINE DE GRAM

Iodine . . . . .	1gr
------------------	-----



Iodeto de potássio . . . . .	2gr
Água destilada . . . . .	300ml

### SOLUÇÃO DE ZENKER

Bicloreto de mercúrio . . . . .	5gr
Dicromato de potássio . . . . .	2,5gr
Sulfato de sódio . . . . .	1gr
Água destilada . . . . .	100ml

### TÉCNICA DE COLORAÇÃO

- 1 – Desparafinar, hidratar até a água destilada
- 2 – Solução de Zenker com 5% de ácido acético... de 90min a 210min na estufa a 56º
- 3 – Temperatura ambiente . . . . . de 15 a 30 min
- 4 – Iodine de Gram . . . . . 15 min
- 5 – Hiposulfito de sódio a 5% . . . . . 3 min
- 6 – Lavar em água corrente . . . . . 10 min
- 7 – Hematoxilina fosfotúngstica . . . . . 90min a 56º
- 8 – Temperatura ambiente . . . . . 15 min
- 9 – Desidratar rapidamente em alcoois
- 10 – Xilóis e montar.

### P. A. S

FIXADOR – Formol 10%, formol neutro.

TÉCNICA – Cortes parafina 10 micra.

### REATIVO DE SCHIFF

Fucsina basica (vermelho magenta) . . . . .	1 gr.
Água destilada . . . . .	200 ml.
Bissulfito de sódio . . . . .	2 gr.
Ácido clorídrico normal . . . . .	10 ml.
Carvão vegetal . . . . .	1 gr.

### MÉTODO DE PREPARAÇÃO

- 1 – Dissolver a fucsina na água fervendo.
- 2 – Esfriar esta solução até 70º
- 3 – Adicionar o bissulfito de sódio.

- 4 — Agitar bem até esfriar, então adicionar o ácido clorídrico normal.
- 5 — Agitar bem, tampar e guardar em lugar escuro por 24 horas.
- 6 — Adicionar o carvão vegetal.
- 7 — Agitar e filtrar.

OBS: Esta solução não deve ficar escura.

### TÉCNICA DE COLORAÇÃO\*

- 1 — Desparafinar e hidratar.
- 2 — Ácido periódico a 2% ..... 15 min.
- 3 — Lavar em água destilada.
- 4 — Reativo de Schiff ..... 15 min.
- 5 — Lavar bem em água corrente.
- 6 — Dar 5 mergulhos rápidos na hematoxilina.
- 7 — Lavar bem em água corrente.
- 8 — Desidratar, clarear e montar.

### PREPARAÇÕES DE SOLUÇÕES APROXIMADAMENTE 1 NORMAL

Para fins histológicos e químicos, quando uma exatidão volumétrica não é exigida, soluções aproximadamente normais de ácidos e bases podem ser feitas dissolvendo ou diluindo em um (1) litro de água as seguintes quantidades das substâncias relacionadas abaixo:

Ácido acético glacial . . . . .	58,0 ml
Hidróxido de amônio, ap.gr. 0.89-0.90 . . . . .	68.0 ml
Ácido bórico . . . . .	20.7 ml
Ácido cítrico . . . . .	70.0 ml
Ácido fórmico, 90% . . . . .	43.0 ml
Ácido clorídrico, concentrado. . . . .	83.0 ml
Ácido láctico, 88% . . . . .	85.0 ml
Ácido nítrico concentrado . . . . .	65.0 ml
Ácido perclórico, 70—72% . . . . .	86.0 ml
Ácido fosfórico, (orto) . . . . .	23.0 ml
Hidróxido de potássio . . . . .	56.0 gr
Carbonato de sódio (anidro) . . . . .	53.0 gr
Hidróxido de sódio . . . . .	40.0 gm
Ácido sulfúrico, concentrado . . . . .	28.0 ml



## ALCIAN-BLUE

FIXADOR: Formol à 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

## SOLUÇÃO DE ALCIAN-BLUE

Alcian-blue .....	1 gr.
Ácido acético glacial .....	3ml.
Água destilada .....	.97 ml.

### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 – Desparafinar e hidratar.
- 2 – Solução de alcian-blue ..... 30 min.
- 3 – Lavar.
- 4 – Fundo em hematoxilina.....5 mergulhos.
- 5 – Lavar bem em água corrente.
- 6 – Desidratar,clarear e montar.

## PAS ALCIAN-BLUE

FIXADOR: Formol a 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

- 1 – Desparafinar e hidratar até a água destilada.
- 2 – Solução de alcian-blue ..... 30min.
- 3 – Lavar em água destilada
- 4 – Ácido periódico ..... 15 min.
- 5 – Lavar em água destilada
- 6 – Reativo de Schiff ..... 15min.
- 7 – Lavar bem em água corrente.
- 8 – Hematoxilina – rapidamente.
- 9 – Lavar bem em água.
- 10 – Desidratar,clarear e montar.

## RETÍCULO

FIXADOR: Formol a 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

## SOLUÇÃO DE PRATA AMONICAL

Solução de nitrato de prata à 10% . . . . .	20 ml.
Hidróxido de potássio à 10% . . . . .	4 ml.

Esta mistura (24 ml) formará um precipitado escuro, adicionar hidróxido de amônio P.A. até a dissolução do precipitado, no máximo 4 ml. Adicionar igual volume de água destilada.

OBS: Esta solução será desprezada depois do uso.

### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 – Desparafinar e hidratar.
- 2 – Permanganato de potássio a 1% . . . . . 1 min.
- 3 – Lavar em água.
- 4 – Ácido oxálico a 3% . . . . . 1 min
- 5 – Lavar em água.
- 6 – Alúmen férrico a 1% . . . . . 1 min.
- 7 – Lavar em água, passar em água destilada.
- 8 – Solução de prata amoniacal . . . . . 1 min.
- 9 – Lavar passando pela água destilada.
- 10 – Solução de formol a 10% . . . . . 3 min.
- 11 – Lavar em água, passar pela água destilada
- 12 – Cloreto de ouro a 0,2% . . . . . 2 min.
- 13 – Lavar em água.
- 14 – Hipossulfito de sódio a 2% . . . . . 1 min.
- 15 – Lavar bem em água destilada
- 16 – Contrastar com Van Gieson . . . . . 2 min.
- 17 – Desidratar, clarear e montar.

## AZOCARMIN

FIXAÇÃO: Formol a 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

### SOLUÇÕES:

- |  |            |
|--|------------|
| A – Azocarmin. . . . .   | 0,05 gr.   |
| Água destilada. . . . .  | 100,00 ml. |
| Aquecer por 20 min, filtrar e acrescentar 1% de ácido acético glacial. |            |
| B – Óleo de anilina . . . . .  | 1 ml.      |
| Álcool a 95%. . . . .  | 39 ml.     |



C — Álcool a 70%.....	99 ml.
Ácido acético .....	1 ml.
D — Ácido fosfotúngstico.....	3 gr.
Água destilada.....	100 ml.
E — Anilina azul (solúvel em água).....	0,5 gr.
Orange G.....	2,0 gr.
Ácido oxálico .....	2,0 gr.
Água destilada.....	100,0 ml.

#### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 — Desparafinar e hidratar
- 2 — Solução A, a 55-60º .....
- 3 — Deixar na temperatura ambiente.....
- 4 — Solução B.....
- 5 — Solução C.....
- 6 — Solução D .....
- 7 — Água destilada
- 8 — Solução E.....
- 9 — Lavar rapidamente em água.
- 10 — Desidratar, clarear e montar.

### TRICROMICO DE GOMORI (PARA TECIDO CONJUNTIVO)

FIXADOR: formol 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

#### SOLUÇÃO A:

Cromotrope 2 R .....	0,6 gr.
Fast Green.....	0,3 gr.
Ácido acético .....	1,0 ml.
Ácido fosfotúngstico.....	0,8 gr.
Água destilada.....	100,0 ml.

OBS: O Fast Green ou verde claro amarelado poderá ser substituído por azul de anilina caso se deseje corar o colágeno em azul.

#### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 — Desparafinar e hidratar até a água destilada.

- 2 – Hematoxilina de Harris. . . . . 5 min.  
Hematoxilina de Mayer . . . . . 15 min.
- 3 – Corando com Hematoxilina de Harris, diferenciar . . . . .  
em álcool clorídrico.
- 4 – Lavar bem em água corrente.
- 5 – Corar na solução A . . . . . 10 a 20 min.
- 6 – Lavar rapidamente em água.
- 7 – Desidratar, clarear e montar.

### FUCSINA RESORSINA DE WEIGHERT

#### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 – Desparafinar e hidratar até a água destilada
- 2 – Álcool a 90%.
- 3 – Fucsina Resorsina de Weighert . . . . . 1 hora.
- 4 – Lavar rapidamente em álcool a 90%
- 5 – Hematoxilina . . . . . 5 mergulhos.
- 6 – Fundo de van gueson.
- 7 – Alcoois gradativos até o absoluto (passagens rápidas).
- 8 – Xilóis e montar em bálsamo.

#### MÉTODO DE PREPARO DO CORANTE DE WEIGHERT:

- 1 – Água (não precisa ser destilada) . . . . . 200 ml.
- 2 – Fucsina básica (vermelho magenta). . . . . 2 gr.
- 3 – Resorcina . . . . . 4 gr.
- 4 – Ácido fênico. . . . . 4 ml.
- 5 – Percloroeto de ferro anidro. . . . . 30 gr.

#### TÉCNICA:

- 1 – Deixa-se a água num frasco até esquentar bem.
- 2 – Acrescenta-se a fucsina (com a capsula sobre o fogo), agitando.
- 3 – Adiciona-se a Resorsina, agitando.
- 4 – Adiciona-se o ácido fênico.

Quando este preparo entrar em ebulição adiciona-se o percloroeto de ferro dissolvido em 100 ml de água fria.

Agitando-se sempre deixa-se ferver por 2 a 5 minutos.  
Deixa-se esfriar por completo, então filtra-se



O precipitado que se formar no papel de filtro será colocado no frasco em que foram preparados 200 ml de álcool absoluto.

O líquido que sobrar da primeira filtração será desprezado

Ferve-se a fogo brando agitando-se sempre.

Logo que se notar que o precipitado soltou do papel deixar esfriar.

Torna-se a filtrar e completa-se com álcool absoluto até 200 ml.

Por fim adicionam-se 2 ml de ácido clorídrico normal.

## PERL'S

FIXAÇÃO — Formol a 10%, formol neutro.

TÉCNICA — cortes em parafina 6 micra.

## SOLUÇÕES

A — Ferrocianeto de potássio . . . . . 2 gr  
Água destilada . . . . . 36 ml  
Ácido clorídrico concentrado . . . . . 4 ml

B — Safranina . . . . . 0,2 gr  
Água destilada . . . . . 99 ml  
Ácido acético glacial . . . . . 1 ml

## TÉCNICA

- 1 — Desparafinar e hidratar até a água destilada
- 2 — Corar na solução A . . . . . 30 min
- 3 — Lavar em água
- 4 — Contrastar rapidamente na solução B
- 5 — Álcoois
- 6 — Xilóis e montar

## KOSSA

FIXAÇÃO — formol a 10%, formol neutro

TÉCNICA — cortes em parafina 6 micra

- 1 — Desparafinar, hidratar até à água destilada
- 2 — Solução de Nitrato de Prata a 10% (preparado na hora de uso)  
ao sol . . . . . 30 min
- 3 — Lavar em água
- 4 — Hiposulfito de sódio a 2% . . . . . 1 min

- 5 – Lavar bem em água corrente
- 6 – Contrastar em safranina a 1% (rapidamente)
- 7 – Álcoois
- 6 – Xilóis e montar.

## WADE

FIXAÇÃO— formol a 10%, formol neutro

TÉCNICA – cortes em parafina 6 micra

## SOLUÇÃO

### FUCSINA DE ZIEHL

Fucsina básica . . . . .	.1 gr
Cristais de fenol. . . . .	.5 gr
(se for fenol líquido usar 5 ml)	
Água destilada. . . . .	100 ml
Álcool absoluto. . . . .	10 ml

Dissolver lentamente a fucsina na água

Dissolver o fenol no álcool

Misturar as duas soluções, filtrar e usar.

## MÉTODO

1 – Aquecer a lâmina até sair vapor

2 – Gotejar sobre a lâmina a seguinte mistura:

Terebentina. . . . . 60 ml

Vaselina líquida. . . . . 40 ml

3 – Gotejar álcool absoluto

4 – Lavar bem em água

5 – Fucsina de Ziehl. . . . . 20 min

6 – Lavar em água corrente

7 – Descorar em solução de ácido sulfúrico a 20% até a lâmina ficar com o tom rosa pálido.

8 – Lavar em água corrente

9 – Contrastar rapidamente em azul de metileno a 1%

10 – Lavar rapidamente em água

11 – Secar a lâmina na estufa

12 – Levar a lâmina direto ao xilol e montar.



## FITE

FIXADOR: Formol 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em parafina 6 micra.

### SOLUÇÃO:

Óleo de anilina . . . . . 1 parte.  
Xilol . . . . . 2 partes.

### MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 – Desparafinar em duas trocas de xilol-óleo de anilina por 12 min cada. Deixar escorrer o excesso, porém não secar.
- 2 – Fucsina de Zhiel . . . . . 30 min.
- 3 – Lavar em água corrente . . . . . 3 min.
- 4 – Diferenciar as lâminas individualmente em ácido sulfúrico a 1% até os cortes ficarem rosa . . . . . cerca de min.
- 5 – Lavar em água corrente . . . . . 3 min.
- 6 – Contrastar em azul de metileno

Azul de metileno . . . . . 1,4 gr.  
Álcool a 95% . . . . . 100,0 ml.

### SOLUÇÃO PARA USO:

Solução anterior . . . . . 10,0 ml.  
Água . . . . . 90,0 ml.

- 7 – Lavar rapidamente em água.
- 8 – Secar as lâminas na estufa.
- 9 – Xilol e montar.

## GROCOTT

FIXADOR: Formol 10%, formol neutro.

TÉCNICA: Cortes em 6 micras.

### SOLUÇÕES:

- 1 – Ácido crônico a 4%.
- 2 – Nitrato de prata a 5%.

- 3 – Urotropina ou formina ou metenamina ou hexametenotetramina a 3%.
- 4 – Bórax a 5%.
- 5 – Bissulfito de sódio a 1%.
- 6 – Cloreto de ouro a 0,2%.
- 7 – Hipossulfito de sódio a 2%.
- 8 – Solução estoque de Metenamina:

Solução de nitrato de prata a 5% . . . . . 5 ml.

Solução de metenamina a 3% . . . . . 100 ml.

Isto formará um precipitado que se formará com a agitação, conservar na geladeira.

- 9 – Solução para uso de metenamina:

Água destilada . . . . . 25 ml.

Bórax a 5% . . . . . 2 ml.

Metenamina (sol. estoque) . . . . . 25 ml.

- 10 – Solução de Verde Claro Amarelado:

Verde claro amarelado . . . . . 0,2 gr.

Água destilada . . . . . 100,0 ml.

Ácido acético glacial . . . . . 0,2 ml.

## MÉTODO DE COLORAÇÃO:

- 1 – Desparafinar e hidratar até a água destilada.

- 2 – Ácido crônico a 4% . . . . . 1 hora.

- 3 – Lavar

- 4 – Bissulfito de sódio a 1% . . . . . 1 min.

- 5 – Lavar em água . . . . . 10 min.

- 6 – Água destilada.

- 7 – Solução de metenamina para uso... 1 hora na estufa (este período deve ser observado para que os cortes tão logo peguem uma tonalidade castanho escuro sejam retirados desta solução e passados para o item 8).

- 8 – Lavar.

- 9 – Cloreto de ouro a 0,2% . . . . . 1 min.

- 10 – Hipossulfito de sódio a 2% . . . . . 1 min.

- 11 – Lavar bem em água corrente.

- 12 – Solução de verde . . . . . 15 seg.

- 13 – Alcoois gradativos até o absoluto.

- 14 – Xilóis e montar em bálsamo.



OBS: Para fazer prata metenamina basta substituir o ácido crômico a 4% por ácido crômico a 5%.

## HIGHMAN

(modificação do método do Vermelho-Congo)

FIXAÇÃO – Formol a 10%, formol neutro

TÉCNICA – Cortes em parafina 6 micra

### MÉTODO

- 1 – Deixar os cortes em Vermelho-Congo (C.C.) a 0,5% em álcool a 50% ..... 1 a 5 min
- 2 – Diferenciar em KOH a 0,2% em álcool a 80% ..... 1 a 3 min  
(nesta passagem o amiloide pode também ser diferenciado, por isso aconselha-se mergulhar os cortes imediatamente em solução de Carbonato de Lítio, saturada)
- 3 – Lavar em água
- 4 – Contrastar em hematoxilina ..... 1 a 3 min
- 5 – Lavar bem em água
- 6 – Desidratar em álcoois
- 7 – Xilol
- 8 – Montar

## GRAM

FIXAÇÃO – formol a 10%, formol neutro

TÉCNICA – cortes em parafina 6 micra

### MÉTODO

- 1 – Desparafinar e hidratar
  - 2 – Com a lâmina na horizontal adicionar esta solução ..... 1 min  
1 ml (20 gotas) de solução aquosa de cristal violeta a 1%  
5 gotas de bicarbonato de sódio a 5%
- As duas soluções podem ser misturadas um pouco antes de usar.
- 3 – Lavar em água destilada
  - 4 – Mergulhar em iodo de Gram ..... 1 min
- |                         |       |
|-------------------------|-------|
| iodo.....               | 1 gr  |
| iodeto de potássio..... | .2 gr |
| Água destilada.....     | 300ml |

- 5 – Lavar em água destilada e secar totalmente em papel de filtro
- 6 – Descorar com uma mistura de partes iguais de éter e acetona, pingar sobre a lâmina até não mais sair cor azul.
- 7 – Fucsina básica diluída + ou – 0,5% . . . . . 1 min
- 8 – Lavar em água destilada. Deixar escorrer mas não secar totalmente
- 9 – Acetona
- 10 – Diferenciar rapidamente com 0,1% de ácido pícrico em acetona até tomar uma coloração rosa-amarelada.
- 11 – Lavar rapidamente em acetona e numa mistura de partes iguais de acetona-xilol.
- 12 – Xilol
- 13 – Montar.

### SUDAN III

#### Modo de preparar – (1)

Álcool a 70% . . . . .	50 ml
Acetona . . . . .	50 ml
Sudan III.. (até saturar) . . . . .	+ ou – 2 gr

Colocar na estufa a 50<sup>o</sup> por 24 horas em vidro frouxamente arrolhado com algodão. Deixar esfriar e conservar em vidro hermeticamente fechado. Filtrar na hora de usar.

#### Modo de preparar – (2)

Álcool a 85% . . . . .	95 ml
Acetona . . . . .	5 ml
Sudan III.. (até saturar) . . . . .	+ ou – 2 gr

### TÉCNICA DE COLORAÇÃO

- 1 – Fazer os cortes em congelação, aproximadamente 10 micra
- 2 – Colocar os cortes em água ligeiramente aquecida
- 3 – Passar rapidamente em álcool a 70%
- 4 – Corar pela solução de Sudan III. . . . . 15 min
- 5 – Lavar rapidamente em álcool a 70%
- 6 – Lavar em água destilada
- 7 – Mergulhar rapidamente em hematoxilina
- 8 – Lavar bem em água, caso esteja com pressa passar pela água amoniacal.
- 9 – Lavar em água



- 10 – Pescar os cortes e deixar escorrer bem a água
- 11 – Montar (antes que os cortes sequem completamente) em uma mistura de gelatina em folha e água, dissolvida em banho-maria.

## PAPANICOLAU

FIXAÇÃO – Álcool–eter ãã

TÉCNICA – Esfregaços

## SOLUÇÕES

### ORANGE

Diluir o pó (5 g) de orange G em 100 ml de água, completar para 1000 ml com álcool absoluto. Adicionar 0,15 gr de ácido fosfotúngstico.

### EA 36

Dissolver a eosina alcoólica (2,25 gr) em álcool absoluto (450 ml).

Dissolver o verde claro amarelado (2,25gr) em 100 ml de água e completar para 450 ml com álcool absoluto.

Dissolver o bismark (0,5 gr) em 100 ml de álcool absoluto.

Misturar na seguinte ordem: verde, bismarck, eosina.

Adicionar 10 gotas de solução de carbonato de lítio, saturada

Ácido fosfotúngstico. . . . . 2 gr.

## MÉTODO DE COLORAÇÃO

- 1 – Lavar em água
- 2 – Hematoxilina de Harris (sem ácido acético). . . . . 5 min
- 3 – Água
- 4 – Diferenciar em álcool-clorídrico
- 5 – Lavar bem em água corrente
- 6 – Lavar em 3 trocas de álcool
- 7 – Corar no Orange G . . . . . de 3–5 min
- 8 – Lavar em 2 trocas de álcool
- 9 – Corar no EA 36. . . . . de 3–5 min
- 10 – Lavar em várias trocas de álcool absoluto
- 11 – Xilóis
- 12 – Montar.

## SOLUÇÃO SULFOCRÔMICA

(para limpeza)

Água . . . . .	1 000 ml
Bicromato de potássio . . . . .	.30 gr
Ácido Sulfúrico . . . . .	50 ml

Dissolver o dicromato na água.  
Adicionar lentamente o ácido sulfúrico.

### WARTHIN—STARRY Modificado

I — **Fixação** — Formol a 10%. Não utilizar fixadores que contenham cromatos.

II — **Cortes** em parafina, com espessura em torno de 6 micrômetros.

III — **Soluções** — Usar frascos quimicamente limpos, e prepará-las com água bidestilada.

A — Água acidulada  
água bidestilada a 1% — 0,65 ml. Ajustar o pH, que já deve estar próximo de 4.

B — Gelatina  
Deve ser preparada na hora do uso.  
água acidulada 7,5 ml, gelatina 0,375 g.  
Pode ser usada gelatina comum incolor vendida em pequenas folhas.

C — Solução de nitrato de prata a 1% (impregnadora)  
Nitrato de prata 1,0 g  
água acidulada 100 ml

D — Solução de nitrato de prata a 2% (reveladora)  
Nitrato de prata P.A. (cristais) 2,0 g  
água acidulada 100 ml

E — Solução de hidroquinona a 0,15%  
hidroquinona (cristais) tipo fotográfico 0,15 g  
água acidulada 100 ml



**Nota** — Com exceção da gelatina, todas as outras soluções devem ser guardadas na geladeira, contidas em frasco escuro. Tal medida permite mantê-las úteis durante 3 meses.

#### IV — Desenvolvimento

- 1 — Desparafinar e hidratar em água destilada
- 2 — A lâmina é mantida na água, enquanto se prepara as soluções.
- 3 — Preparo da sol. reveladora (quantidade prevista p/3 lâminas)  
Em três pequenos "Beaker" limpos colocar:  
frasco (a) — solução de nitrato de prata a 2% 3 ml  
água acidulada 0,5 ml  
frasco (b) — solução de gelatina a 5% 7,5 ml  
água acidulada 0,5 ml  
frasco (c) — hidroquinona 4 ml  
água acidulada 0,5 ml
- 4 — Colocar na estufa a 58° durante 30 min.:  
Frasco contendo a solução impregnadora (c) de nitrato de prata a 1%, com as lâminas mergulhadas.  
Os três pequenos frascos, que contêm os componentes da sol. reveladora.
- 5 — Usando pinça histológica, cuja extremidade foi previamente mergulhada na parafina por duas vezes, retirar as lâminas da sol. impregnadora e depositá-las deitadas sobre bastões de vidro paralelos por sobre placa térmica aquecida entre 40°C e 50°C, colocando, entre os balões e a placa, disco do papel de filtro para facilitar o controle da revelação dos preparados.
- 6 — Ministras os componentes da solução reveladora na seguinte ordem: Verter o conteúdo de (a) no frasco de (b), misturando bem, e em seguida passar para o frasco de (c), misturando-as também.
- 7 — Cobrir totalmente os cortes, com a sol. reveladora, usando pipeta limpa, substituindo a sol, que recobre o corte a cada 5 minutos. Agitar a lâmina o mais constantemente possível, tendo cuidado para não derramar a solução.

Obs.: Mais apropriado seria a utilização de um agitador térmico

- 8 – Após aproximadamente três a quatro mudas, o ponto ótimo de revelação estará alcançado.

Nota – O controle da revelação poderá ser feito sob microscópio, tendo-se cuidado para não tocar a solução com as objetivas até que os cortes atinjam uma coloração marrom-claro brilhante.

- 9 – Enxaguar as lâminas em água corrente, e com pano bem molhado em água, limpar o excesso, sobretudo da face oposta ao corte, a fim de evitar opacidade.

10 – Desidratar em álcool

11 – Clarear em xilol

12 – Montar em Permount ou bálsamo

- V – **Resultados:** Espiroquetas e corpos de **Denovan** em marron escuro e negro.

#### VI – **Recomendações**

1 – Usar água bidestilada

2 – As soluções são guardadas em frasco escuro e mantidas a 4°C o que alonga o prazo de validade para até 12 semanas.

3 – Usar frasco esterilizado para o preparo da gelatina ou então prepará-la justo para o uso.

4 – Substituir banho-maria por estufa a 58° – 60°C, tanto para a impregnação como para aquecer as soluções.

5 – Colocar as lâminas em placa térmica aquecida a 45° o que reduz o tempo da revelação para 10 min.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – CARVALHO, Thales Mello: "Matemática Comercial e Financeira" Fename – 2ª edição – 1971
- 2 – GONÇALVES, Dalton: "Física" – Livro Técnico – 4ª edição/1967
- 3 – BEÇAK, Maria Luiza: "Biologia Moderna" – Nobel S.A. – 2ª edição – 1975.
- 4 – DE ROBERTIS, Nowinski e Saez: "Biologia Celular" – El Ateneo do Brasil - 2ª edição – 1974.
- 5 – LUNA, Lee G.: "Manual of Histologic Staining Methods" – MC Graw Hill Book Company – 3ª edição – 1968.
- 6 – SERAPIÃO, C.J.; SILVA, P.F.O.: Demonstração de Treponemas em Tecidos.  
Rev. Med. Est. Guanabara. 41:138, 1974.
- 7 – CONN, H.J.; DARROW, Mary A. & EMMEL, Victor M: "Staining Procedures" The Williams & Wilkins Company – 2ª edição – 1960.
- 8 – KRAJIAN, Aran A. & GRADWOHL, R.B.H.: "Histopathological Technic" The C.V. Mosby Company – 2ª edição – 1952
- 9 – SERAPIÃO, C.J.; SERAPIÃO, M. J.; SANTANA L.L.: Curso Intensivo de Histotecnologia, Manaus 1976 – Div. Nac. Câncer.

