



UAlg ESS

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
ESCOLA SUPERIOR DE SAÚDE

Ciências Biomédicas Laboratoriais

Métodos Cito-Histoquímicos

Aula 3

2016/17

João Furtado

jffurtado@ualg.pt

Gab. 2.06 na ESSUAlg

Sumário

Hematoxilina

- Introdução

- Tipos de hematoxilina (alumínica, férrica e tungsténica)

Eosina

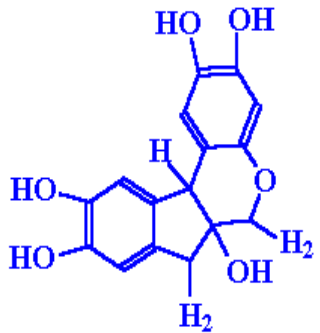
- Introdução

Hematoxilina&Eosina

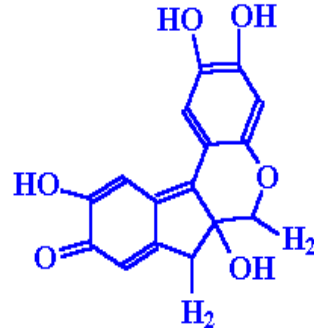
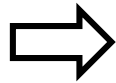
Hematoxilina

Coloração nuclear

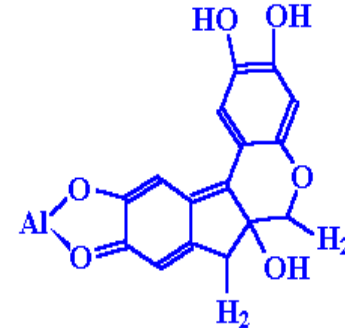
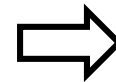
- ❑ Extraída da madeira da árvore *Hematoxylon Campechianum* (México)
- ❑ Corante natural mais utilizado em Histologia
- ❑ Não tem coloração, mas após oxidação transforma-se em **hemateína**
- ❑ Mordente pode ser o alumínio ou um sal de cobre, ferro, tungsténio → **coloração nuclear**



Hematoxilina



Hemateína



Laca

Hematoxilina - Hemateína

- ❑ Na sua forma mais pura a hematoxilina é um pó incolor (ligeiramente amarelada)
- ❑ Em solução aquosa é incolor
- ❑ O agente corante é a hemateína (por oxidação)



- ❑ **Natural:** exposição ao ar e luz solar ou UV (até 3 meses) (Ehrlich e Delafield).
- ❑ **Química:** agentes como Permanganato de Potássio, Iodina, Iodato de Sódio (Mayer), Peróxido de Hidrogénio ou Óxido de Mercúrio (Harris).
- ❑ A oxidação química acarreta o risco de desenvolver produtos de reação inúteis ou uma duração limitada da solução

Dependendo do mordente utilizado:

☐ **Alumínio**

- Delafield
- **Ehrlich**
- **Mayer**
- **Harris**

☐ **Ferro**

- Weigert
- Weil
- **Verhoeff**
- **Heidenhain**

☐ **Tungsténio**

- Mallory

Hematoxilina - Alumínica

- ❑ Boa coloração nuclear
- ❑ Mordente é o alumínio (sulfato potássio alumínio ou sulfato de amónia alumínico).
- ❑ Cora os núcleos com uma cor roxa, posteriormente é convertida em azul escuro, quando o tecido é lavado numa solução alcalina fraca (“azular”).
- ❑ Pode-se utilizar **coloração regressiva** ou **progressiva**
 - **Regressiva:** cora em excesso e necessita de diferenciação (soluções de alumínio – processo lento; ou solução alcoólica ácida – processo rápido).
 - **Progressiva:** Altamente seletiva e contrastante, mas lenta.
- ❑ Desvantagem: sensibilidade à passagem por soluções ácidas (ex: coloração Van Gieson → combinação de ácido pícrico e fucsina ácida remove a maior parte da hematoxilina tornando o núcleo difícil de reconhecer)

Hematoxilina Ehrlich (1886)

- ❑ Demora cerca de 2 meses a oxidar
- ❑ Dura vários anos mantendo a coloração e afinidade para o tecido
- ❑ Excelente corante nuclear e mucinas (ótimo para osso e cartilagem)
- ❑ Não é ideal para secção de tecido congelação
- ❑ Demora mais tempo a desaparecer do que as restantes hematoxilinas, o que a torna particularmente útil para tecidos que tenham sido descalcificados ou muito fixados (formol ou Bouin).

Hematoxilina Harris (1900)

- ❑ Das mais utilizadas
- ❑ Nítida coloração nuclear → utilizada como coloração progressiva no diagnóstico de citologia exfoliativa
- ❑ Na rotina histológica utilizada como coloração regressiva ou progressiva

Hematoxilina Mayer (1903)

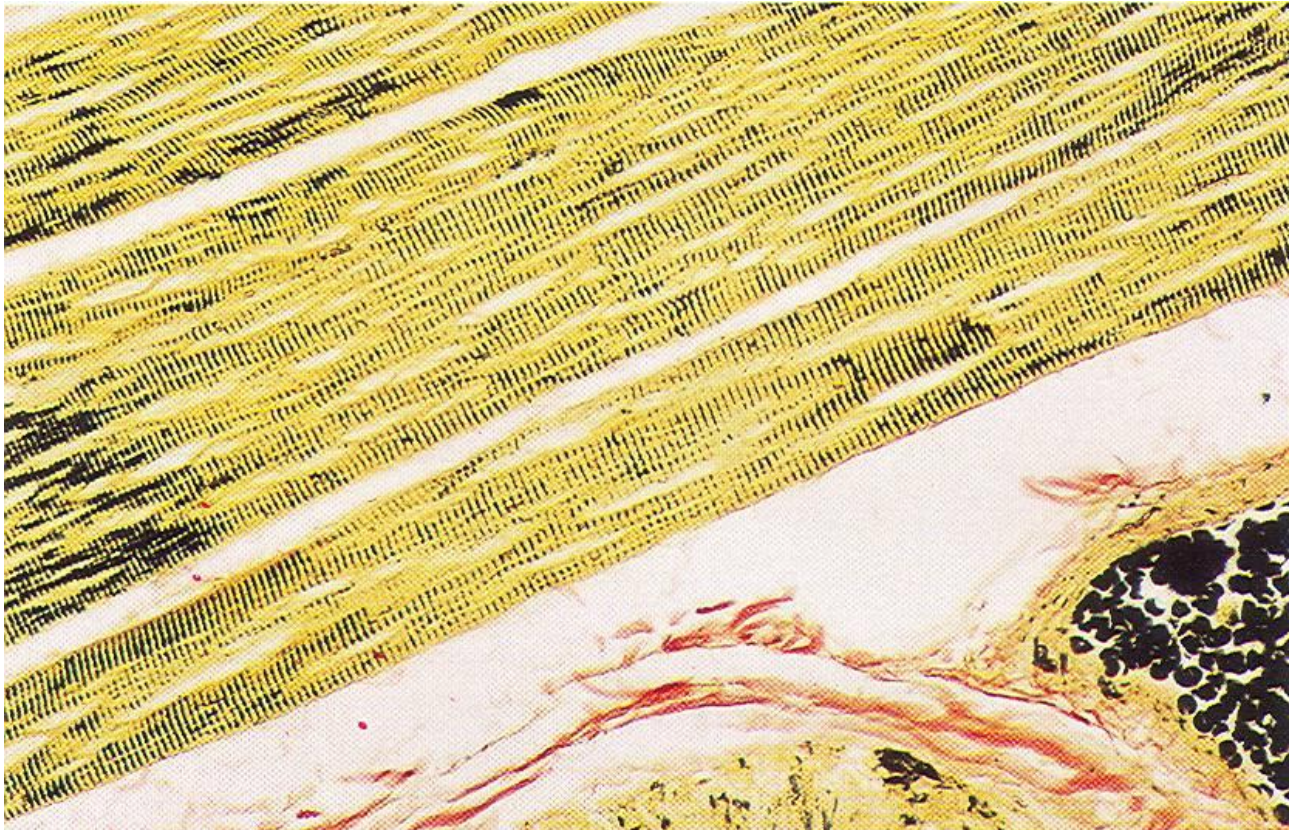
- ❑ Útil em situações onde é necessário um contraste nuclear para realçar o componente citoplasmático
- ❑ Utilizada como contraste nuclear na evidenciação de glicogénio
- ❑ Rápida coloração (5-10min) e “azulado” sem diferenciador

Hematoxilina - Férrica

- ❑ Utiliza sais férricos (cloreto férrico e sulfato de amónia férrico)
- ❑ Duração curta da coloração → necessário manter a solução fortemente ácida, para evitar a precipitação da laca e amplificar a ligação nuclear
- ❑ Ligação hematoxilina-tecido mais forte do que usam alumínio como mordente
- ❑ Cora os núcleos, mas também evidencia outras estruturas (musculo estriado, mielina, queratina, fibras elásticas, organelos celulares)
- ❑ Forte oxidação → preparação do mordente/oxidante e solução hematoxilina em separado, que devem ser misturadas antes de usar (necessário diferenciador)
- ❑ Técnica sequencial: cortes são tratados numa solução de sais férricos → lavados → transferidos para a solução de hematoxilina

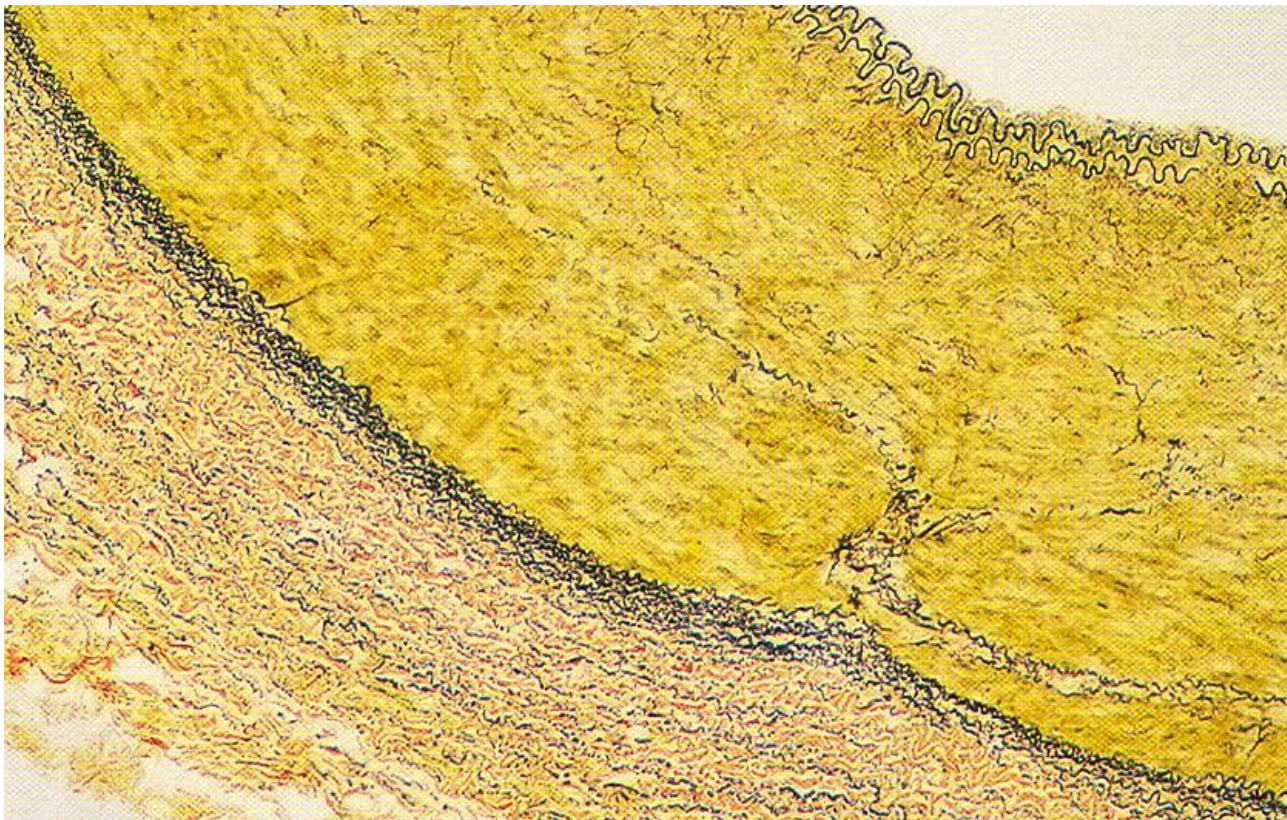
Hematoxilina Heidenhain (1896)

- ❑ Usa o sulfato de amônio férrico como oxidante/mordente
- ❑ Componentes corados de cinza escuro → Mitocôndrias, fibras musculares, cromatina nuclear e mielina



Hematoxilina Verhoeff (1908)

- ❑ Usa cloreto férrico + iodo de lugol na solução hematoxilina
- ❑ Cloreto de ferro aquoso a 2% é o diferenciador
- ❑ Utilizada para demonstrar fibras elásticas (negro), eritrócitos e musculo (amarelo)



Hematoxilina - Tungsténica

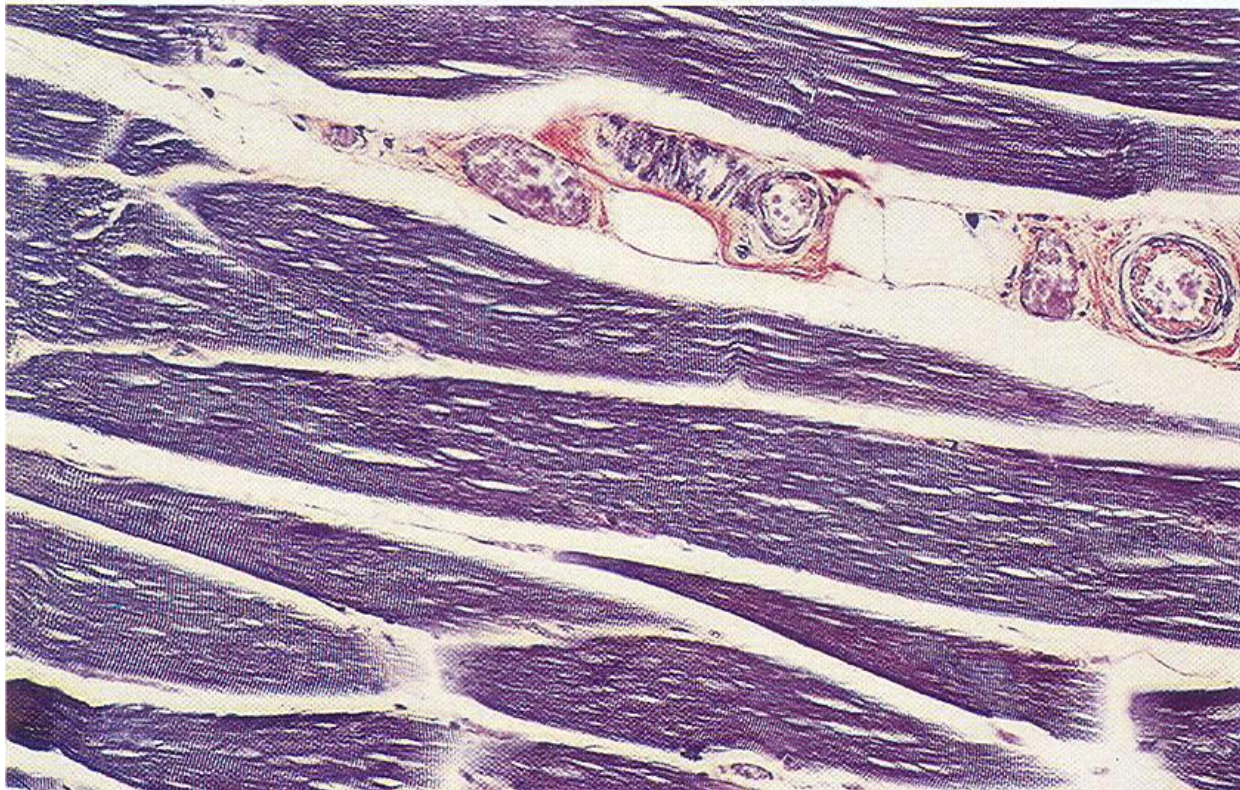
- ❑ Hematoxilina Mallory a mais utilizada
- ❑ 1% ácido fosfotungsténico aquoso funciona como mordente
- ❑ Processo de oxidação não é necessário → período duração reduzido
 - ❑ Oxidação química → período duração reduzido
 - ❑ No entanto ao oxidar a hematoxilina através da oxidação natural (meses), a solução será usável durante muitos anos
- ❑ Aplicável a material do SNC e estrutura tecidual geral

Fibras da neurógliã
Núcleos
Centríolos
Mitocôndrias
Fibrina
Eritrócitos
Estrias musculares
Mielina

Azul

Colagénio
Fibras reticulares
Fibras elásticas
Cartilagem
Tecido ósseo

Vermelho



Eosina

Coloração citoplasmática

❑ **Hematoxilina (alumínica) e Eosina a combinação perfeita**

❑ Cora em diferentes tonalidades, desde o vermelho ao rosa

❑ Distingue o citoplasma de uma grande quantidade de células (adequada diferenciação)

❑ Eosina Y a mais utilizada, sendo solúvel em álcool (satisfatoriamente) e solúvel em água (maior solubilidade)

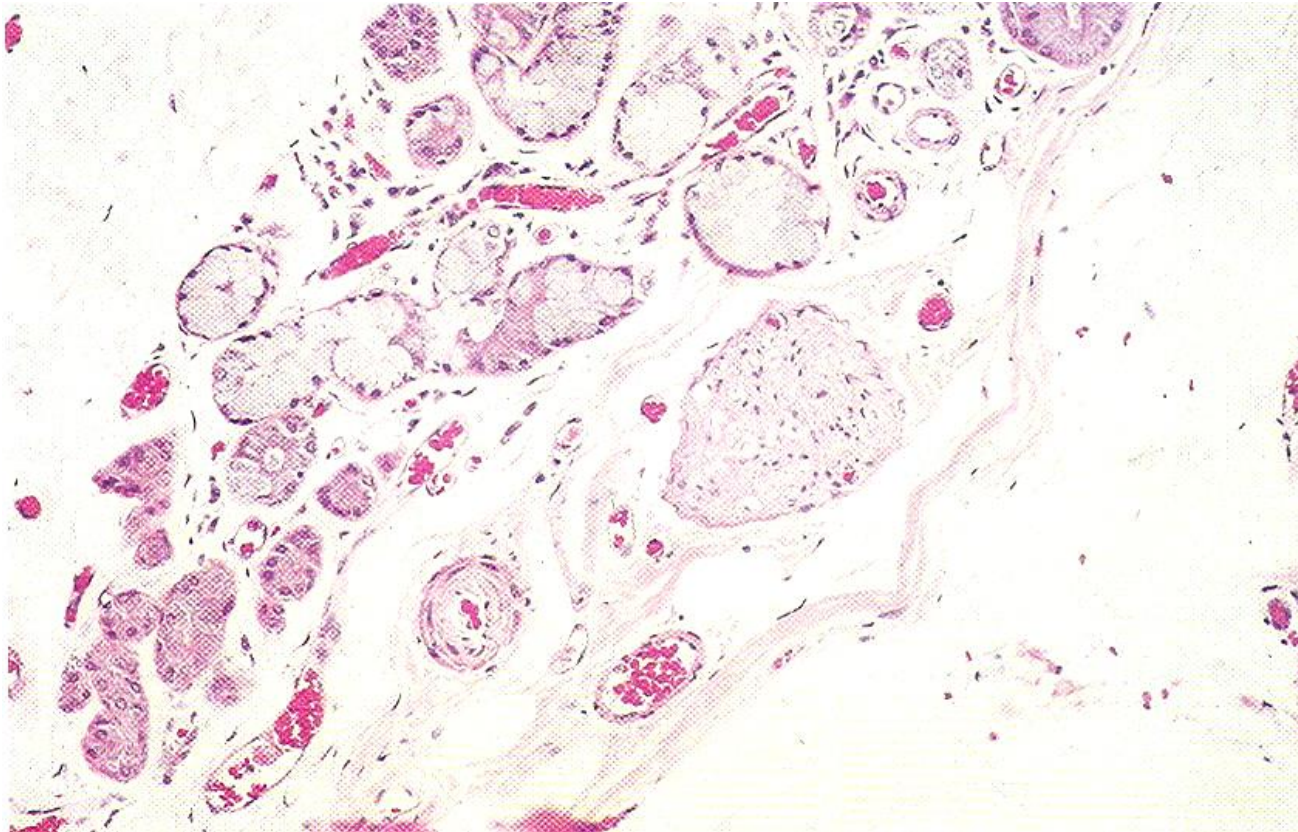
❑ Diferenciação ocorre após lavagem com água corrente e mais tarde na desidratação nos álcoois.

❑ Qualidade da coloração é tanto maior quanto a intensidade de coloração é elevada e a diferenciação reduzida

❑ Adição de floxina e de ácido acético glacial melhora a seletividade

Eosina

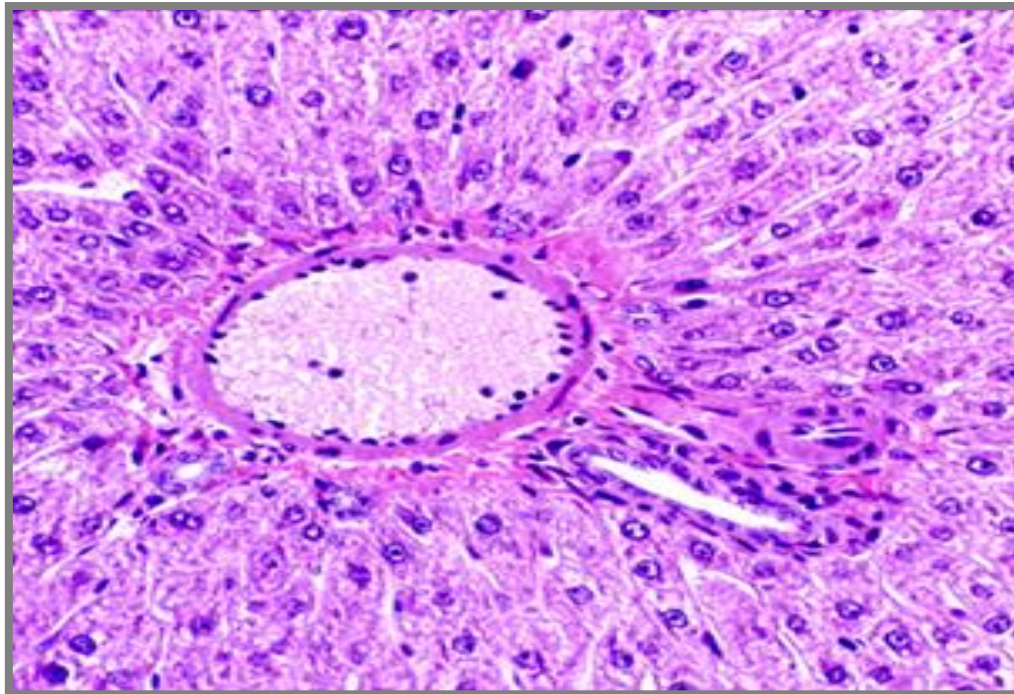
- ❑ Cora citoplasma, eritrócitos e fibras tecido conjuntivo em diferentes tonalidades vermelho, rosa ou laranja

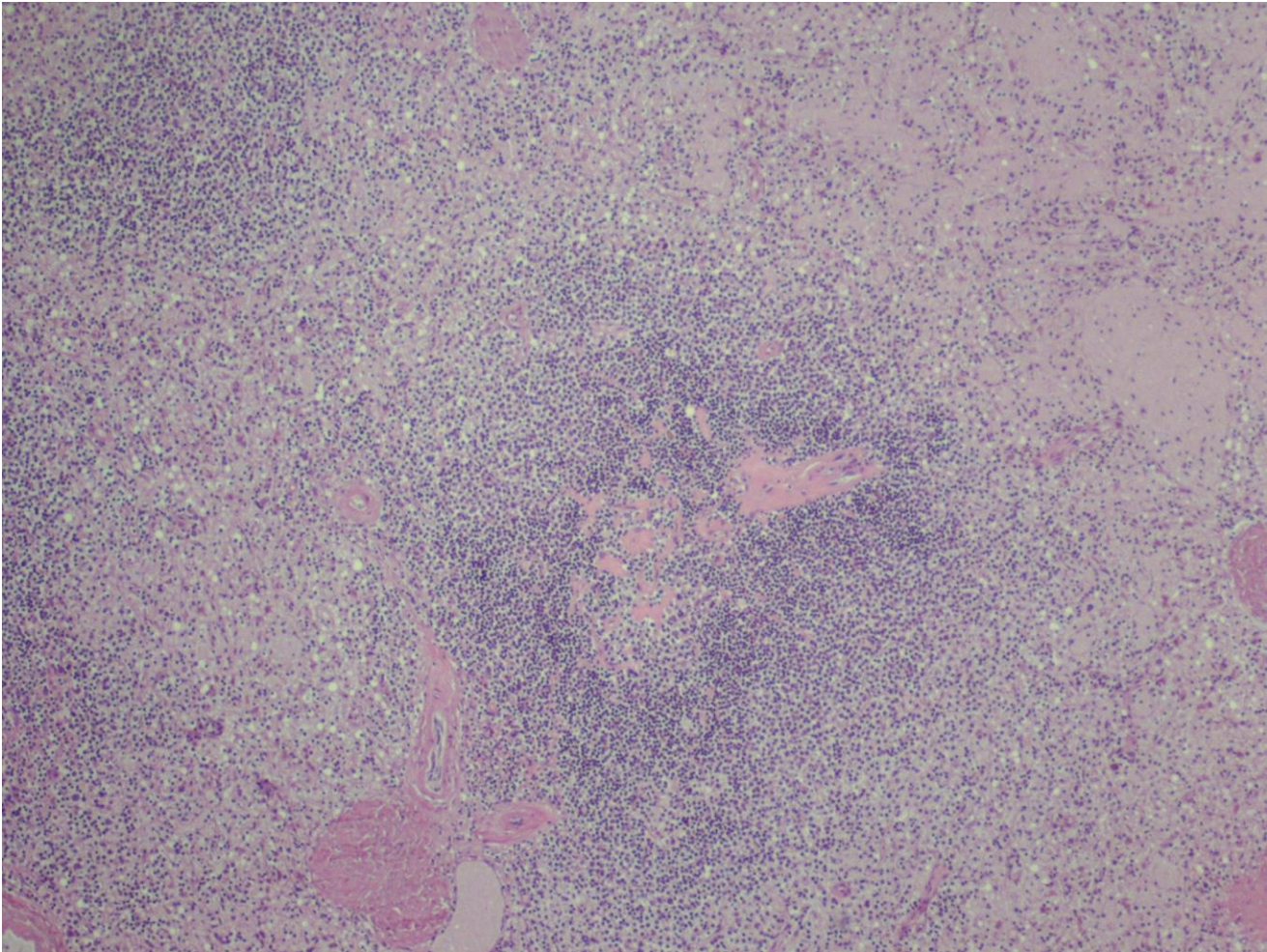


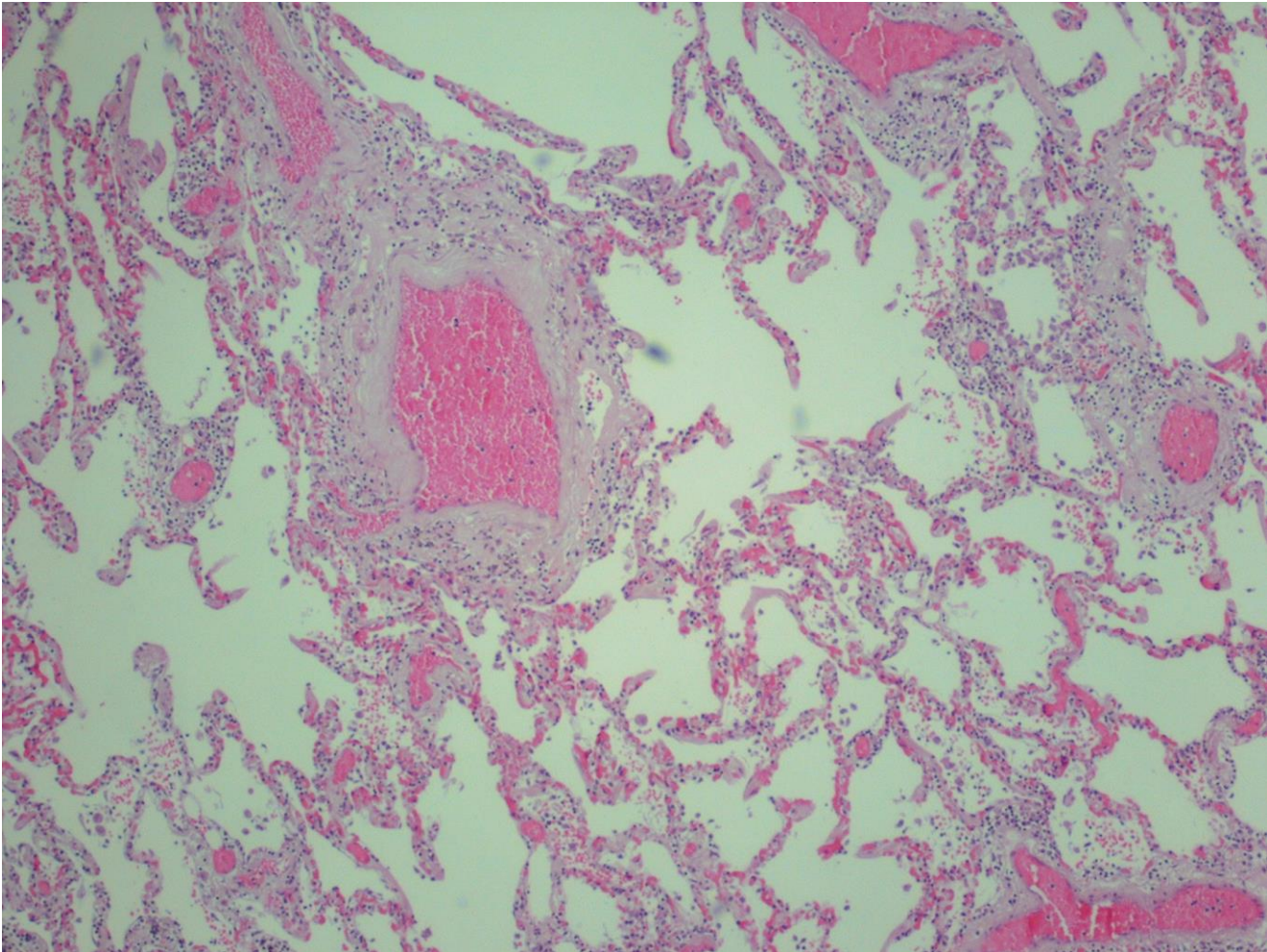
Hematoxilina&Eosina

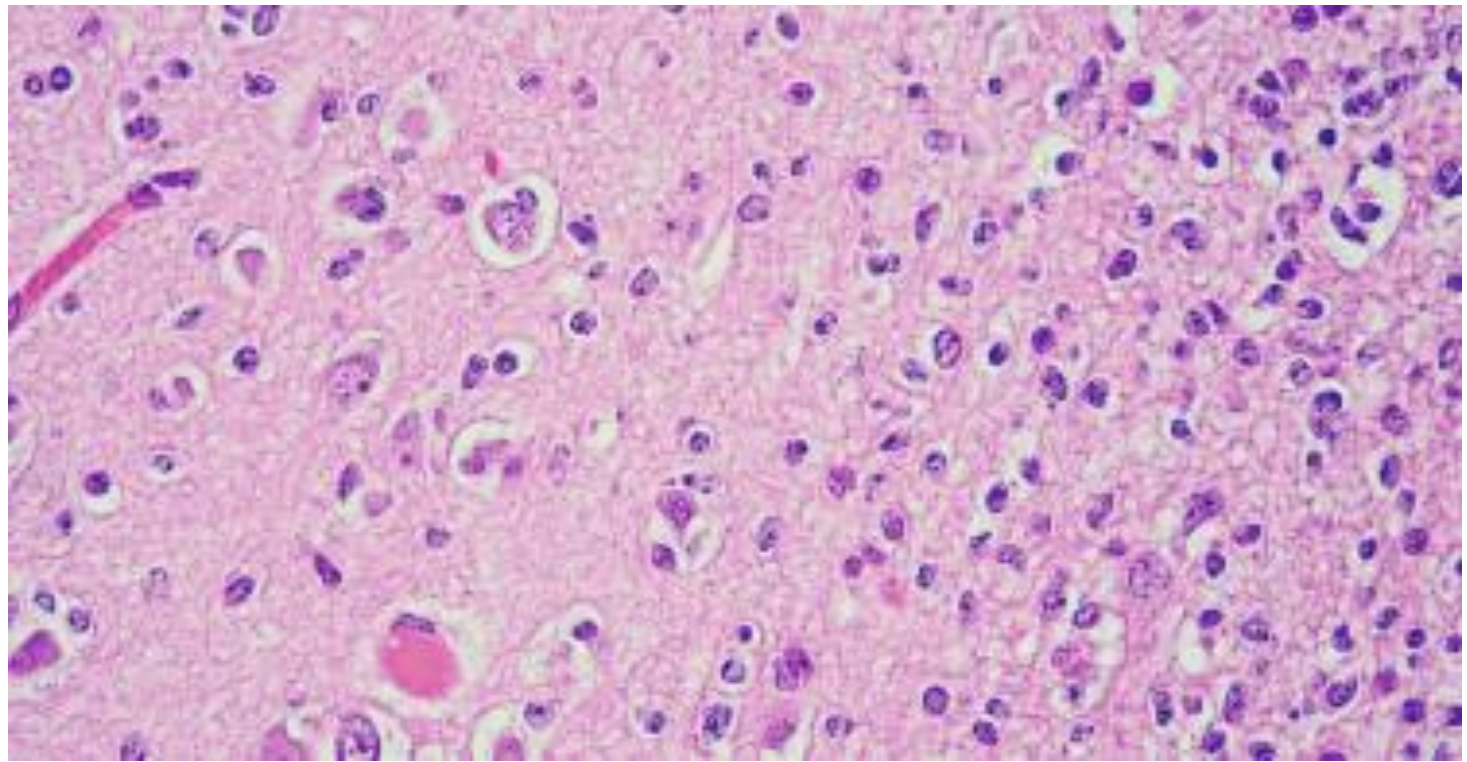
- ❑ A hematoxilina cora os núcleos (azul) e a eosina o citoplasma e fibras tecido conjuntivo em diferentes tonalidades vermelho, rosa ou laranja

Núcleos	→	azul
Citoplasma	→	vários tons de rosa
Fibras musculares	→	rosa intenso / vermelho
Eritrócitos	→	laranja / vermelho
Fibrina	→	rosa intenso









Protocolo H&E

- Xilol
 - Álcool a 100%
 - Álcool a 95%
 - Água corrente
 - Hematoxilina (Harris)
 - Água corrente
 - Diferenciador (álcool ácido a 1%)
 - Água corrente
 - Eosina Y
 - Água corrente
 - Álcool a 95%
 - Álcool a 100%
 - Álcool a 100%
 - Xilol
 - Xilol
- Xilol
 - Álcool a 100%
 - Álcool a 95%
 - Água corrente
 - Hematoxilina (Mayer)
 - Água corrente
 - Água amoniacal a 0.5% (“azular”)
 - Água corrente
 - Eosina Y
 - Água corrente
 - Álcool a 95%
 - Álcool a 100%
 - Álcool a 100%
 - Xilol
 - Xilol