

Novo algoritmo para diferenciar tipos histoquímicos de metaplasia intestinal: G & Amp; Método S2

New algorithm to differentiate histochemical types of intestinal metaplasia: g& s2 method

Gian Ramirez Ubillus¹; Carlos Ricardo Neira-Montoya²; Eduardo Eulogio Sedano-Gelvet²; Joel Fernando Verona-Cueva²

¹Escuela de Tecnología Médica, Universidad Privada San Juan Bautista, Lima, Perú

²Maria Auxiliadora Hospital, Pathological Anatomy Service, Lima, Peru.

RESUMO

Introdução: A classificação da metaplasia intestinal por métodos histoquímicos tem sido descrita como a mais adequada. No entanto, os algoritmos atuais não são replicáveis em laboratórios devido a limitações severas.

Objetivo: Avaliar um novo algoritmo para diferenciar tipos histoquímicos de metaplasia intestinal. Material e

Método: Pesquisa transversal em que 512 biópsias gástricas com metaplasia intestinal (blocos de parafina) foram avaliadas por um novo algoritmo usando dois tipos de corantes Alcian Blue durante fevereiro-março de 2020 no serviço de anatomia patológica do Hospital Maria Auxiliadora, Lima, Peru. Essa avaliação consistiu em duas etapas: visualização das mucinas ácidas nas células colunares da mucosa gástrica e cálculo da estatística Kappa ponderado.

Resultados: Os tipos histoquímicos de metaplasia intestinal mostraram-se a seguir: Tipo I, 398 (77,7%); Tipo II, 81 (15,8%) e Tipo III, 33 (6,5%). A estatística Kappa ponderado foi de 0,79 ($p < 0,001$), classificada como concordância importante ou boa.

Conclusão: Este novo algoritmo demonstrou ser útil e capaz de identificar e diferenciar os tipos histoquímicos de metaplasia intestinal, além de possuir confiabilidade estatística

Palavras-chave: mucinas gástricas; azul alciano; mucosa gástrica.

ABSTRACT

Introduction: The classification of intestinal metaplasia by histochemistry methods has been described as the most appropriate. However, current algorithms are not replicable in laboratories due to severe limitations.

Objective: To evaluate a new algorithm to differentiate histochemical types of intestinal metaplasia.

Material and Method: Cross-sectional research in which 512 gastric biopsies with intestinal metaplasia (paraffin blocks) were evaluated by a new algorithm using two types of Alcian Blue dyes during February-March of 2020 in the pathological anatomy service of the Maria Auxiliadora Hospital, Lima, Peru. This evaluation consisted of two steps: visualization of acid mucins in the columnar cells of the gastric mucosa and calculation of the weighted Kappa statistic.

Results: Histochemical types of intestinal metaplasia showed as follows: Type I, 398 (77.7%); Type II, 81 (15.8%) and Type III, 33 (6.5%). The weighted Kappa statistic was 0.79 ($p < 0.001$), rated as an important or good concordance.

Conclusion: This new algorithm demonstrated it was useful and capable of identifying and differentiating the histochemical types of intestinal metaplasia, in addition to having statistical reliability.

Key words: gastric mucins; alcian blue; gastric mucosa.

INTRODUÇÃO

A metaplasia intestinal é uma patologia gástrica descrita como fator de risco para câncer gástrico^(1,2). Para melhorar essa previsão e tomar decisões para tratar o grupo específico de pessoas de maior risco, a metaplasia intestinal costuma ser classificada como tipo I, II e III, por métodos morfológicos ou histoquímicos^(3,4).

A classificação morfológica é realizada pela coloração de rotina pela Hematoxilina-Eosina e descreve características celulares como quantidade de cálice, células colunares, desordem arquitetônica das criptas, entre outras. Esse método é de fácil execução e baixo custo, mas tem sido descrito como impreciso e subjetivo^(5,6).

Por outro lado, a melhor classificação, por sua maior objetividade e especificidade, é por meio da histoquímica e baseia-se na determinação da presença de moléculas denominadas mucinas ácidas (sialo e sulfomucinas)^(7,8). Essas mucinas ácidas são um tipo de carboidratos também chamados de ácidos glicosaminoglicanos ou mucopolissacarídeos ácidos, que possuem alto peso molecular e são caracterizados por possuírem cadeias complexas de oligossacarídeos ligados à proteína por ligações O-glicosídicas^(9,10).

Ao longo da história, diferentes técnicas histoquímicas foram realizadas para identificar e diferenciar essas mucinas ácidas, como Alto Ferro Diamina-Alcian Blue, Aldeído de Gomori Fuchsin-Alcian Blue e Orcein-Alcian Blue⁽¹¹⁻¹⁴⁾.

Porém, os algoritmos criados a partir desses métodos apresentam dificuldade na técnica, alto custo, toxicidade dos reagentes e atraso nos resultados, de forma que esses recursos os tornam inúteis para aplicação na maioria dos laboratórios. Um novo algoritmo derivado de métodos histoquímicos que superam essas limitações é bastante necessário. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar um novo algoritmo para diferenciar os tipos histoquímicos de metaplasia intestinal.

MATERIAL E MÉTODO

Esta pesquisa descritiva e transversal teve as seguintes características:

População e amostra: A população foi constituída de biópsias gástricas (blocos de parafina) com diagnóstico de metaplasia intestinal pela coloração de rotina da Hematoxilina-Eosina durante janeiro-maio de 2019 no serviço de anatomia patológica do Hospital Maria Auxiliadora, Lima, Peru. A quantidade foi de 793 blocos de parafina, e optou-se por escolher toda essa

população como amostra para ter a melhor representatividade. Em seguida, foram aplicados os critérios de seleção e, por fim, foram trabalhadas 512 amostras que atendessem a estes.

Os critérios de inclusão foram: Biópsias gástricas (blocos de parafina) com diagnóstico de MI pelo método de coloração Hematoxilina-Eosina no período de janeiro a maio de 2019 e registradas no sistema de armazenamento diagnóstico virtual, independentemente de outros diagnósticos. Os critérios de exclusão foram: blocos de parafina sem tecido residual para novas lâminas, blocos de parafina danificados, blocos de parafina que não foram encontrados no armário de armazenamento (encaminhados para outros hospitais), blocos de parafina com identificação questionável (quadro borrado ou danificado) e mais de um bloco de parafina pela mesma pessoa.

Os procedimentos foram realizados no período de fevereiro a março de 2020. Os blocos de parafina armazenados entre janeiro e maio de 2019 foram escolhidos para funcionar pelos seguintes motivos:

Recomenda-se que quando as moléculas forem demonstradas em tecidos, sejam escolhidos blocos de parafina com o armazenamento mais recente possível. Investigações demonstraram que um bloco de parafina armazenado pode ter reatividade adequada ou útil por até dois anos (48,49). O segundo motivo consistiu em detalhes logísticos próprios do serviço, o que não permite a retirada de blocos de parafina armazenados muito recentes, pois estes podem ser utilizados constantemente para procedimentos após o diagnóstico inicial.

Procedimentos: O corante Alcian Blue com valor de pH 2,5 foi preparado como segue: 1 g do corante Alcian Blue (LobaChemie Pvt. Ltd.) foi misturado em 99 mL de água destilada, em seguida, 1 mL de ácido acético glacial foi adicionado, armazenando em temperatura ambiente. O pH final foi avaliado por um potenciômetro (Checker-Portable pH Meter, HANNA Instruments), que emitiu valor 2,5, adequado para demonstração de sialomucinas e sulfomucinas^(11,15-17).

O corante Alcian Blue com valor de pH 0,5 foi preparado como segue: 1 g do corante Alcian Blue (LobaChemie Pvt. Ltd.) foi misturado em 99,5 mL de água destilada, então 0,5 mL de ácido clorídrico foi adicionado, armazenando em temperatura ambiente. O pH final foi avaliado por um potenciômetro (Checker-Portable pH Meter, HANNA Instruments), que emitiu um valor de 0,5, adequado para demonstração exclusivamente de sulfomucinas^(11,15-17).

Após a escolha dos blocos de parafina que atendiam aos critérios de seleção, de cada bloco de parafina, 2 novas lâminas (3

µm) foram feitas sem nenhum aditivo de aderência especial por um micrótomo rotativo convencional e processadas pelo seguinte algoritmo.

Foram levados ao fogão por 20 minutos a 85° C. A seguir, as lâminas foram imersas em xilol (2 trocas) por 5 minutos cada uma. Em seguida, foram imersos em álcool absoluto (2 trocas) e álcool 96 ° (2 trocas) por 5 minutos cada, sendo finalizada a hidratação com água da torneira por 1 minuto. Em seguida, a coloração com azul Alcian em pH 2,5 e pH 0,5 foi aplicada em gotas por 5 minutos e 10 minutos, respectivamente.

O protocolo de contraste consistiu em lavar as lâminas com água da torneira por 30 segundos e contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, em seguida, foram lavadas novamente com água da torneira por 30 segundos. Em seguida, foram diferenciados rapidamente (5 segundos) por álcool ácido 1%, lavados em água de torneira por 1 minuto, imersos em água de amônia 0,3% por 30 segundos e novamente lavados em água de torneira por 1 minuto.

Por fim, as lâminas foram secas em ventilador por 5 a 7 minutos e montadas em bálsamo sintético do Canadá. Nota: Os controles de tecido positivos (duodeno para Alcian Blue com valor de pH 2,5 e traqueia para Alcian Blue com valor de pH 0,5) e negativos (baço ou fígado para ambos Alcian Blue) foram adicionados às lâminas anteriormente.

Novo algoritmo para diferenciar tipos histoquímicos de metaplasia intestinal

Este novo algoritmo é baseado em dois recursos:

A utilização de dois tipos de corantes Alcian Blue (pH 2,5 e pH 0,5). Este reagente é mundialmente conhecido por detectar mucinas ácidas em diferentes patologias pela presença de cor turquesa. Para a aplicação em metaplasia intestinal, apenas Alcian Blue em pH 2,5 foi considerado previamente.

As etapas que são necessárias seguir para definir o tipo de metaplasia intestinal. O primeiro passo é observar a lâmina corada pelo Alcian Blue em pH 2,5, pois detectará ambas as mucinas ácidas (se estiverem presentes) nas células colunares da mucosa gástrica. No entanto, ainda não será possível diferenciar qual mucina ácida está presente. Em seguida, a segunda etapa é observar o slidestained pelo Alcian Blue em pH 0,5, pois ele detectará apenas sulfomucinas nas células colunares da mucosa gástrica. Para isso, é necessário observar os mesmos campos nas duas lâminas (ambas provenientes do mesmo bloco de parafina do paciente, conforme mencionado na seção de procedimentos) por um microscópio óptico convencional.

Portanto, células colunares não coradas em ambas as lâminas histológicas significam que nenhuma mucina ácida está presente (Metaplasia intestinal - tipo I). Células colunares turquesa na lâmina com Alcian Blue a pH 2,5, mas não coradas na lâmina com Alcian Blue a pH 0,5 significa que há sialomucinas predominantemente (metaplasia intestinal - tipo II). Células colunares turquesa em ambas as lâminas histológicas significa que há sulfomucinas predominantemente (Metaplasia intestinal - tipo III).

Durante a visualização das lâminas, mais de um tipo de MI foi encontrado, sendo considerado o maior grau.

Análise estatística: Para a definição da concordância, dois especialistas da área foram convidados a participar desta pesquisa, um com mais de 25 anos de experiência e outro com 4 anos de experiência. Esta diferença entre os especialistas foi escolhida porque se pretendia criar uma situação de aplicação real, na qual os laboratórios terão sempre especialistas com capacidades e experiências diversas.

A estatística Kappa ponderado foi calculada pelo STATA 16.0. Esse tipo de estatística kappa foi escolhido porque “tipos de metaplasia intestinal” era uma variável politômica. A significância estatística foi considerada por um valor de p menor que 0,05 e o esquema de peso de Fleiss foi usado porque esta é a melhor aproximação para o coeficiente de correlação intraclasse.

Por fim, para determinar a prevalência dos tipos de metaplasia intestinal, foram considerados os valores emitidos pelo especialista mais experiente.

Aspectos éticos: Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Maria Auxiliadora.

RESULTADOS

Prevalência dos tipos de metaplasia intestinal: Como resultado principal, este novo algoritmo conseguiu identificar as mucinas ácidas em todas as amostras. Elas foram classificadas de acordo com a cor turquesa nas células colunares da mucosa gástrica (as células caliciformes também são mostradas apenas para demonstrar as diferenças entre as células).

Para o tipo I, nenhuma cor foi observada no citoplasma das células colunares em ambas as lâminas histológicas (exemplo é dado na Figura 1).

Para o tipo II, foi observado um citoplasma turquesa das células colunares na lâmina com Alcian Blue a pH 2,5, mas não corado na lâmina com Alcian Blue a pH 0,5 (o exemplo é dado

na Figura 2).

Para o tipo III, foi observado citoplasma turquesa das células colunares em ambas as lâminas histológicas (exemplo é dado na Figura 3).

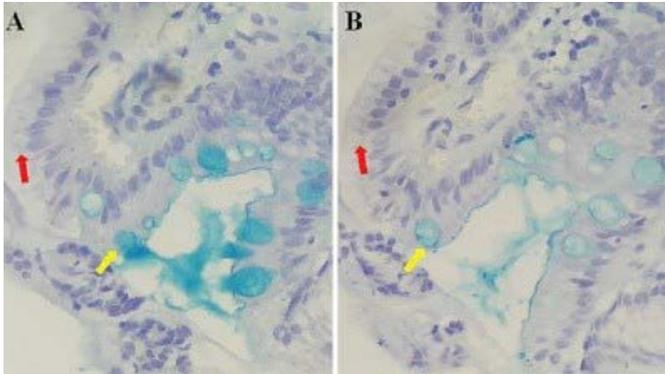


FIGURA 1 – Presença de sialo ou sulfomucinas nas células caliciformes com Alcian Blue em pH 2,5, mas células colunares não (A). Confirmação de sulfomucinas nas células caliciformes com Alcian Blue a pH 0,5 mas células colunares não (B). Interpretação do algoritmo: Metaplasia Intestinal-Tipo I. Seta vermelha: Célula Colunar. Seta amarela: célula de cálice. Objeto: 40X.

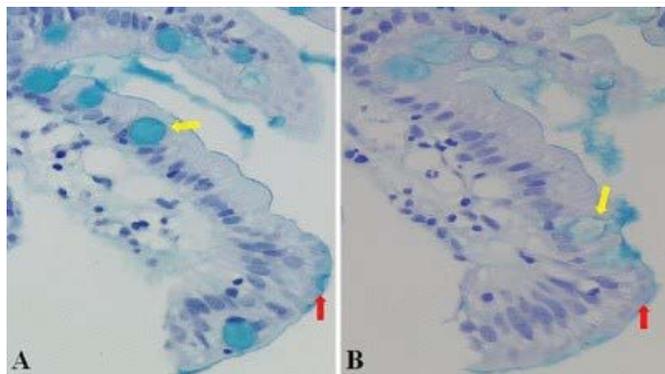


FIGURA 2 – Presence of sialo or sulfomucins in the Goblet and Columnar cells with Alcian Blue at pH 2.5 (A). Confirmation of sulfomucins in the Goblet cells with Alcian Blue at pH 0.5 but Columnar cells not (B). Interpretation of the algorithm: Intestinal Metaplasia- Type II. Red arrow: Columnar Cell. Yellow arrow: Goblet cell. Objective: 40X.

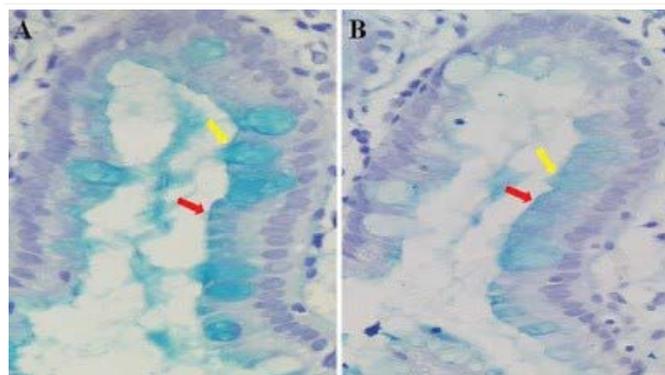


FIGURA 3 – Presença de sialo / sulfomucinas nas células caliciformes e colunares com Alcian Blue em pH 2,5 (A). Confirmação de sulfomucinas nas células caliciformes e colunares com Alcian Blue em pH 0,5 (B). Interpretação do algoritmo: Metaplasia Intestinal-Tipo III. Seta vermelha: célula colunar. Seta amarela: célula de cálice. Objeto: 40X.

Os tipos de metaplasia intestinal foram os seguintes: Tipo I, 398 (77,7%); Tipo II, 81 (15,8%) e Tipo III, 33 (6,5%).

Estatística Kappa: A tabela de contingência e a análise dos resultados gerada pelos dois especialistas são apresentadas na Tabela 1.

A estatística Kappa ponderado calculado foi de 0,79, classificado como uma concordância importante ou boa. Foi rejeitada a hipótese nula de que a concordância entre os resultados dos especialistas é devida ao acaso ($p < 0.001$).

DISCUSSÃO

Esta pesquisa é uma das primeiras a ser realizada na América Latina, uma vez que apenas duas investigações foram publicadas até o momento sobre a tipificação da metaplasia intestinal pela histoquímica^(18,19). Além disso, este estudo é o primeiro a trabalhar apenas com o corante Alcian blue e apresenta o maior tamanho de amostra, o que tornaria a precisão estatística dos resultados mais adequada.

A prevalência dos tipos de metaplasia intestinal é semelhante aos resultados de outros estudos realizados na região oeste^(20,21), superior aos realizados na Europa^(22,23) e menor em relação à região leste⁽²⁴⁻²⁶⁾. A primeira diferença pode ser porque os europeus são menos freqüentemente expostos a fatores de risco, como a infecção por *Helicobacter pylori*. A segunda diferença pode ser devida a características próprias da população asiática, por exemplo, fatores genéticos, gastronomia e estilos de vida.

Diferentes métodos foram descritos para a demonstração de mucinas ácidas. No caso de ambos os tipos de mucinas (sialo e sulfomucinas), o corante Alcian Blue em pH 2,5 é o mais utilizado devido à sua seletividade^(14,27). Para uma maior especificidade com as sulfomucinas, foi descrito que o método High Iron Diamine é o reagente de referência.

No entanto, estudos revelaram por análise cromatográfica, que também os melhores reagentes são o Alcian Blue em pH 0,5-1,0 e Azure A em pH 0,4-1,5^(11,28,29). Portanto, esses três seriam os melhores reagentes de referência para a detecção de sulfomucinas.

Este novo algoritmo histoquímico usa reagentes com muito menos toxicidade, em contraste com a diamina de ferro com alto teor de ferro e as soluções de aldeído-fuchsin histoquímico de Gomori. Além disso, os reagentes são muito acessíveis, com aplicação imediata (não maturação), armazenamento à temperatura ambiente e o protocolo de coloração com a solução principal é o mais rápido (5 minutos para o Alcian Blue em pH 2,5 e 10 minutos para o Alcian Blue a pH 0,5), em comparação com

TABELA 1 - Tabela de contingência e concordância dos resultados gerados pelos dois especialistas

Observer 1	Observer 2				
	IM I	IM II	IM III	TOTAL	
IMI ^a	384	14	0	398	
IMII ^b	33	38	10	81	
IMIII ^c	0	12	21	33	
TOTAL	417	64	31	512	
Agreement	Expected agreement	Kappa	Standard error	Z	p
96.63%	83.95%	0.79	0.04	17.94	<0.001

^aMetaplasia intestinal - Tipo I. ^bMetaplasia intestinal - Tipo II. ^cMetaplasia intestinal - Tipo III

alta diamina de ferro: 24-48 horas; Aldeído Fucsina de Gomori: 20-30 minutos; Orceína: 4-6 horas.

A estatística Kappa ponderado foi avaliada como concordância importante ou boa, e isso pode ser devido ao fato de que a visualização das lâminas implica focalizar apenas uma única cor e célula em relação aos outros métodos descritos. Para melhorar essa estatística kappa, os autores recomendam tentar outros corantes nucleares, como vermelho neutro (porque isso poderia ajudar a reconhecer a célula colunar mais rápido) e recategorizar os tipos de metaplasia intestinal em apenas duas categorias: inalterado (tipo I) e com alterações nas células colunares (tipo II e tipo III). Este último porque o tipo II é um fenótipo intermediário e mais cedo ou mais tarde irá evoluir para o tipo III.

O processo de aprender a reconhecer o tipo de metaplasia

intestinal requer, embora curto, um período de treinamento e os anatomopatologistas podem não estar muito acostumados a ler lâminas em que métodos histoquímicos foram aplicados. Essas são limitações.

Em conclusão, a avaliação desse novo algoritmo com o corante Alcian Blue demonstra que ele foi útil e capaz de identificar e diferenciar os tipos histoquímicos de metaplasia intestinal, além de apresentar confiabilidade estatística.

Reconhecimentos: À Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Maria Auxiliadora, Patologista Sara Jacqueline Cardenas Timóteo, pelo apoio nas formalidades e utilização das instalações.

Conflitos de interesses: Os autores declaram não ter interesses conflitantes.

REFERÊNCIAS

- Rubiano Vinuesa J, Velásquez Galvis M. Atrofia, Metaplasia e Câncer Gástrico: Onde está a Evidência? *Coronel J Surg*. 2007; 22(1): 39-46.
- Diaz MM, Alonso SC, Vanterpoll Hector M, et al. Câncer gástrico: algumas considerações sobre fatores de risco e *Helicobacter pylori*. *Elec Med J*. 2018;40(2):433-44.
- Gupta S, Li D, El Serag HB, et al. AGA Clinical Practice Guidelines on Management of Gastric Intestinal Metaplasia. *Gastroenterol*. 2020; 158(3): 693-702.
- Jencks DS, Adam JD, Borum ML, et al. Overview of Current Concepts in Gastric Intestinal Metaplasia e Câncer Gástrico. *Gastroenterol Hepatol*. 2018; 14(2): 92-101.
- Gómez M, Otero W, Caminos JE. Câncer gástrico em pacientes jovens na Colômbia. *Col J Gastroenterol*. 2012; 27(3): 166-72.
- Bedoya UA, Sansón GF, Yopez Fuertes VY, et al. Prevalência e gravidade das lesões malignas precursoras em uma área de alto risco para câncer gástrico. *Coronel J Gastroenterol*. 2012; 27(4): 275-81.
- Jass JR, Walsh MD. Altered Mucin Expression in the Gastrointestinal Tract: a Review. *J Cell Mol Med*. 2001; 5(3): 327-51.
- Einstien D, Prathiba A, Parijatham BO, et al. Role of Mucin Histochemistry in Gastric Mucosal Lesions. *Estudo Científico Int J*. 2016; 4(8): 146-9.
- Thornton DJ, Sheehan JK. De Mucins para Mucus: Para uma compreensão mais coerente desta Barreira Essencial. *Proc Am Thorac Soc*. 2004; 1(1): 54-61.
- Bansil R, Turner BS. A Biologia de Mucus: Composição, Síntese e Organização. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 124: 3-15.
- Gad A, Sylven B. On the Nature of the High Iron Diamine method for Sulfomucins (Sobre a Natureza do Método da Alta Diamina de Ferro para

- Sulfomucinas). *J Histochem Cytochem.* 1969; 17(3): 156-60.
12. Shah KA, Deacon AJ, Dunscombe P, et al. Subtipagem de Metaplasia Intestinal: Avaliação do Fuchsin de Aldeído de Gomori para uso em diagnóstico de rotina. *Histopatol.* 1997; 31(3): 277-83.
 13. Singh R, Gorton AW. Orcein-Alcian Blue Staining: a New Technique for demonstrating Acid Mucins in Gastrointestinal Epithelium. *J Clin Pathol.* 1989; 42(8): 881-4.
 14. Spicer S. Diamine Methods for Differentiating Mucosubstances Histochemically (Métodos de Spicer S. Diamine para Diferenciar Mucosubstâncias Histoquímicas). *J Histochem Cytochem.* 1965; 13(3): 211-34.
 15. Everson Pearse A. Carboidratos. In: *Histochemistry.* Segunda edição. 1951; 228-60.
 16. Garcia del Moral R. Histoquímica de hidratos de carbono e carboidratos. In: *Laboratório de Anatomia Patológica.* primeira edição. 226-38.
 17. Lillie RD, Conn HJ. Reagentes Cromogênicos Miscelâneos e Pigmentos Minerais. In: *H J Conn's Biological Stains: Um manual sobre a natureza e usos dos corantes empregados no laboratório biológico.* Oitava edição. 1969; 23-5.
 18. Perez IJT. Estudo comparativo entre o Diagnóstico Morfológico do tipo de Metaplasia Intestinal com a Confirmação Histoquímica pelo método Gomori - Alcian Blue. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Faculdade de Medicina.* 2001.
 19. Medrano Robert M, Suarez Palencia F, Cruz Setien R, et al. Utilidade da Técnica Histoquímica Gomori-Alcian Blue Fuchsin Aldehyde para o Diagnóstico da Metaplasia Intestinal Completa e Incompleta. *MEDISAN.* 2009; 13(6).
 20. Rocha N, Huertas S, Albis R, et al. Correlação de achados endoscópicos e histológicos no Diagnóstico da Metaplasia Intestinal Gástrica em pacientes encaminhados para Endoscopia Digestiva Superior na Clínica Colômbia. *Col J Gastroenterol.* 2012; 27(4): 263-8.
 21. Almouradi T, Hiatt T, Attar B. Metaplasia Intestinal Gástrica em uma População Mal-atendida nos EUA: Prevalência, Características Epidemiológicas e Clínicas. *Prática de Res. Gastroenterol.* 2013; 856256.
 22. Dinis-Ribeiro M, Lopes C, Da Costa-Pereira A, et al. Um modelo de acompanhamento para pacientes com Gastrite Crônica Atroférica e Metaplasia Intestinal. *J Clin Pathol.* 2004; 57(2): 177-82.
 23. Banks M, Graham D, Jansen M, et al. British Society of Gastroenterology guidelines on the Diagnosis and Management of patients at risk of Gastric Adenocarcinoma. *Intestino.* 2019; 68(9): 1545-75.
 24. Asaka M, Sugiyama T, Nobuta A, et al. Gastrite atroférica e metaplasia intestinal no Japão: resultados de um grande estudo Multicêntrico. *Helicobacter.* 2001; 6(4): 294-9.
 25. You WC, Li JY, Blot WJ, et al. Evolution of Precancerous Lesions in a rural Chinese Population at High risk of Gastric Cancer. *Int J Câncer.* 1999; 83(5): 615-9.
 26. Awad E, Mohamed E, Raheem A. Demonstração de Mucins em Lesões do Carcinoma do Trato Gastrointestinal em Pacientes Sudaneses. *Int J Pur Appl Scie Tech.* 2014; 21(2): 28-31.
 27. Carlo R. Alcian Blue-Alcian Yellow: Um novo método para a identificação de diferentes grupos ácidos. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12: 44-5.
 28. Sorvari TE, Sorvari RM. The Specificity of Alcian Blue pH 1,0-Alcian Yellow pH 2,5 staining in the Histochemical Differentiation of Acidic groups in Mucosubstances. *J Histoquímico Cytochem.* 1969; 17(4): 291-3.
 29. Yamada K. Dupla coloração de alguns Mucopolissacarídeos sulfatados com azul Alcian (pH 1,0) e vermelho Ruthenium (pH 2,5). *Histochemie.* 1970; 23(1): 13-20.

AUTOR CORRESPONDENTE

Gian Ramirez Ubillus  0000-0002-9236-8667
gian.ramirez@upsjb.edu.pe



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.