

---

# A fixação dos espécimes citológicos e sua influência na coloração das amostras de Papanicolaou

Gislene Mitsue NAMIYAMA, Fabiola Lorenzi DERGOVICS, Cleuza de Jesus de SOUZA  
Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, setor de Citologia Oncótica

Desde os primórdios da aplicação das técnicas citológicas existe a preocupação de se manter a integridade celular. A busca de substâncias ideais para esse fim visava, em última análise, não comprometer a qualidade do diagnóstico final. A falta de cuidados nesta fase de preparo do material influencia diretamente o desempenho do método citológico.

A fixação é a etapa que finaliza o ato da confecção do distendido de material cérvico-vaginal sobre a lâmina. As soluções fixadoras devem preservar as estruturas celulares o mais semelhante possível à situação *in vivo*, isto é, devem minimizar a retração da célula e manter a integridade morfológica através de uma rápida e eficaz cobertura do núcleo e citoplasma. Devem inativar as enzimas catalíticas e promover a substituição do líquido intracelular, que permitirá a permeabilidade dos corantes através da membrana celular. Um bom fixador deve também permitir a adesão das células na lâmina para que não se desprendam durante o processo de coloração. Deve ser reproduzível e não deve interferir com as colorações indicadas. Além disso, deve ser duradoura e permitir que o material citológico possa ser arquivado, sem comprometimento derivado do tempo de estocagem, visto que os casos suspeitos e positivos devem ser arquivados permanentemente. A substância fixadora deve ser bactericida, visto que se trata de material biológico passível de contaminação<sup>1</sup>.

Alguns fatores afetam no desempenho da substância fixadora como: pH, osmolaridade, espessura do material, volume e concentração do fixador, velocidade e concentração do fixador, velocidade de penetração do fixador e temperatura<sup>2</sup>. Na coloração de Papanicolaou, o aumento da densidade da célula pode impedir a penetração do *light green* (constituente do EA-36), resultando em excessiva eosinofilia citoplasmática, que pode ser causada pela maior acidez do fixador<sup>3</sup>.

Várias substâncias têm sido utilizadas como fixador. Papanicolaou utilizava a mistura de álcool-etílico 95%:éter (1:1)<sup>3,4</sup>. Esta solução foi abandonada por ser uma mistura explosiva. Porém, até o momento não existe uma substância fixadora ideal, que não provoque algum tipo de deformação na célula<sup>4</sup>. Portanto, é importante conhecer as propriedades químicas dos diferentes fixadores e seus efeitos sobre as células.

O etanol 95% tem sido utilizado há muitos anos como substância fixadora. Algumas alternativas podem ser utilizadas como seu substituto como o etanol absoluto (100%), o metanol (100%), isopropanol (80%) ou n-propanol (80%) e álcool

desnaturado (100%), que resultam numa fixação similar. Porém, estes substitutos são poucos utilizados devido ao seu alto custo e toxicidade.

De maneira geral, os álcoois são agentes desidratantes que promovem a substituição ou remoção da água<sup>4</sup>, atuando dessa forma como fixador que coagula proteínas do protoplasma celular<sup>5</sup> que, como consequência, reflete-se em enrugamento da célula, que lhe dá um aspecto mais arredondado. O álcool é considerado por muitos como o melhor fixador, por permitir a observação de uma clara resolução morfológica, com nítidos detalhes cromatínicos da célula após a aplicação do método de coloração<sup>4</sup>.

Sabe-se que o metanol produz menor enrugamento celular que o etanol.

Por isso, o metanol 100% tem efeito sobre as células ao etanol 95%. O metanol é o fixador preferido para o processamento de cromossomos para análise citogenética por preservar detalhes delicados.

Já o Isopropanol 80% causa um ligeiro aumento de enrugamento celular quando comparado ao metanol 100% e etanol 95%. O aumento da quantidade de água neutraliza o efeito do enrugamento do álcool, sendo o efeito do n-propanol similar ao isopropanol.

O álcool desnaturado é o etanol alterado pela adição de aditivos para torná-lo impróprio para o consumo. Este álcool pode ser usado como um fixador citológico na concentração de 95% ou 100%.

Os álcoois descritos podem, portanto, serem aplicados como fixadores úmidos. As lâminas são imediatamente submersas na solução fixadora, logo após a realização dos esfregaços, devendo permanecer de 15 a 30 minutos em média.

Durante muitos anos o álcool 95% foi utilizado como fixador ideal, preconizado para a rede pública, mas, devido à sua inflamabilidade e a dificuldade em transportar frascos contendo líquido, ele foi substituído pelo polietilenoglicol na forma líquida (gotas) ou spray que, e atualmente, tem sido o mais utilizado como substância fixadora para amostras cérvico-vaginais. O polietilenoglicol é uma mistura de vários tipos de polietilenoglicóis (Carbovax 1540, 4000) diluída em álcool etílico. Seu mecanismo de atuação envolve a fixação pelo etanol, utilizado como veículo, e a formação de uma película protetora serosa que impede o dessecação (contato com o ar). Para se obter uma boa fixação utilizando este fixador, é necessário que o

---

procedimento da aplicação do polietilenoglicol seja seguido corretamente, principalmente sobre material fresco, pois a demora na aplicação traz dúvidas, por vezes, no fechamento do diagnóstico final devido às deformações causadas pelo ar<sup>6</sup>. Por isso, não podemos chamá-la de solução fixadora ideal. Há ainda outro problema relacionado ao seu uso, como a dificuldade em removê-lo totalmente da lâmina. O núcleo poderá aparecer muito pálido, com aspecto “enevado” e sem nitidez de detalhes cromatínicos e carioteca. Quanto mais tempo o material permanecer fixado, maior será a dificuldade em removê-lo. Além disso, a temperatura também influencia neste processo, pois o polietilenoglicol pode precipitar-se mais rapidamente em dias frios formando uma camada de depósitos irregulares sobre o material.

A fim de minimizar este problema, o laboratório de citologia oncológica do Instituto Adolfo Lutz tem adotado alguns procedimentos para garantir a remoção do polietilenoglicol, como deixar as lâminas submersas em álcool etílico (96% ou 100%) por 24 horas, com a finalidade de favorecer o total desprendimento do polietilenoglicol do material. As lâminas são posteriormente lavadas em água corrente, etapa que precede a etapa de coloração com a Hematoxilina de Harris do método de Papanicolaou. Temos adotado também, a não reutilização deste álcool para as rotinas posteriores, visto que o álcool etílico, que é incolor, ganha uma cor rósea-esverdeada, que é dependente

da qualidade do fixador e que reflete variados graus de sujidade.

Com isso, temos melhorado a qualidade na nitidez nuclear do material cérvico-vaginal e conseqüentemente a qualidade diagnóstica dos exames citológicos. O desafio tem sido desenvolver estudos que visem agilizar a retirada do polietilenoglicol do material cérvico-vaginal, a fim de aperfeiçoar o tempo e a qualidade para os procedimentos de coloração e leitura.

#### REFERÊNCIA

- Keebler CM. Cytopreparatory Techniques. In: Bibbo M. Comprehensive Cytopathology. 2º ed. EUA: Saunders, 1997. p.889-917
- Horobin R W. Histochemistry. Germany: Butterworths London, 1982. p.19-55
- Bales C E, Durfee G R. Cytologic Techniques. In: Koss LG. Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases. 3º ed. EUA: Lippicott, 1979. p.1187-1266
- Holmquist M, Keebler C M. Cytopreparatory Techniques. In: Keebler C M, Somrak T M. The Manual of Cytotechnology. 7º ed. EUA: ASCP Press, 1993. p 412-48
- De May RM. The Art & Science of Cytopathology. EUA: ASCP Press, 1996. p.14-28
- Takahashi T. Atlas Colorido de Citologia do Câncer. São Paulo: Manole, 1982. p.74-82