

Comparação da coloração de H&E com Hematoxilina de Harris: Protocolo Convencional vs. Progressivo

Cátia Bernardino¹, Giulia Trindade¹, Rita Caramelo¹, João Palma^{1,2}, Amadeu Borges-Ferro¹

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

²Hospital de Vila Franca de Xira - Unidade Local de Saúde do Estuário do Tejo, E.P.E., Portugal.



Março de 2025

Coloração H&E

Técnica de coloração que permite evidenciar estruturas intra e extracelulares de cortes de tecido.

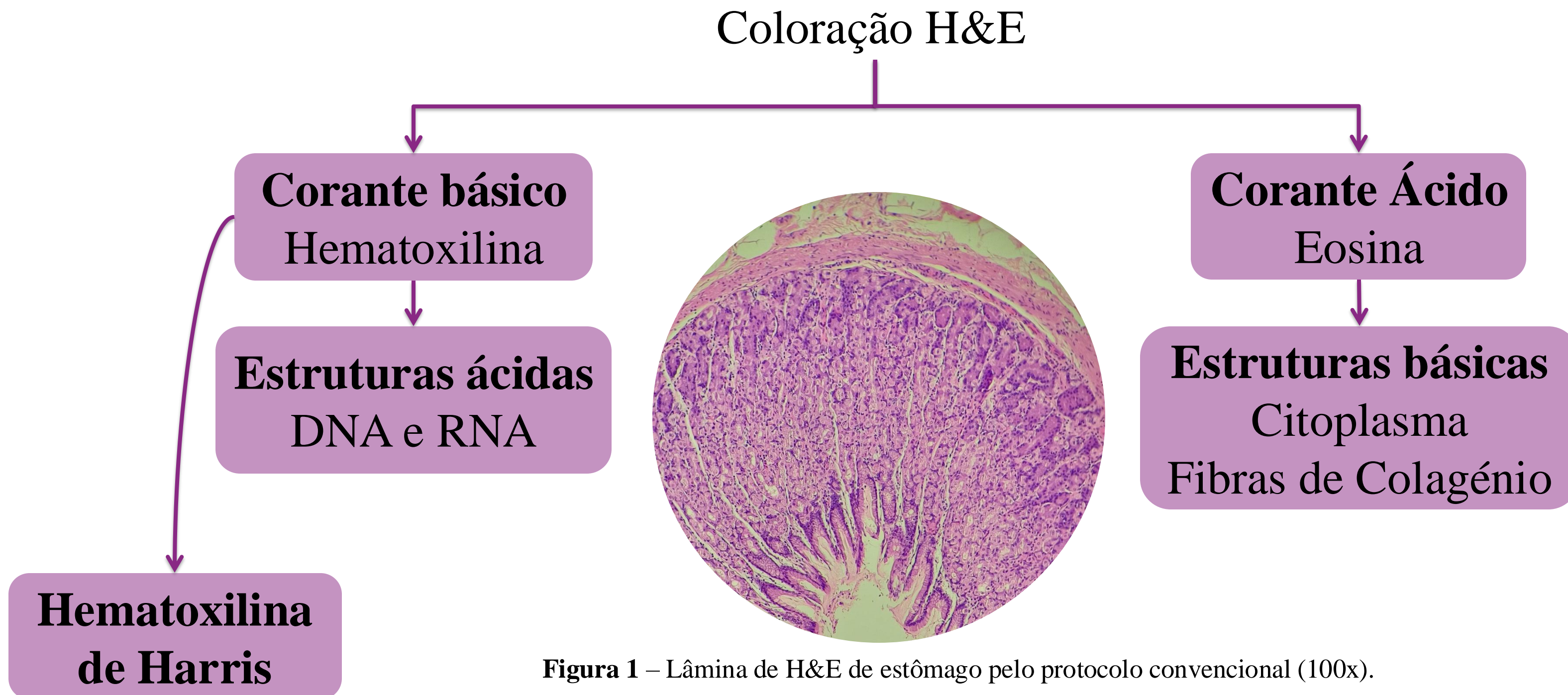


Figura 1 – Lâmina de H&E de estômago pelo protocolo convencional (100x).

Fonte: Própria.

Coloração H&E

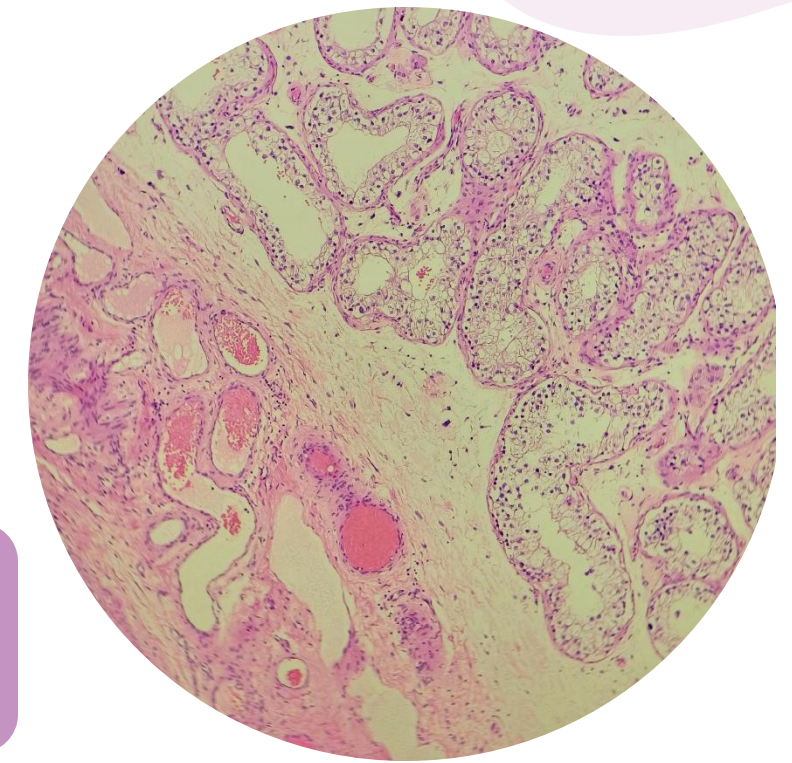
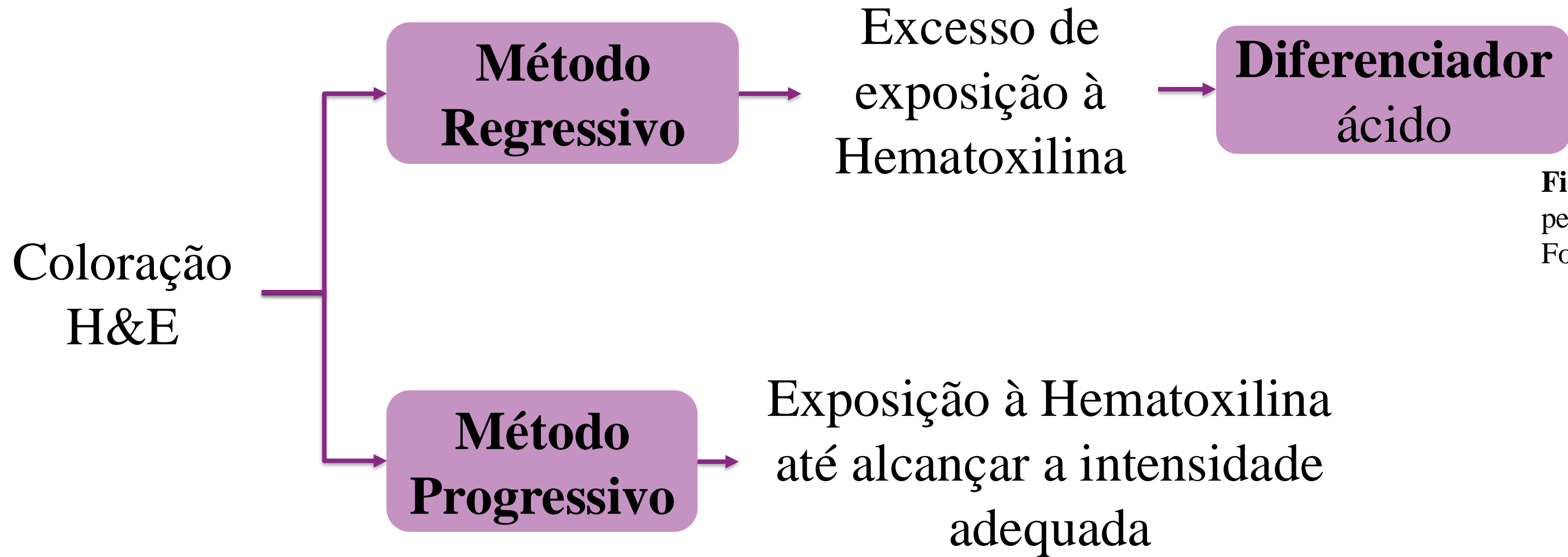


Figura 2 – Lâmina de H&E de testículo pelo protocolo convencional (100x).
Fonte: Própria.

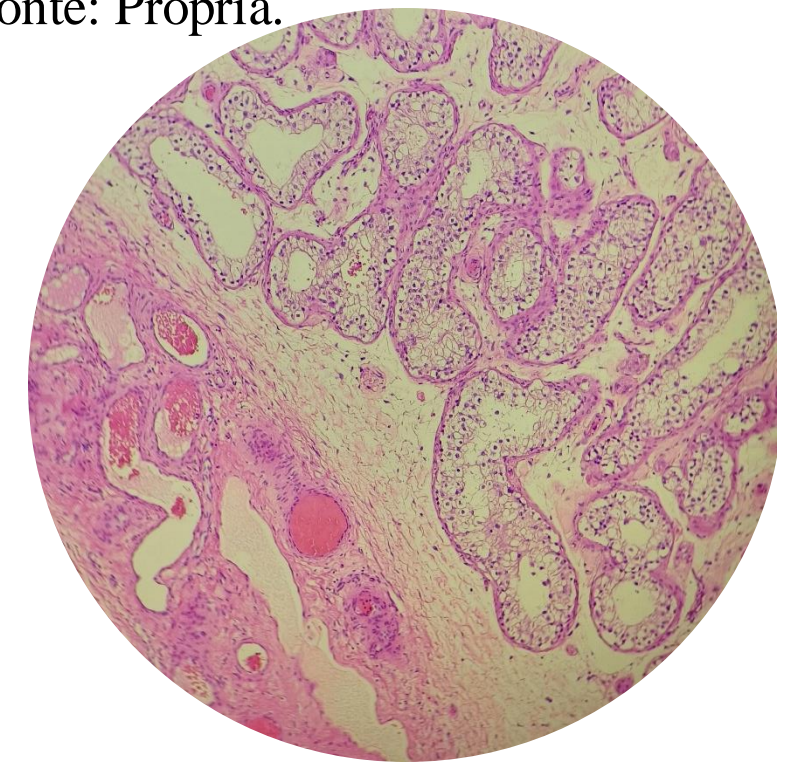


Figura 3 – Lâmina de H&E de testículo pelo protocolo experimental 3 minutos (100x).
Fonte: Própria.

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2019-4-4-70-77>

DOI:10.1111/j.1365-2303.2009.00699.x

OPTIMIZATION OF STAINING OF ELEMENTS OF THE CIRCULATORY AND HEPATOLENAL SYSTEM WITH HEMATOXILIN AND EOSIN

BOGDANOV L.A., KUTYKHIN A.H. *

Federal State Budgetary Institution "Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases", Kemerovo, Russia

Protocol

Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections

Andrew H. Fischer, Kenneth A. Jacobson, Jack Rose, and Rolf Zeller

This protocol was adapted from "Preparation of Cells and Tissues for Fluorescence Microscopy," Chapter 4, in *Basic Methods in Microscopy* (eds. Spector and Goldman). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2006.

Protocol

Manual Hematoxylin and Eosin Staining of Mouse Tissue Sections

Robert D. Cardiff,¹ Claramae H. Miller, and Robert J. Munn

Center for Comparative Medicine and Center for Genomic Pathology, University of California, Davis, Davis, California 95616

Modified Papanicolaou staining protocol with minimum alcohol use: a cost-cutting measure for resource-limited settings

S. Gupta, K. L. Chachra, P. Bhadola and P. Sodhani

Division of Cytopathology, Institute of Cytology and Preventive Oncology (ICMR), Noida, U.P., India



ISSN: 2637-4692

Modern Approaches in Dentistry
and Oral Health Care

DOI: 10.32474/MADOHC.2019.03.000171



Research Article

Comparison of Three Alum Hematoxylin–Harris, Mayer’s, Ehrlich Hematoxylin Using Different Tissues–A Study of 60 Cases

Varun Rastogi¹, Nikopol Kashyap^{1*}, Nisha Madhesi², Nishant³, Ashwini Dayma⁴ and Jyoti Sharma⁴

¹Department of Oral pathology, UCMS college of Dental Surgery, Bhairahawa, Nepal

²Lecturer, Department of Oral Medicine, UCMS college of Dental Surgery, Bhairahawa, Nepal

³Lecturer, Department of Oral pathology, UCMS college of Dental Surgery, Bhairahawa, Nepal

⁴Lecturer, Department of Community & Preventive Dentistry, UCMS college of Dental Surgery, Bhairahawa, Nepal

*Corresponding author: Dr. Nikopol Kashyap, Department of Pedodontics & Preventive Dentistry, UCMS college of Dental Surgery, Bhairahawa, Nepal

Ácido clorídrico em Álcool a 70%



Danos Oculares



Queimaduras da Pele



Danos nas Mucosas



Tóxico para a vida aquática

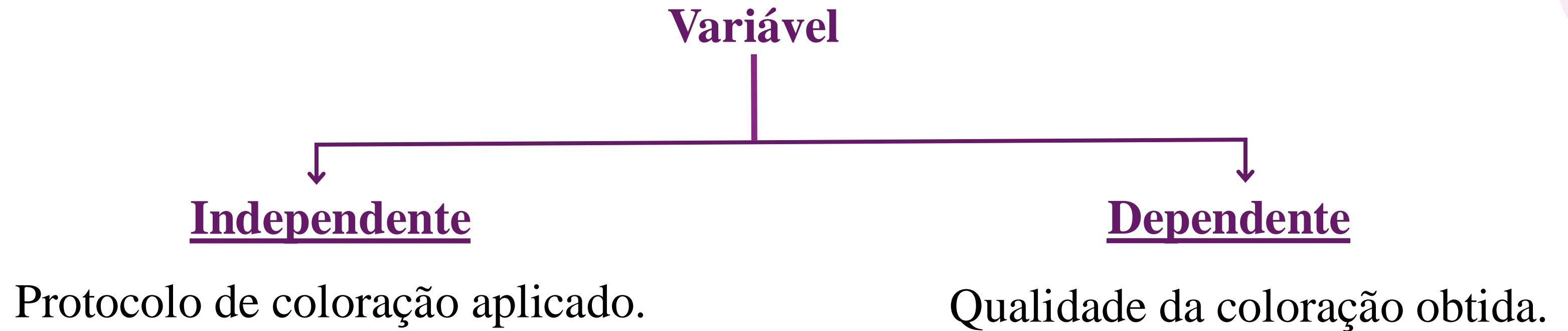
Objetivo Geral

Desenvolver um protocolo de coloração progressivo de H&E, com HH, que origine resultados qualitativamente semelhantes ao protocolo de H&E convencional.

Objetivo Específicos

- Comparar a qualidade da coloração entre o protocolo convencional e os protocolos experimentais.
- Determinar qual o tempo de incubação da HH, do protocolo progressivo, que apresenta o *score* mais elevado.

Variáveis e amostras em Estudo



Amostras:
32 tecidos humanos não neoplásicos

Protocolos

Tabela 1 – Protocolos de coloração de H&E: Convencional e Experimental. Fonte: Própria.

Protocolo Convencional	Hematoxilina & Eosina	Protocolos Experimentais
10'	Xileno	10'
30''	Etanol 100%	30''
30''	Etanol 96%	30''
30''	Etanol 70%	30''
30''	Água	30''
10'	Hematoxilina de Harris (Ref.:3801560, Surgipath®)	3'/4'/5'
45''	Água	45''
6''	Ácido Clorídrico (0,5%) em Etanol 70%	NA
7'	Água Corrente	7'
30''	Etanol 96%	30''
1'45''	Eosina Y (Ref.:3801600, Surgipath®)	1'45''
1'	Etanol 96%	1'
1'	Etanol 100%	1'
1'	Etanol 100%	1'
1'	Xileno	1'

Recolha de dados e Avaliação

Escala qualitativa ordinal de 4 níveis, atribuindo um *score* para os seguintes parâmetros:

- Preservação morfológica (PM);
- Intensidade da coloração do citoplasma (ICC);
- Coloração não específica (CNE);
- Intensidade da coloração dos núcleos (ICN);
- Detalhe Nuclear (DN).

Tabela 2 - Fatores de ponderação do *score* final.

	Preservação morfológica	Intensidade da coloração do citoplasma	Coloração não específica	Intensidade da coloração dos núcleos	Detalhe nuclear
Fator de ponderação	1	1	2	3	3

$$Score\ final = [(3 \times [ICN + DN]) + (2 \times [CNE]) + (ICC + PM)] \times 3.333$$

Tratamento de dados

- Verificar a consistência interna do instrumento de recolha de dados utilizando o **Teste α de Cronbach**.
- Aplicação de **ferramentas de estatística descritiva**, nomeadamente medidas de tendência central e de variabilidade, a fim de avaliar a qualidade da coloração por método.
- Determinação da normalidade e a homogeneidade das variâncias, de modo a aplicar o **teste one-way ANOVA** com o **teste post hoc de Tukey com um $\alpha = 0,05$** , determinando a significância estatística.

Resultados e Discussão

Teste alfa de Cronbach

Consistência interna

0,852

One-way ANOVA

Análise de Variância

F(3, 124) = 1,463, p = 0,228

Resultados e Discussão

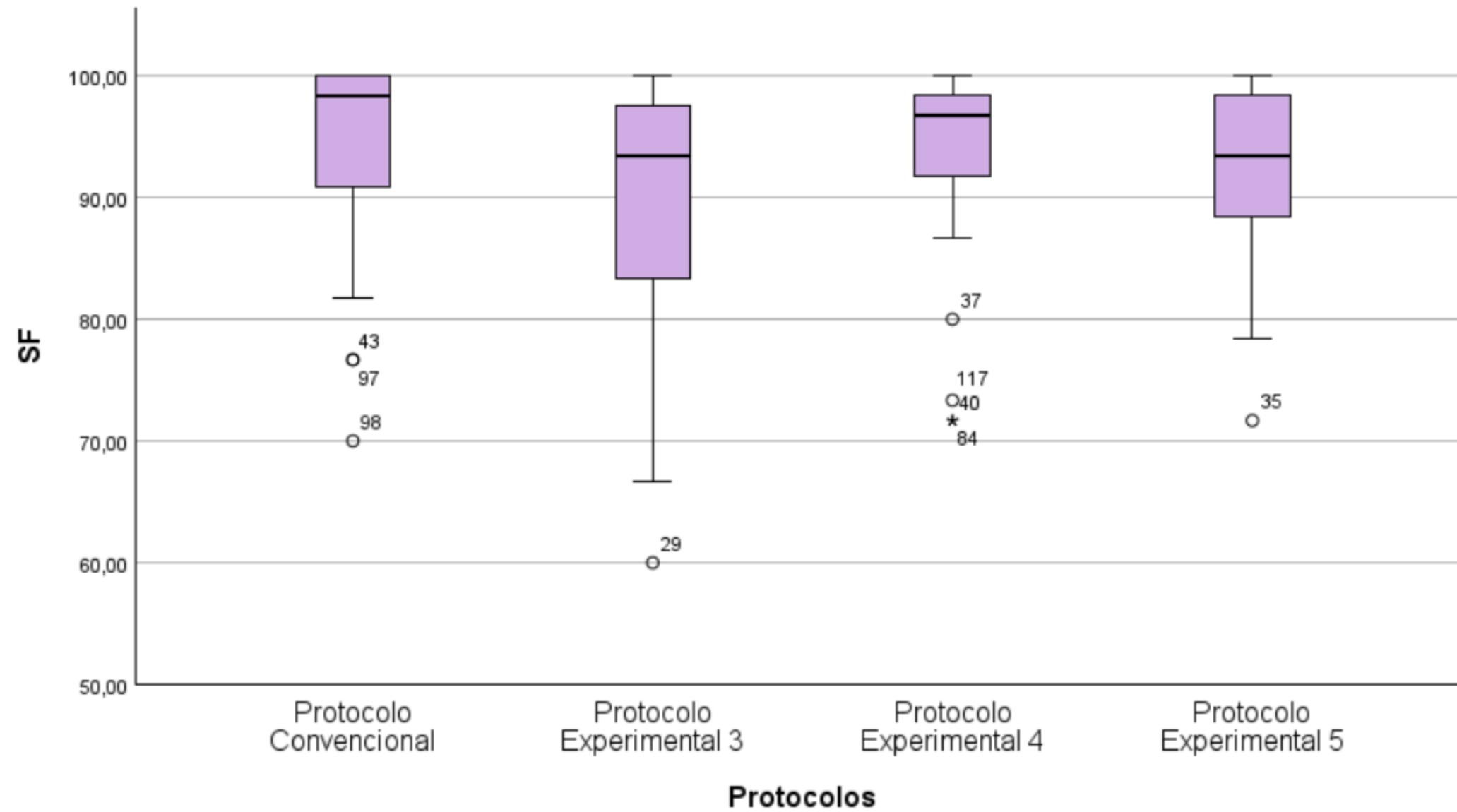


Gráfico 1 - Comparação da variável FS (*score* final) e os diferentes protocolos testados.

Teste de Tukey

Nível de significância de
 $\alpha = 0,05$

Sig. → 0,197

Resultados e Discussão

Hipótese Nula (H_0) ✓

Não há diferença significativa na qualidade da coloração entre os protocolos progressivos testados de coloração H&E com HH e o protocolo convencional de H&E.

Se valor de $p > 0,05$

Hipótese Alternativa (H_1) ✗

Declara que **existe uma diferença significativa** entre os protocolos progressivos testados de coloração H&E com HH e o protocolo convencional de H&E.

Se valor de $p < 0,05$

$p = 0,197$

Resultados e Discussão

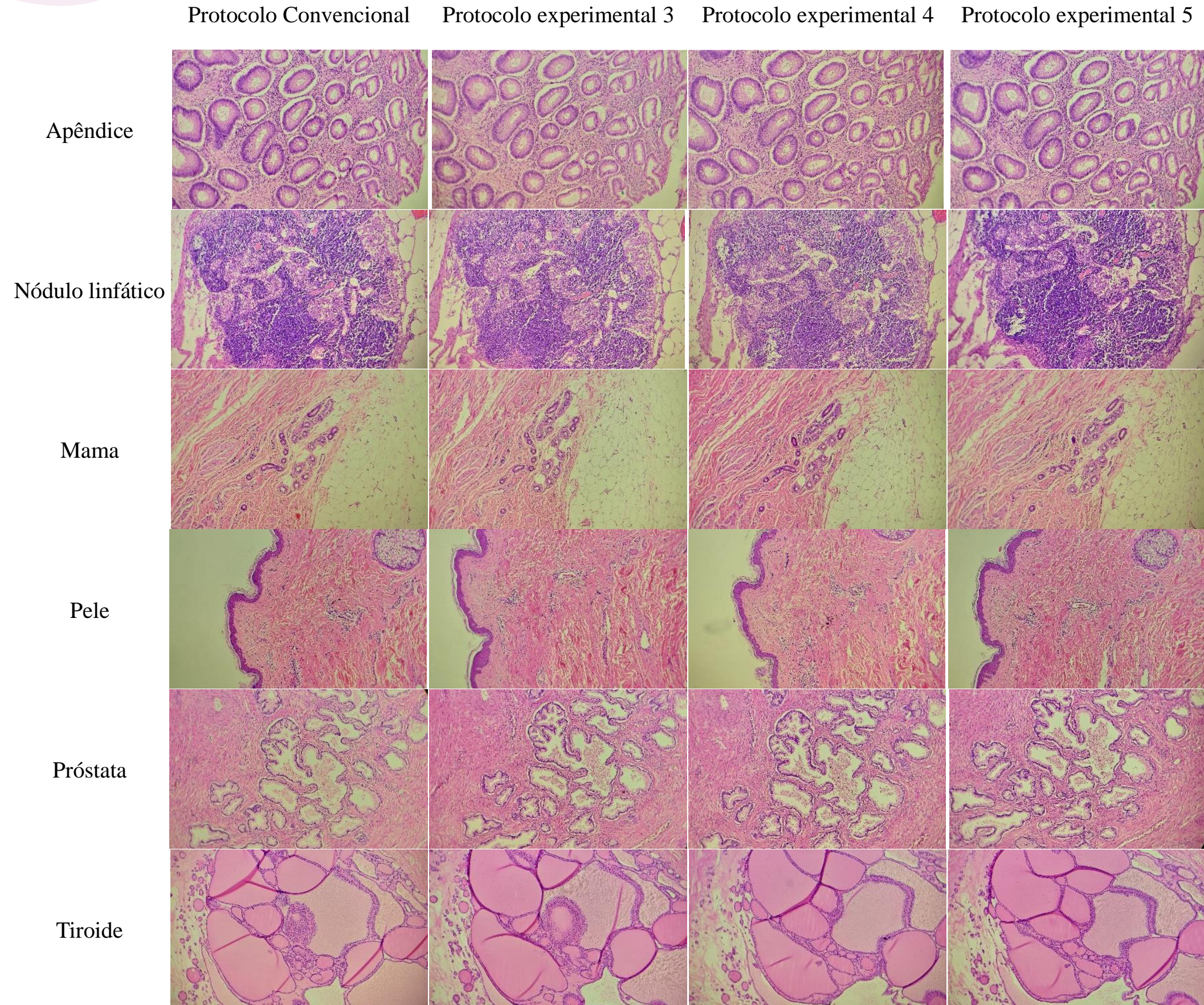


Figura 4 – Comparação dos protocolos de coloração. Imagens representativas da coloração de H&E de secções de tecido com 4 μ m de espessura (100x). Fonte: Própria.

Resultados e Discussão

Vantagens do Protocolo Progressivo

- ✓ Reduzir significativamente a duração da coloração;
- ✓ Eliminar a necessidade do diferenciador;
- ✓ Melhorar a eficiência e segurança do laboratório.

Propomos,

Adotar o tempo de exposição de 3 minutos utilizando HH progressivamente sem diferenciador, como alternativa ao método convencional.

Conclusão

- Foram desenvolvidos e avaliados **3 protocolos progressivos** de coloração H&E com HH de modo a obter resultados de qualidade semelhantes ao método convencional.
- Os resultados demonstraram que a **variação do tempo de exposição de HH** entre 3 a 5 minutos **não impactou a qualidade** da coloração.
- A análise estatística confirmou a ausência de diferenças significativas entre protocolos, validando o **protocolo progressivo como uma alternativa viável** ao método convencional.
- O estudo está alinhado com a literatura existente, que defende protocolos de coloração otimizados, permitindo a **melhor preservação tecidual** e **qualidade da coloração**.

Conclusão

- A ausência de diferenças estatísticas entre protocolos permite a seleção de um tempo de exposição de **3 minutos como protocolo preferencial**.
- Essa escolha permite a **redução do tempo de coloração e elimina o diferenciador**, simplificando o processo e dando resposta às preocupações de segurança e ambientais associadas ao método convencional.
- O protocolo progressivo promove práticas histopatológicas mais seguras e eficazes, com **potencial para melhorar as condições de trabalho e eficiência laboratorial**.



Limitações

- Falta de validação prévia da ferramenta de recolha de dados;
- Quantidade limitada de material biológico;
- Contexto específico do estudo.

Perspetivas Futuras



- Aumento da quantidade de material biológico;
- Utilização de material biológico com neoplasia;
- Exploração de outros fatores que possam afetar a coloração.

Referências Bibliográficas

1. Kusuma Dewi A, Purwanto B, Widjiati. Introduction of Histopathology. *Molecular Histopathology and Cytopathology* [Internet]. 2023 Jun 14 [cited 2024 Jul 9]; Available from: https://www.researchgate.net/publication/371629981_Introduction_of_Histopathology
2. Histopathology [Internet]. [cited 2024 Jul 9]. Available from: <https://www.rcpath.org/discover-pathology/news/fact-sheets/histopathology.html>
3. Butte AJ, Chen D. Translational Bioinformatics for Genomic Medicine. *Genomic and Personalized Medicine*. 2013 Jan 1;272–86.
4. Chen D. Histological Staining and its Methods. *J Interdiscip Histopathol* [Internet]. 2022 Oct 5 [cited 2024 Jul 9];10:1–2. Available from: <https://www.ejmjih.com/ejmjih-articles/histological-staining-and-its-methods-92034.html>
5. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Glob J Health Sci* [Internet]. 2016 Jun 25 [cited 2024 Jul 9];8(3):72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804027/>
6. Gurina TS, Simms L. Histology, Staining. StatPearls Publishing LLC [Internet]. 2023 May 1 [cited 2024 Jul 7]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557663/>
7. Fischer AH, Jacobson KA, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008 May;3(5).
8. Bancroft JD, Layton C, Suvarna SK. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques [Internet]. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier; 2019 [cited 2024 Jun 27]. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-6864-5.00010-4>
9. Ali FR, Orchard GE, Mallipeddi R. Hematoxylin in History-The Heritage of Histology. *JAMA Dermatol* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2024 Jun 27];153(3):328. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28273307/>
10. Titford M. The long history of hematoxylin. *Biotechnic & Histochemistry* [Internet]. 2005 [cited 2024 Jul 9];80(2):73–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/10520290500138372>
11. Rastogi V, Kashyap N, Madhesi N, Nishant, Dayma A, Sharma J. Comparison of Three Alum Hematoxylin–Harris, Mayer's, Ehrlich Hematoxylin Using Different Tissues–A Study of 60 Cases. *Modern Approaches in Dentistry and Oral Health Care*. 2019 Jun 24;3(5).
12. Center for MusculoSkeletal Research. Hematoxylin and Eosin Stain (H&E) [Internet]. 2020 [cited 2024 Jul 10]. Available from: <https://www.urmc.rochester.edu/musculoskeletal-research/core-services/histology/protocols.aspx>
13. Hristu R, Stanciu SG, Dumitru A, Paun B, Floroiu I, Costache M, et al. Influence of hematoxylin and eosin staining on the quantitative analysis of second harmonic generation imaging of fixed tissue sections. *Biomed Opt Express*. 2021 Sep 1;12(9):5829.
14. Nuovo GJ. *In Situ Molecular Pathology and Co-Expression Analyses*. Elsevier; 2021.
15. Myers R. *The Basic Chemistry of Hematoxylin*. Leica Biosystems. 2024.
16. Dey P. *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Singapore: Springer Singapore; 2018.

Referências Bibliográficas

17. Har Bhajan Singh, Bharati KA. Mordants and their applications. Handbook of Natural Dyes and Pigments. 2014;18–28.
18. Lai M, Lü B. Tissue preparation for microscopy and histology. Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists. 2012 Dec 31;53–93.
19. Renshaw S. The Immunoassay Handbook . 4th ed. 2013.
20. An Intro to H&E Staining: Protocol, Best Practices, Steps & More [Internet]. [cited 2024 Jul 7]. Available from: <https://www.leicabiosystems.com/pt-pt/knowledge-pathway/he-staining-overview-a-guide-to-best-practices/>
21. An In Depth Look at the Hematoxylin & Eosin (H&E) Stain: Part 2 [Internet]. 2022 [cited 2024 Jun 27]. Available from: <https://www.nsh.org/blogs/jemal-clarke/2022/05/27/an-indepth-look-at-the-eosin-stain>
22. Gupta S, Chachra KL, Bhadola P, Sodhani P. Modified Papanicolaou staining protocol with minimum alcohol use: A cost-cutting measure for resource-limited settings. Cytopathology. 2010;21(4):229–33.
23. Cardiff RD, Miller CH, Munn RJ. Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. Cold Spring Harb Protoc. 2014;2014(6):655–8.
24. Environmental Protection Agency. Hydrochloric Acid (Hydrogen Chloride) [Internet]. 2Hazard Summary-Created in April 1992; Revised in January 2000. 2000 Jan [cited 2024 Jul 9]. Available from: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/hydrochloric-acid.pdf>
25. University of Washington Department of Environmental & Occupational Health Sciences. Material Safety Data Sheet - Isopropyl Alcohol, 70% MSDS [Internet]. [cited 2024 Jul 9]. Available from: https://deohs.washington.edu/pnash/sites/deohs.washington.edu.pnash/files/documents/FT_rubbing_alcohol_MSDS.pdf
26. Safety data sheet - Hydrochloric acid. Version 8.5. Sigmal-Aldrich; 2024.
27. Safety data sheet - Ethyl Alcohol, pure. Version 6.6. Sigmal-Aldrich; 2024.
28. University of Washington Department of Environmental & Occupational Health Sciences. Hydrochloric Acid SOP | EHS [Internet]. [cited 2024 Jul 9]. Available from: <https://www.ehs.washington.edu/resource/hydrochloric-acid-sop-683>
29. National Center for Biotechnology Information. Hydrochloric Acid | HCl | CID 313 - PubChem [Internet]. [cited 2024 Jul 9]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydrochloric-Acid>
30. Abdollahi M, Nikfar S. Hydrochloric Acid. Encyclopedia of Toxicology: Third Edition. 2014 Jan 1;960–3.
31. Bogdanov LA, Kutikhin AG. Optimization of hematoxylin and eosin staining of heart, blood vessels, liver, and spleen. Fundamental and Clinical Medicine. 2019 Dec 28;4(4):70–7.
32. Silva C, Aguiar P. O que é um delineamento de estudo em saúde? [Internet]. 2005. Available from: www.eurotrials.com

Comparação da coloração de H&E com Hematoxilina de Harris: Protocolo Convencional vs. Progressivo

Cátia Bernardino¹, Giulia Trindade¹, Rita Caramelo¹, João Palma^{1,2}, Amadeu Borges-Ferro¹

¹Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Instituto Politécnico de Lisboa. Lisboa, Portugal.

²Hospital de Vila Franca de Xira - Unidade Local de Saúde do Estuário do Tejo, E.P.E., Portugal.



Março de 2025